



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Propagación de PIAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático”

AUTOR: VÁSQUEZ CASTRO EVELYN CAROLINA

DIRECTOR: KOCH KAISER ALMA, M.Sc.

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*Propagación de PIAMV del género Potexvirus y TuMV del género Potyvirus en plantas de Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático” realizado por la señorita **EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de agosto del 2017

ALMA KOCH KAISER, M.Sc.

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO**, con cédula de identidad N° 1721155016, declaro que este trabajo de titulación "**Propagación de PIAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolqui, 9 de agosto del 2017

EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO

C.I: 1721155016



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación "**Propagación de PLAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático**" cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 9 de agosto del 2017

EVELYN CAROLINA VÁSQUEZ CASTRO

C.I: 1721155016

DEDICATORIA

A Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, por haberme dado la fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida profesional.

A mi familia por su apoyo en cada momento y por aguantar mi mal humor. Especialmente, a mis padres Martha y Héctor por sus consejos y su amor incondicional, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar en mí y por llevarme cada día en sus oraciones que me permitieron no rendirme. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios y mi coraje para alcanzar mis metas.

A mis amigas/os incondicionales por los consejos precisos, por los grandes momentos de risas, de desveladas y de trabajo, por haberme empujado cuando las fuerzas se habían agotado.

AGRADECIMIENTOS

A mi mentora la Dra. Jeanmarie Verchot, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad Estatal de Oklahoma y concederme la posibilidad de desarrollar mis habilidades personales, académica y científicas. Por su exigencia, dedicación, crítica y aliento durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Me gustaría agradecer de manera muy especial a la M.Sc. Alma Koch, quien fue mi directora de tesis, por despertar mi interés en esa microscópica vida que pasa desapercibida para muchos y sobre todo por confiar en mi para llevar a cabo esta investigación.

De igual manera agradezco a la Dra. Carla Garzón, responsable del convenio entre la Universidad Estatal de Oklahoma y la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por su ayuda, tiempo y compromiso durante mi estadía en la Universidad Estatal de Oklahoma.

A la Dra. Gabriela Orquera y a la M.Sc. María Fernanda Proaño por sus sabios consejos en los momentos precisos y por el apoyo incondicional.

En particular, me gustaría dar las gracias al M.Sc. Omar Arias Gaguancela, por demostrarme que la calidad humana y científica siempre deben ir de la mano, por compartir su conocimiento y parte de su trabajo conmigo, por su paciencia infinita y sobre todo por su amistad.

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
LISTADO DE FIGURAS	ix
LISTADO DE TABLAS.....	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Los virus en las plantas	7
2.1.1 Movimiento del virus en la planta.....	8
2.1.2 <i>Potexvirus</i>	10
2.1.2.1 Genoma	10
2.1.2.2 Ciclo viral.....	12
2.1.2.3 Movimiento célula a célula.....	12
2.1.3 <i>Potyvirus</i>	13
2.1.3.1 Genoma	14
2.1.3.2 Ciclo viral.....	16
2.1.3.3 Movimiento célula a célula	18
2.2 Estrés del retículo endoplasmático.....	18
2.2.1 Respuesta de las proteínas mal plegadas.....	19
2.2.1.1 Enzima Dependiente de Inositol 1 (IRE1)	20
2.2.1.2 Factores de transcripción asociados a la membrana del ER.....	22

2.2.1.3	Rol de la UPR en la infección viral en plantas.....	23
2.2.2	Muerte celular programada (PCD).....	24
2.2.2.1	BAG6.....	24
2.2.2.2	BAG7.....	25
2.2.2.3	SKP1.....	26
2.3	<i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo.....	27
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....		28
3.1	Participantes.....	28
3.2	Zona de estudio.....	28
3.3	Periodo de tiempo de la investigación.....	28
3.4	Procedimientos.....	28
3.4.1	Plásmidos y cepas bacterianas.....	28
3.4.2	Material vegetal.....	29
3.4.3	Infección en tejido vegetal mediante suministro de material genético viral mediado por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.4.4	Análisis de proteínas de la cubierta viral mediante la técnica de Western Blot.....	31
3.4.5	Fotografías y análisis de datos mediante el programa Image J.....	35
3.5	Análisis estadístico.....	36
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		37
4.1.	Patrones de infección producida por virus del género <i>Potexvirus</i> y <i>Potyvirus</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de genes <i>bzip17</i> , <i>bzip28</i> y/o <i>bzip60</i>	37
4.1.1.	Infección local y sistémica producida por PIAMV del género <i>Potexvirus</i> en plantas mutantes <i>bzip17</i> , <i>bzip28</i> y/o <i>bzip60</i>	37
4.1.2.	Infección local y sistémica producida por TuMV del género <i>Potyvirus</i> en plantas mutantes <i>bzip17</i> , <i>bzip28</i> y/o <i>bzip60</i>	42
4.2.	Patrones de infección producida por virus del género <i>Potexvirus</i> o <i>Potyvirus</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	48
4.2.1.	Infección local y sistémica producida por PIAMV del género <i>Potexvirus</i> en plantas mutantes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	48
4.2.2.	Infección local y sistémica producida por TuMV del género <i>Potyvirus</i> en plantas mutantes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	52
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		58
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		60
BIBLIOGRAFÍA.....		61

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Movimiento del virus en las células de las plantas.....	9
Figura 2. Genoma de los <i>Potexvirus</i>	11
Figura 3. Genoma de los <i>Potyvirus</i>	15
Figura 4. Infección de <i>Potyvirus</i>	17
Figura 5. Posible modelo de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) en plantas...	20
Figura 6. Proteínas codificadas por los dos tipos de ARNm de bZIP60.	21
Figura 7. Estructura de las proteínas AtbZIP17 y AtbZIP28.....	23
Figura 8. Tolerancia al estrés por calor mediado a través del atanogen 7 asociado a Bcl-2 en <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtBAG7)	26
Figura 9. Semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
Figura 10. Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de dos semanas de crecimiento.	30
Figura 11. Plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> de cuatro semanas de crecimiento.....	30
Figura 12. Agroinfiltración en <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Figura 13. Lisis del tejido foliar.....	32
Figura 14. Ensamblaje del sánduche para la electro-transferencia de proteínas.	34
Figura 15. Infección local de PIAMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip17</i> , <i>bzip28</i> y/o <i>bzip60</i>	38
Figura 16. Porcentaje de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip</i> con presencia de infección sistémica causada por PIAMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.....	39
Figura 17. Infección sistémica de PIAMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip</i>	41
Figura 18. Infección local de TuMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip17</i> , <i>bzip28</i> y/o <i>bzip60</i>	43
Figura 19. Porcentaje de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip</i> con presencia de infección sistémica causada por TuMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.....	44

Figura 20. Infección sistémica de TuMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bzip</i>	46
Figura 21. Infección local de PIAMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	49
Figura 22. Porcentaje de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i> con presencia de infección sistémica causada por PIAMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.....	50
Figura 23. Infección sistémica de PIAMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	51
Figura 24. Infección local de TuMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag 6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	52
Figura 25. Porcentaje de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i> con presencia de infección sistémica causada por TuMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.....	53
Figura 26. Infección sistémica de TuMV-GFP en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes de los genes <i>bag6</i> , <i>bag7</i> y <i>skp1</i>	55

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Composición del gel separador.....	33
Tabla 2. Composición del gel concentrador.	33

LISTADO DE ABREVIATURAS

A: Amperio

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

bp: Pares de bases

C(-): Control negativo

CP: Cubierta viral

dpi: Días post inoculación

ER: Retículo endoplasmático

GFP: Proteína fluorescente verde

kDa: kilo Dalton

M: Molar

mA: Miliamperio

mM: Millimolar

n: Tamaño muestra

NC_{Int}: Nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a Col O

p: Valor p (medida estadística)

PCD: Muerte celular programada

PIAMV: *Plantago asiatica mosaic virus*

TuMV: *Turnip mosaic virus*

μL: Microlitros

UPR: Respuesta a las proteínas mal plegadas

UV: Ultravioleta

RESUMEN

Los virus de ARN de cadena simple positiva colocan una gran carga biosintética en el retículo endoplasmático (ER) para la producción de proteínas virales y celulares necesarias para su replicación y movimiento. Esto incrementa la acumulación de proteínas malformadas en el ER y desencadena la activación de la respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR). El objetivo de la UPR es reestablecer la homeostasis para aliviar el estrés del ER a través de sensores que detectan las proteínas mal plegadas e inducen genes necesarios para mejorar la capacidad de plegamiento proteico del ER. Sin embargo, el estrés crónico del ER que no puede ser resuelto por la UPR, puede conducir a la muerte celular programada (PCD). En esta investigación, se combinaron análisis cualitativos mediante fotografías que demostraban la infección visible de PIAMV o TuMV monitoreada a través de la proteína verde fluorescente (GFP), y análisis cuantitativos de la intensidad de fluorescencia del área de las hojas infectadas en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del ER. Se observó que bZIP60 y BAG7 son factores del huésped que limitan la infección tanto de PIAMV como de TuMV, mientras que bZIP17 y SKP1 son factores específicos que restringen la infección de PIAMV, y bZIP28 restringe únicamente la infección de TuMV. Estos resultados revelaron que la eliminación de los sensores del estrés del ER permite una mayor acumulación de PIAMV o TuMV, indicando que el mecanismo de la UPR proporciona protección contra la infección viral en *Arabidopsis thaliana*.

PALABRAS CLAVE:

- UPR
- SENSORES DE ESTRÉS DEL ER
- *Arabidopsis thaliana*
- PIAMV
- TuMV

ABSTRACT

Positive strand RNA viruses deposit a huge biosynthetic burden on the endoplasmic reticulum (ER) to produce cellular and viral proteins needed for its replication and movement. The malformed proteins accumulation on the ER triggers the unfolded protein response (UPR). The UPR is activated to re-establish ER homeostasis by stress sensors which detect unfolded proteins and induce genes needed to improve the ER protein folding capability. However, severe ER stress that cannot be solved by overexpression of UPR can lead to the programmed cell death (PCD). In this research, it was combined qualitative analysis through photographs that showed visible PIAMV or TuMV infection monitored by the green fluorescent protein (GFP), and quantitative analysis of the fluorescence intensity of infected leaf area in *Arabidopsis thaliana* plants defective for ER stress genes. It was observed that bZIP60 and BAG7 are host factors which restrict PIAMV and TuMV infection, bZIP17 and SKP1 are specific factors that limit PIAMV infection, and bZIP28 restrict TuMV infection. These data revealed ER stress sensors suppression led to greater PIAMV or TuMV accumulation, showing UPR machinery provide some protection against virus infection in *Arabidopsis thaliana* plants.

KEY WORDS:

- UPR
- ER STRESS SENSORS
- *Arabidopsis thaliana*,
- PIAMV
- TuMV

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El retículo endoplasmático (ER) y el aparato de Golgi forman un complejo sistema de membranas celulares conectadas por túbulos y vesículas que alcanzan varios orgánulos en la célula vegetal, extendiéndose desde el núcleo a través de los plasmodesmos (Hamada et al., 2012; Kriechbaumer et al., 2015; Snyder & Stefano 2015; Zhang, Vjestica, & Oliferenko, 2012). El ER lleva a cabo diferentes funciones, incluyendo la regulación de la muerte celular, síntesis y plegamiento de proteínas, síntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio (Arias Gaguancela et al., 2016).

Factores bióticos, como patógenos, o factores abióticos, como la temperatura, salinidad y sequedad ambiental, pueden producir alteración en la morfología del ER, perturbación en la homeostasis de calcio y un incremento en la síntesis de proteínas (Bray 2004; Deng et al., 2011; Guillemette, Calmes, & Simoneau, 2014; Liu, Srivastava, Che, & Howell, 2007b; Verchot, 2016; Ye, Dickman, Whitham, Payton, & Verchot, 2011). Esta alteración de la homeostasis celular provoca la acumulación de proteínas mal formadas en el ER y desencadena la activación de la respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR: *unfolded protein response*) (Arias Gaguancela et al., 2016; Moreno et al., 2012; Verchot, 2014b, 2016; Ye, Chen, Payton, Dickman, & Verchot, 2013).

La UPR es un mecanismo celular en el cual las proteínas mal plegadas son reconocidas por sensores de estrés que se encuentran en la bicapa lipídica del ER e inician una cascada de señalización que activa la expresión de genes necesarios para mejorar la capacidad de plegamiento proteico del retículo endoplasmático, logrando así el restablecimiento de la homeostasis celular (Ruberti, Kim, Stefano, & Brandizzi, 2015). Aquellas proteínas que no lograron plegarse adecuadamente se eliminan del ER para su posterior degradación a través del proteasoma o la maquinaria de la autofagia. Se conoce también que el estrés crónico del ER que no puede ser resuelto a través del incremento de la UPR puede conducir a la muerte celular programada (PCD: *Programmed cell death*)

(Adamakis, Panteris, & Eleftheriou, 2011; Benali-Furet et al., 2005; Williams, Verchot, & Dickman, 2014).

El estrés del retículo endoplasmático y la UPR en animales y levaduras ha sido ampliamente estudiado, a diferencia de lo que sucede en plantas (Kørner, Du, Vollmer, & Pajeroska-Mukhtar, 2015; Oikawa, Tokuda, Hosoda, & Iwawaki, 2010; Schröder & Kaufman, 2005). Sin embargo, en los últimos años, el estudio del estrés del ER y la UPR en células vegetales se ha vuelto de vital importancia para el mejoramiento genético en los cultivos (Wan & Jiang, 2016).

En animales se ha determinado tres rutas metabólicas de la UPR (Schröder & Kaufman, 2005), sin embargo únicamente el factor de transcripción activador 6 asociado a la membrana del ER (ATF6) y la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1: *inositol-requiring protein 1*) son rutas homólogas en plantas (Ruberti & Brandizzi, 2014; Wan & Jiang, 2016). Es así que se han identificado genes homólogos para el gen *atf6* en plantas de *Arabidopsis thaliana*, denominados *Atbzip17* y *Atbzip28* que codifican factores de transcripción bZIP (*Basic Leucine Zipper*) con similar función y mecanismo que ATF6 (Liu et al., 2007a, 2007b). También existen reportes de la existencia de genes homólogos de *ire1* en plantas como *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, y *Zea mays* (Koizumi et al., 2001; Li, Humbert & Howell 2012; Noh & Kwon, 2002; Okushima et al., 2002).

En comparación con el conocimiento que se tiene acerca de cómo la UPR protege a las células vegetales, menos se conoce sobre la conexión que puede existir entre la UPR y la PCD (Tabas & Ron, 2011). Sin embargo, en investigaciones recientes se han logrado identificar algunos reguladores de la PCD inducida por estrés del ER en plantas modelo, por ejemplo: el factor de transcripción asociado a la membrana del ER denominado NAC089 (Yang et al., 2014), el atanogen 7 asociado a Bcl-2 (*B-cell lymphoma2*) conocido como BAG 7 (Li, Williams, & Dickman, 2016; Williams, Kabbage, Britt, & Dickman, 2010) y SKP1 (Ye et al., 2011).

1.2 Justificación del problema

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cultivos principales debido a su alto valor nutritivo, ocupa el cuarto lugar mundial en importancia como alimento, después del maíz, el trigo y el arroz. A nivel comercial, la papa se propaga vegetativamente a través de tubérculos que pueden ser atacados fácilmente por una serie de plagas y enfermedades (FAO, 2008).

Los virus son agentes patógenos que pueden atacar a los cultivos de papa. Entre los más comunes se pueden mencionar a los siguientes: el virus Y de la papa (PVY) del género *Potyvirus*, el virus X de la papa (PVX) del género *Potexvirus*, el virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV) del género *Luteovirus*, entre otros (Burrows & Zitter, 2005).

El manejo inadecuado de las enfermedades virales en los cultivos de papa podría alcanzar niveles devastadores dentro de pocos años, es por ello que el mejoramiento del germoplasma reduciría el impacto que las enfermedades virales causan en el rendimiento y comercialización de la papa (Verchot, 2014a).

El conocimiento del rol que desempeña la UPR en las infecciones virales en plantas podría facilitar el desarrollo de nuevas estrategias biotecnológicas que logren limitar la propagación de los virus en las plantas y que además permitan identificar nuevos componentes celulares útiles para el mejoramiento de los cultivos agrícolas (Wan & Jiang, 2016; Ye et al., 2013).

Los virus de ARN de cadena positiva como *Potexvirus* y *Potyvirus* que infectan a las plantas son modelos únicos para el estudio de la dinámica del retículo endoplasmático, ya que causan expansión y reordenamiento de sus membranas para construir ambientes necesarios de almacenamiento de complejos de replicación viral. Además, colocan una enorme carga biosintética en el ER para la producción de proteínas virales y celulares, incrementando la acumulación de proteínas malformadas y activando la UPR (Verchot, 2016).

Arabidopsis thaliana es una planta modelo debido a que su genoma se encuentra totalmente secuenciado y a la disponibilidad de mutantes que permiten análisis detallados acerca de las cascadas de señalización celular, obteniéndose resultados que pueden ser transferidos a diferentes cultivos económicamente importantes (Piquerez, Harvey, Beynon, & Ntoukakis, 2014). Varias investigaciones han empleado *Arabidopsis thaliana* para elucidar las cascadas de regulación de genes relacionados al estrés celular. Por ejemplo, se han analizado algunos factores de transcripción de las familias NAC y bZIP involucrados en respuestas moleculares de plantas frente al estrés causado por factores bióticos y abióticos (Arias Gaguancela et al., 2016; Deng, Srivastava, & Howell, 2013; Liu et al., 2007b; Nakashima, Takasaki, Mizoi, Shinozaki, & Yamaguchi-Shinozaki, 2012; Sun et al., 2013; Wang et al., 2009). Recientemente, los factores de transcripción NAC han sido caracterizados en *Solanum tuberosum*, gracias a investigaciones previas que determinaron su funcionalidad en *Arabidopsis thaliana* (Tian, Traw, Chen, Kreitman & Bergelson, 2003; Singh, Sharma, Pal, Acharya & Ahuja, 2013).

Debido a que la UPR es la maquinaria principal que controla la homeostasis en el ER, se cree que la expansión, reordenamiento y el estrés del ER están relacionados y controlados por ella (Verchot, 2016). Aunque se han realizado grandes avances en investigaciones relacionadas a las cascadas de señalización del estrés del retículo endoplasmático en plantas, aún no se conoce el mecanismo y los componentes exactos involucrados en esta vía (Kørner et al., 2015). Por lo tanto, el desafío es descubrir si los virus usan la maquinaria de la UPR para la infección o si la maquinaria de la UPR es un componente de la adaptación celular y de las respuestas de defensa para asegurar la viabilidad celular frente a la infección viral (Ye et al., 2013).

Uno de los proyectos que actualmente se encuentra financiando el Instituto Nacional de Alimentos y Agricultura (NIFA) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) busca traducir la información de los mecanismos de regulación celular durante el estrés del ER, provocado por una infección viral, en herramientas que permitan el mejoramiento del germoplasma en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), con el fin de reducir el impacto de las enfermedades virales en su rendimiento y

comercialización (Verchot, 2014a). Es por ello, que en el presente proyecto de tesis se plantea evaluar la propagación local y sistémica de PIAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la propagación de PIAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático.

1.3.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la acumulación local de PIAMV y TuMV en hojas de *Arabidopsis thaliana* knock out para los genes *bzip17*, *bzip28*, *bzip60*, *bzip60/17*, *bzip60/28*, *bag6*, *bag7* y *skp1*.
- Monitorear la infección sistémica de PIAMV y TuMV en plantas de *Arabidopsis thaliana* knock out para los genes *bzip17*, *bzip28*, *bzip60*, *bzip60/17*, *bzip60/28*, *bag6*, *bag7* y *skp1*.

CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Los virus en las plantas

Los virus son parásitos intracelulares obligados que se replican únicamente después de infectar una célula huésped. Pueden ser clasificados según el tipo de ácido nucleico que constituye su genoma, es decir, ADN o ARN. En plantas, existen virus con ADN monocatenario (ADNss), ADN bicatenario (ADNds), ARN monocatenario negativo (ARNss (-)), ARN bicatenario (ARNds), sin embargo, la mayoría de virus en plantas presentan un genoma de ARN monocatenario positivo: ARNss (+) (Laliberté, Sanfaçon, & Sanfaçon, 2010).

La síntesis de proteínas virales, la replicación y la propagación célula a célula son mecanismos esenciales para el éxito de la infección viral, para ello se requiere de interacciones específicas entre el virus y la maquinaria celular del huésped (Ahluquist, 2006; Hwang, McCartney, Gidda, & Mullen, 2008; Park, Jeong, & Kim, 2014).

En el caso de los virus de ARNss (+), la síntesis de proteínas virales se inicia inmediatamente después de que su genoma es colocado en el citoplasma de la célula huésped. Este grupo de virus presenta genomas cortos por lo que codifican de tres a diez proteínas aproximadamente (Jiang & Laliberté, 2016). Por ejemplo, el genoma de TMV (*Tobacco mosaic virus*) codifica cuatro proteínas: dos asociadas a la replicasa viral, la proteína de movimiento y la proteína de cubierta viral, que cooperan con algunos componentes de la célula huésped para lograr una infección exitosa (Liu & Nelson, 2013).

Los virus de ARN de cadena simple positiva son considerados como modelos especiales para el estudio de las rutas metabólicas involucradas en el estrés del retículo endoplasmático (Verchot, 2016) ya que, colocan una enorme carga biosintética en este organelo y su membrana actúa como una plataforma física para la replicación y movimiento (Laliberté & Sanfaçon, 2010).

Por ejemplo, en el BMV (*Brome mosaic virus*) del género *Bromovirus*, las proteínas de replicación viral se insertan intencionalmente dentro de las membranas del ER, provocando así cambios en la morfología de la membrana (Diaz, Gallei, & Ahlquist, 2012). De manera similar, se ha demostrado que las interacciones físicas del ER con las proteínas virales de GFLV (*Grapevine fanleaf virus*), CPMV (*Cowpea mosaic virus*), RCNMV (*Red clover necrotic mosaic virus*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), virus del género *Potexvirus* y *Potyvirus* producen alteraciones en la arquitectura del ER a través de la formación de vesículas, expansión y/o invaginación de sus membranas. (Carette, Stuiver, Van Lent, Wellink, & Van Kammen, 2000; Grangeon et al., 2013; Heinlein et al., 1998; Ritzenthaler et al., 2002; Park, Jeong, & Kim, 2014; Turner, Sit, Callaway, Allen, & Lommel, 2004; Verchot, 2016). Dichos estudios sugieren que los cambios en la arquitectura del ER podrían llevarse a cabo ya sea para asegurar el correcto funcionamiento de este organelo o para satisfacer la necesidad de crear dominios especiales del ER que permitan secuestrar procesos virales de las defensas de la célula huésped y así permitir la propagación viral (Verchot, 2016).

2.1.1 Movimiento del virus en la planta

Una vez que el virus ha entrado a la planta huésped, empieza a replicarse en las primeras células con ayuda de la maquinaria celular. A continuación, el virus se propaga en toda la planta en varias etapas (Figura 1), incluyendo 1) el movimiento célula a célula, en el que la infección por viriones o complejos de ribo nucleoproteína se disemina de forma local a través de los plasmodesmos, y 2) el movimiento a larga distancia, en el que la infección se extiende de forma sistémica a través del tejido vascular y puede transportarse dentro y entre las hojas (Dolja, McBride, & Carrington, 1992; Seo & Kim, 2016).

El movimiento de corta distancia o célula a célula empieza después de que el virus entra a la planta huésped, principalmente por células de la epidermis o del mesófilo, entonces continúa su propagación por las células del parénquima y las células de la vaina fascicular a través de los plasmodesmos (Revers & García, 2015). Para ello, ciertas

proteínas virales son necesarias por ejemplo, las proteínas TGB codificadas por los *Potexvirus* o las proteínas HC-Pro, VPg, CI, P3N-PIPO y CP que interactúan entre sí para permitir el transporte de los *Potyvirus* (Ivanov, Eskelin, Lo, & Ma, 2014; Verchot-lubicz et al., 2010; Vijayapalani, Maeshima, Nagasaki-takekuchi, & Miller, 2012).

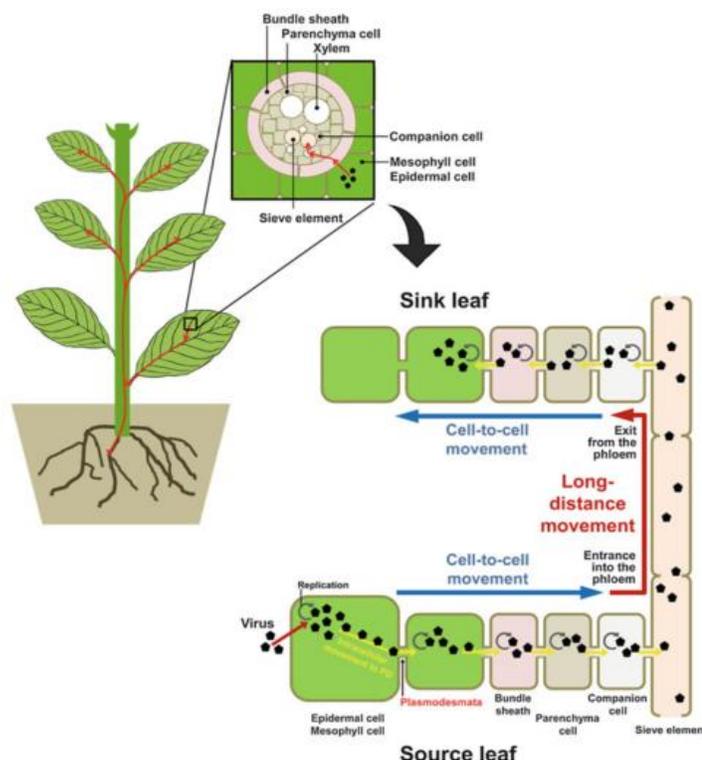


Figura 1. Movimiento del virus en las células de las plantas. Fuente: (Seo & Kim, 2016).

Nota: Después de la entrada del virus a la célula huésped, principalmente célula de la epidermis o mesófilo, los virus replican sus genomas. Los genomas virales interactúan con proteínas virales y/o factores de la célula huésped para formar complejos de movimiento viral (viriones o complejos de RNP). Estos complejos son entonces transportados desde el sitio de replicación hacia los plasmodesmos mediante el sistema de transporte intracelular del huésped. La replicación de virus y el movimiento célula a célula continúa a través de los tejidos asociados a la vasculatura (vainas fasciculares, parénquima, y células acompañantes). Los complejos de movimiento viral son cargados dentro de elementos cribosos para el transporte pasivo y a larga distancia dentro del floema. La invasión de las células sistémicas distantes comienza por la descarga del virus desde los elementos cribosos en las células acompañantes, continúa con la replicación y el movimiento célula a célula a través de la vaina fascicular y las células del mesófilo.

Después de movilizarse a través de varios tipos de células (epidermis, mesófilo, parénquima, células de la vaina fascicular), los virus son cargados en elementos cribosos

(SE:*sieve elements*) dentro del sistema vascular, usualmente del floema, para continuar con el transporte a larga distancia, el mismo que permitirá la propagación de la infección sistémica en toda planta (Hipper, Brault, Ziegler-Graff, & Revers, 2013; Seo & Kim, 2016).

2.1.2 Potexvirus

Según el Comité Internacional de la Taxonomía de Virus (ICTV, 2016), el género *Potexvirus* pertenece a uno de los siete géneros de la familia *Alphaflexiviridae* y actualmente cuenta con 35 especies conocidas, entre ellas PVX (*Potato virus X*) y PIAMV (*Plantago asiatica mosaic virus*) (ICTV, 2016). El genoma de los virus de este género es monopartita, constituido por un ARNss (+) linear. Sus viriones presentan simetría helicoidal, son filamentosos y flexibles de 13 nm de diámetro y 470-580 nm de largo (Meng & Lee, 2017).

Los virus del género *Potexvirus* son patógenos de plantas herbáceas, las cuales involucran especies con un impacto económico importante como la papa (*Solanum tuberosum*) y especies de plantas modelo usadas en ensayos científicos como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* (Burrows & Zitter, 2005; Janda et al., 2015; Martelli, Adams, Kreuze, & Dolja, 2007; Ryu & Hong, 2009).

Se puede transmitir de forma mecánica y su distribución geográfica se restringe a ciertas partes del mundo, ya que la mayoría de *Potexvirus* se encuentran en lugares donde crecen sus plantas huésped. Los síntomas que presentan las plantas infectadas con dichos virus pueden ser mosaicos, necrosis, manchas en anillo y/o enanismo (Ryu & Hong, 2009).

2.1.2.1 Genoma

Los miembros de este género contienen en su genoma cinco marcos de lectura (ORFs: *open reading frames*), el extremo 3' contiene una cola de poli(A) y el extremo 5' tiene un cap 7-metil-guanosina (Ryu & Hong, 2009). En base a la similaridad de la secuencia de aminoácidos entre PIAMV, PVX y otros miembros bien estudiados de

Potexvirus, ORF1 codifica la ARN polimerasa viral dependiente de ARN (RdRp) y ORF5 codifica la proteína de cubierta viral (CP), cuya región N-terminal es necesaria para el movimiento del virus célula a célula (Komatsu et al., 2011; Ozeki et al., 2009). Los tres ORFs solapados en la región central del genoma, ORFs 2-4, forman las proteínas de movimiento (TGB: *Triple gene block*) TGB1, TGB2, y TGB3, respectivamente (Komatsu et al., 2011). Los ORFs 2-5 son expresados a través de la producción y posterior traducción de tres secuencias de ARNm subgenómico (ARNsg) (Figura 2) (King, Lefkowitz, Adams, & Carstens, 2012; Verchot, Angell, & Baulcombe, 1998).

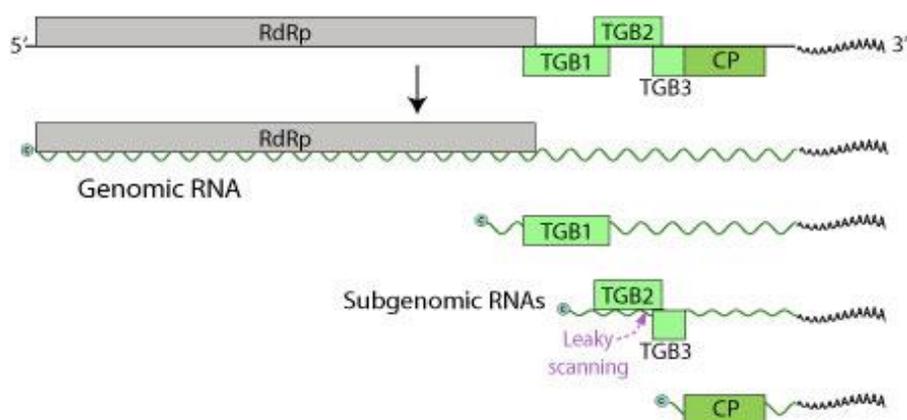


Figura 2. Genoma de los *Potexvirus*. Fuente: (ViralZone, 2008. Con derecho de copia de SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

Nota: ARN genómico y tres ARN subgenómicos que codifican cinco proteínas: ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), TGB1, TGB2, TGB3 y la cubierta viral (CP).

TGB1 presenta un motivo de unión a NTP conservado y es una proteína multifuncional, ya que tiene actividad ARN helicasa, actividad supresora del silenciamiento de ARN (necesaria para el movimiento del virus) y es activador de la traducción (Atabekov, Rodionova, Karpova, Kozlovsky, & Poljakov, 2000; Kalinina, Rakitina, Solovyev, Schiemann, & Morozov, 2002; Komatsu et al., 2008; Voinnet, Lederer, & Baulcombe, 2000). TGB2 y TGB3 son proteínas integrales de la membrana del ER, la primera tiene dos dominios transmembrana hidrofóbicos conservados y la segunda solo uno (Komatsu et al., 2011).

2.1.2.2 Ciclo viral

De manera general, el ciclo de infección de los virus de ARNss (+), cuyo genoma tiene el mismo sentido que el ARNm de la célula huésped y por tanto funciona como tal, inicia con la invasión de la planta huésped a través de daño mecánico o por vectores. Una vez adentro del citoplasma, el virus remueve su cubierta y empieza la traducción del genoma viral con ayuda de la maquinaria celular para producir la polimerasa viral puesto que la mayoría de los virus de ARNss (+) no encapsulan su polimerasa, sino que solo contienen los genes para codificarla (Ahlquist, Noueiry, Lee, Kushner, & Dye, 2003). Una vez producida la polimerasa viral, se empieza la replicación del genoma, la traducción de proteínas, el movimiento célula a célula a través de los plasmodesmos, la propagación sistémica en toda la planta y finalmente la transmisión a otras plantas no infectadas (Goldbach et al., 1994).

En el caso de los *Potexvirus*, el primer paso de la infección sucede cuando el virión se desensambla en el citoplasma celular, liberando así el ARN viral (ARNv). Inmediatamente, los ribosomas de la célula huésped son utilizados para la traducción de la RdRp (Park et al., 2014). En la estructura del ER, la RdRp junto con elementos de la maquinaria celular forman el complejo de replicación viral (VRC: *viral replication complex*) que posteriormente sintetiza (1) ARNv (-) a partir del ARNv (+) y (2) ARNv (+) o ARNsg a partir del ARNv (-) previamente sintetizado (K. Kim & Hemenway, 1999; Park et al., 2014). A continuación, las proteínas TGB1, TGB2 y TGB3 se traducen a partir de los dos primeros ARNsg sintetizados, mientras que la CP es traducida por el tercer ARNsg (Johnson et al., 2003; Tilsner et al., 2013). Estas proteínas serán usadas para el ensamblaje de la progenie viral y su posterior movimiento a través de los plasmodesmos en las células no infectadas (Park et al., 2014).

2.1.2.3 Movimiento célula a célula

Como se mencionó anteriormente, el movimiento célula a célula del ARNv de los virus pertenecientes al género *Potexvirus*, requiere de las tres proteínas TGB y de la CP. Después de la replicación del ARNv (+), este es convertido a una forma de ARNv

fácilmente transportable a través de los plasmodesmos, gracias a la proteína TGB1, para así permitir el movimiento del virus dentro de la célula huésped (Park et al., 2014). Para ello, uno de los modelos propuestos por Tilsner et al. (2013) y Verchot-Lubicz et al. (2010), menciona la formación de un complejo de movimiento de ribonucleoproteína (RNP), el cual involucra la asociación de TGB1 con el extremo 5' del ARNv revestido con subunidades de CP. La unión de TGB1 produce la separación de CP del ARNv (+), permitiendo así la liberación del ARNv (+). Después, la replicasa permite la síntesis del ARNv (-), a partir del ARNv (+) liberado, que posteriormente servirá como plantilla para la síntesis de más ARNv (+). Finalmente, los ribosomas se unen a los nuevos ARNv (+) para su traducción a proteínas (Tilsner et al., 2013; Verchot-lubicz et al., 2010).

En cuanto al rol que desempeñan las proteínas TGB2 y TGB3 en el movimiento del ARNv, se conoce que el complejo de movimiento de RNP podría ser transportado por vesículas granulares derivadas del ER, inducidas por TGB2 y dirigidas por TGB3 (Verchot-lubicz et al., 2010). Dichas vesículas granulares se alinean en los filamentos de actina para organizar y conducir el complejo de movimiento de RNP, a través de los plasmodesmos (Schoelz et al., 2011; Park et al., 2014; Tilsner et al., 2013).

2.1.3 Potyvirus

El género *Potyvirus* pertenece a uno de los ocho géneros de la familia *Potyviridae*. Actualmente, cuenta con 160 especies conocidas, entre ellas PVY (*Potato virus Y*) y TuMV (*Turnip mosaic virus*) (ICTV, 2016). El genoma está formado por ARNss (+) linear, de aproximadamente 10kb de longitud (Heinlein, 2015). Sus viriones tienen simetría helicoidal y son filamentosos y flexibles de 680-900nm de largo y 11-13 nm de ancho (King, Adams, Carstens, & Lefkowitz, 2012).

Los *Potyvirus* representan uno de los grupos de virus en plantas más importantes desde el punto de vista económico (Ivanov et al., 2014). Son ampliamente distribuidos en todas las regiones del mundo en plantas de cultivo, como por ejemplo: la papa y el tabaco (Singh et al., 2008; Tian et al., 2011); Sin embargo, también se las encuentra abundantemente de forma salvaje en la naturaleza (Roossinck, 2012). Se pueden

transmitir mecánicamente o a través de vectores como los áfidos de manera no persistente (Ivanov et al., 2014).

De manera general, la expresión de los síntomas en las infecciones virales depende de la especie de virus, condiciones ambientales, nivel de resistencia y etapa de crecimiento de la planta (Mandal, 2014). Es así que los síntomas que pueden presentar las plantas infectadas con *Potyvirus* son: moteado amarillo, mosaico leve, necrosis, enanismo, moteado severo, entre otros (Cho, Choi, Kim, Kim, & Kim, 2003; Mandal, 2014).

2.1.3.1 Genoma

El genoma de los *Potyvirus* está formado por un ARNss (+) linear, cuyo extremo 5' está covalentemente unido a una proteína VPg (*viral protein genome-linked*) codificada por el propio patógeno y su extremo 3' se encuentra poliadenilado (Figura 3) (Ivanov et al., 2014). Este genoma codifica dos ORF, uno largo y otro relativamente pequeño. El ORF largo codifica para una poliproteína que es procesada por tres proteasas virales para generar 10 proteínas maduras (Cotton et al., 2009; Walsh & Jenner, 2002). En el caso específico de TuMV, las proteínas maduras generadas son: P1 (40 kDa), HC-Pro (*helper component protease*; 52 kDa), P3 (40 kDa), 6K1 (6 kDa), CI (*cytoplasmic/cylindrical inclusión protein*; 72 kDa), 6K2 (6 kDa), VPg (22 kDa), NIa (*nuclear inclusion a*; 27 kDa), NIB (*nuclear inclusion protein b*; 60 kDa) y CP (33 kDa) (Walsh & Jenner, 2002). Mientras que, el ORF pequeño, que resulta del desplazamiento de la ARN polimerasa en la secuencia que codifica P3, sintetiza una sola proteína denominada P3N-PIPO (PIPO: *Pretty Interesting Potyvirus ORF*) (Chung, Miller, Atkins, & Firth, 2008; Cui & Wang, 2016).

Las proteínas P1 y HC-Pro, son dos proteinasas producidas a partir del amino terminal, ambas catalizan sus propios sitios de corte para liberarse de la poliproteína viral (Revers & García, 2015; Verchot, Koonin, & Carrington, 1991). P1 modula la replicación viral, mejora la supresión viral del silenciamiento de ARN mediado por HC-Pro e interactúa con las proteínas ribosómicas de la célula huésped (Martínez & Daròs, 2014;

Pasin F, Simón, & García, 2014; Rajamäki et al., 2005). HC-Pro está también involucrada en la supresión del silenciamiento de ARN y en el movimiento célula a célula (Shen., et, 2010; Yang et al., 2016). Además, es necesaria para el rendimiento, infectividad de la progenie viral y la transmisión por áfidos (Urcuqui-Inchima, Haenni, & Bernardi, 2001; Valli, Gallo, Calvo, Pérez, & García, 2014)

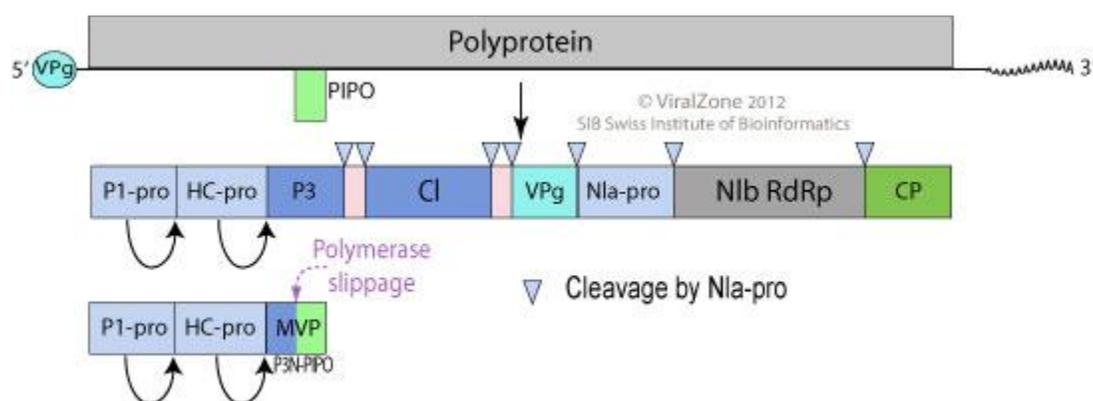


Figura 3. Genoma de los *Potyvirus*. Fuente: (ViralZone, 2012. Con derecho de copia de SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

Nota: ARNs (+) lineal, cuyo extremo 5' está covalentemente unido a una proteína VPg y su extremo 3' se encuentra poliadenilado. Codifica dos ORF, el primero sintetiza una poliproteína que posteriormente produce 10 proteínas maduras: P1, HC-Pro, P3, CI, VPg, NIa, NIb, CP, 6K1 y 6K2 (las dos últimas representadas en rectángulos rosados, respectivamente); y el segundo sintetiza a la proteína P3N-PIPO.

P3 interactúa con las proteínas virales CI, NIa y NIb, ya que se asocia con las inclusiones cilíndricas del citoplasma formadas por CI, así como con las inclusiones nucleares formadas por NIa y NIb (Langenberg & Zhang, 1997; Rodríguez-Cerezo, Ammar, Pirone, & Shaw, 1993). Adicionalmente, la región que codifica a P3 presenta un ORF embebido, el mismo que a través del cambio de marco de lectura ribosomal (*ribosomal frameshifting*) codifica la proteína P3N-PIPO (Chung et al., 2008). Una de las funciones de P3N-PIPO es el movimiento del virus célula a célula (Chung et al., 2008; Vijayapalani et al., 2012).

Con respecto a la proteína 6K1 se menciona que se encuentra involucrada en replicación viral (Cui & Wang, 2016). CI también está relacionada en la replicación del

ARN viral, ya que presenta actividad ARN helicasa y ATPasa (Fernández et al., 1997). Por su parte, 6K2 es una proteína asociada a membrana, permite la formación de vesícula derivadas del ER para la replicación y movimiento intracelular del ARN viral (Grangeon et al., 2013).

VPg está covalentemente unida al extremo 5' del ARN viral, participa en la replicación y movimiento viral (Urcuqui-Inchima et al., 2001). La proteína NIa presenta dos dominios: VPg amino terminal y el dominio con actividad proteasa cerca de su extremo C-terminal (NIaPro) (Martínez et al., 2016). La interacción entre ambos dominios permite un cambio estructural de VPg, y a su vez produce el incremento de la actividad ATPasa (Ivanov et al., 2014). NIaPro produce el corte en siete lugares del genoma 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb y CP (Adams, Antoniw, & Beaudoin, 2005). NIb es la replicasa (ARN polimerasa dependiente de ARN), responsable para la replicación del genoma viral (Daròs, Schaad, & Carrington, 1999). Finalmente, la CP ayuda en la encapsulación de los nuevos viriones (Revers & García, 2015).

2.1.3.2 Ciclo viral

Una vez adentro del citoplasma, el virus remueve su cubierta y empieza la traducción del genoma viral a través de los ribosomas de la célula huésped, obteniéndose así una poliproteína que posteriormente es procesada por las proteasas virales: P1 y HC-Pro que probablemente actúan solo en *cis* para catalizar sus propios sitios de corte y así se liberan de la poliproteína, mientras que la proteasa NIa-Pro actúan en *cis* y *trans* para poder escindir los siete sitios que permitirán la liberación de las demás proteínas virales (Adams et al., 2005; Ivanov et al., 2014).

Posteriormente, la formación de los VRCs es iniciada por la interacción de 6K2-VPg-Pro (Schaad, Jensen, & Carrington, 1997), dichos VRCs involucran a las vesículas formadas por 6K2 en el ER, ARNv y a las proteínas tanto virales (CI, 6K2, NIa, NIb, HC-Pro y P3) como del huésped (factor de la transcripción eIF[iso]4E) que se encuentran involucradas en la replicación viral (Beauchemin, Boutet, & Laliberté, 2007; Cotton et al., 2009; Grangeon et al., 2012; Ivanov et al., 2014). Dichas vesículas pueden moverse a

lo largo de los filamentos de actina hasta llegar a la pared celular y a los plasmodesmos, posiblemente con la ayuda de CI, VPg, CP y P3N-PIPO (Figura 4) (Grangeon et al., 2013; Ivanov et al., 2014).

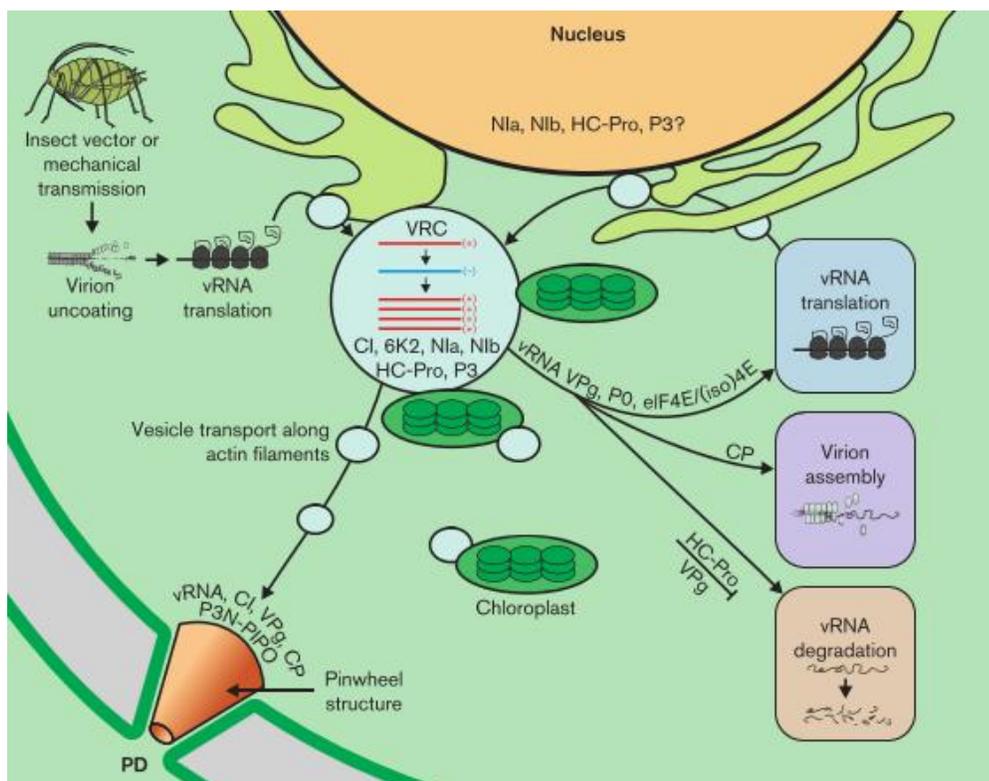


Figura 4. Infección de *Potyvirus*. Fuente: (Ivanov et al.,2014).

Nota: Los viriones filamentosos ingresan a la célula huésped. El virión remueve su cubierta y empieza la traducción del genoma viral a través de los ribosomas de la célula huésped para producir una poliproteína que es posteriormente procesada por tres proteasas virales. Al menos, seis proteínas virales, CI, 6K2, NIa, NIb, HC-Pro y P3, están involucradas en la replicación viral. Los *Potyvirus* ensamblan sus complejos de replicación (VRC) dentro de vesículas membranosas localizadas en los sitios de salida del ER (ERES), usando para ello los componentes de la ruta secretora celular. Las vesículas virales se transportan a lo largo de los filamentos de actina hacia la pared celular y a los plasmodesmos (PD). Al menos cuatro proteínas virales, CI, VPg, CP y P3N-PIPO, podrían participar en el movimiento del virus para transportarlo célula a célula a través de los PD, dicho movimiento involucra la formación de estructuras cónicas asociadas a los PD. En etapas posteriores de la infección, las vesículas se fusionan con las membranas de los cloroplastos, formando estructuras globulares perinucleares. El vRNA derivado del VRC puede traducirse e incorporarse dentro de la progenie de los VRCs, permitiendo así que el vRNA participe en los nuevos eventos de replicación viral. El vRNA viral también puede ser incorporado dentro de los viriones o puede pasar a las rutas de degradación.

2.1.3.3 Movimiento célula a célula

Uno de los modelos para el movimiento célula a célula de los *Potyvirus* sugiere que, las moléculas nuevas de ARNv, sintetizadas en los VRCs, junto con la CP pueden formar viriones o complejos de RNP (Wei et al., 2010). Por otra parte, CI forma un complejo proteico con P3N-PIPO (CI/P3N-PIPO), producido en las membranas del ER de la estructura perinuclear inducida por el virus, este complejo que transporta al VRC permite dirigirlo a lo largo de los filamentos de actina hasta los plasmodesmos (Cotton et al., 2009; Revers & García, 2015; Wei et al., 2010). Dicho complejo de movimiento viral puede anclarse a los plasmodesmos, gracias a una proteína de la célula huésped denominada PCaP1, la misma que se une a P3N-PIPO (Vijayapalani et al., 2012). El complejo CI/P3N-PIPO/PCaP1 se acopla a otras moléculas de CI para formar estructuras cónicas asociadas a los plasmodesmos y así facilitar el movimiento del complejo de RNP o del virión hacia las células vecinas (Revers & García, 2015).

2.2 Estrés del retículo endoplasmático

En células eucariotas, el retículo endoplasmático (ER) es el principal sitio de síntesis y procesamiento de proteínas (Schröder & Kaufman, 2005). Distintos factores ambientales, fisiológicos y patológicos; como por ejemplo, altas temperaturas, salinidad, pérdida de calcio, inhibición de la formación de enlaces disulfuro, mutaciones genéticas e infecciones por virus u otros patógenos pueden alterar la homeostasis en el ER, ya que provocan acumulación de proteínas mal formadas, generando una condición llamada estrés del retículo endoplasmático, la cual activa la UPR (Duwi Fanata, Lee, & Lee, 2013; Liu & Howell, 2016).

Generalmente, los virus de ARN de cadena simple positiva alteran la forma física y la composición lipídica y proteica del ER para crear ambientes que faciliten la replicación viral (Ye et al., 2013). Este tipo de virus coloca una gran carga biosintética en el ER para producir proteínas virales y celulares, con ello se incrementa la posibilidad de acumular proteínas mal formadas en la célula que alteran la homeostasis y desencadenan

el estrés del ER (Verchot, 2016; Ye et al., 2013). Para restablecer la homeostasis, las células vegetales necesitan reconstruir el equilibrio entre la capacidad y la demanda del plegamiento de proteínas a través de la UPR (Wan & Jiang, 2016). Sin embargo, cuando el estrés es severo y no puede ser resuelto por la sobrerregulación de la UPR, se da paso a la muerte celular programada (PCD) (Williams et al., 2014; Yang et al., 2014).

2.2.1 Respuesta de las proteínas mal plegadas

La UPR es una respuesta altamente conservada en eucariotas que promueve la supervivencia celular (Yang et al., 2014). El estrés del ER causado por factores bióticos o abióticos produce una acumulación tóxica de proteínas mal plegadas que activa la UPR para restablecer la homeostasis del ER (Verchot, 2014a).

La UPR alivia el estrés del ER: (1) aumentando la expresión de genes que codifican chaperonas para facilitar el plegamiento de las proteínas en el ER; (2) acelerando la eliminación de las proteínas mal plegadas a través del incremento en la síntesis de elementos de la vía de degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD: *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*); y (3) disminuyendo la síntesis de proteínas con el fin de aligerar la cantidad de proteínas mal plegadas en el ER (Tsai & Weissman, 2010).

La respuesta de las proteínas mal plegadas ha sido más investigada en células de mamíferos y levaduras, que en células vegetales. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado en las plantas dos rutas metabólicas que son homólogas en mamíferos y que pueden activarse con factores bióticos o abióticos. La primera está dirigida por la enzima dependiente de inositol 1 (IRE1: *inositol-requiring protein 1*) que regula la expresión del factor de transcripción bZIP60 (bZIP: *Basic Leucine Zipper*) y la segunda está mediada por los factores de transcripción bZIP17/bZIP28 (Figura 5) (Wan & Jiang, 2016). Estos factores de transcripción se translocan al núcleo cuando el ER se encuentra bajo estrés, allí forman homodímeros o heterodímeros para unirse al elemento ERSE (*ER stress response element*) o P-UPRE (*plant-specific unfolded protein response element*) que se encuentra en los promotores, aumentando así la expresión de genes que permiten

codificar chaperonas y factores de degradación y plegamiento proteico (Iwata & Koizumi, 2005; Liu & Howell, 2016).

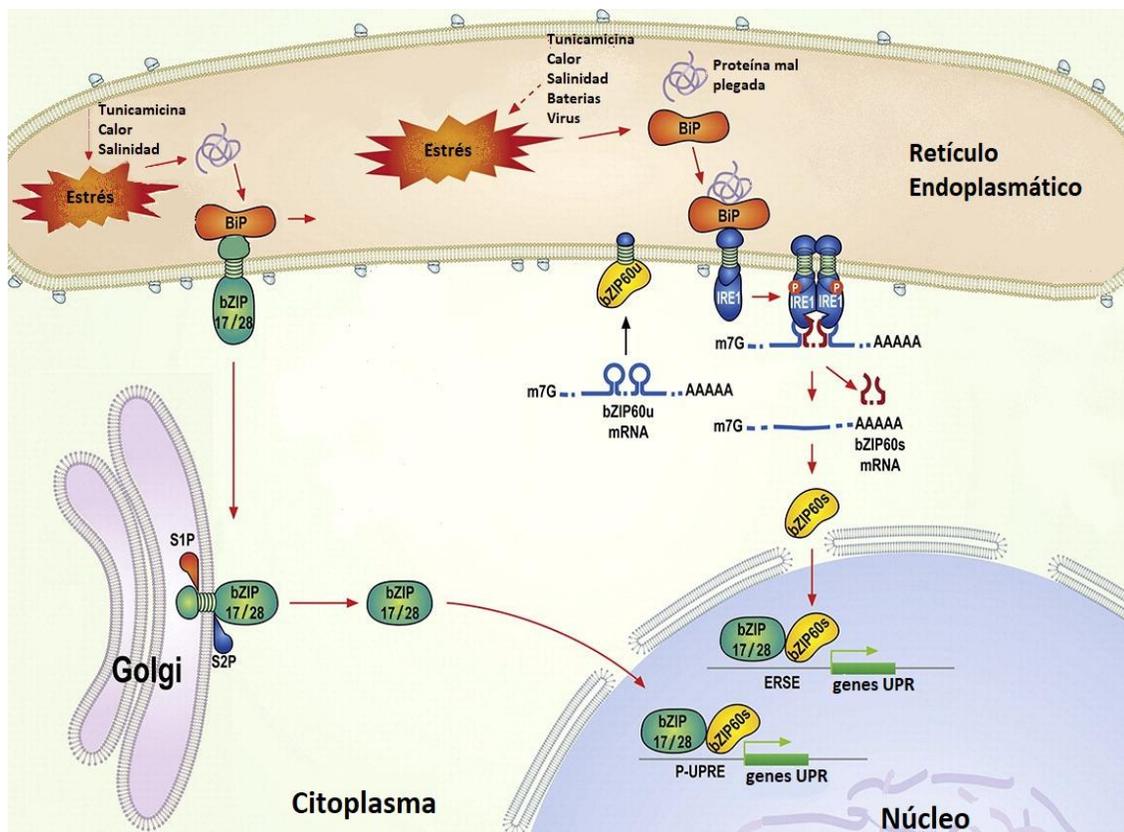


Figura 5. Posible modelo de la respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR) en plantas.

Fuente: (Duwi Fanata et al., 2013). Adaptada por Vásquez.

Nota: Bajo condiciones que promueven el estrés del ER, IRE1 se activa por autofosforilación y dimerización. La proteína IRE1 activa, permite el *splicing* no convencional del ARNm de bZIP60, esto codifica una proteína sin el dominio transmembrana denominada bZIP60s (bZIP60 *spliced*), la cual se moviliza al núcleo. El estrés del ER también promueve la movilización de los factores de transcripción bZIP17 o bZIP28 hacia el aparato de Golgi, una vez que se disocian de la proteína BiP (*immunoglobulin-binding protein*). En el aparato de Golgi las proteasas S1P y S2P modifican a bZIP17/bZIP28 para liberar su dominio citosólico N-terminal, convirtiéndose en un factor de transcripción bZIP funcional que se dirige al núcleo. Los factores de ambas rutas metabólicas son llevados al núcleo celular, allí pueden formar homodímeros o heterodímeros que se unen a elementos ERSE o P-UPRE en los promotores e inducen la expresión de genes relacionados a la UPR.

2.2.1.1 Enzima Dependiente de Inositol 1 (IRE1)

IRE1 es una proteína del tipo receptor transmembrana localizada en la membrana del ER con un dominio citosólico con actividad quinasa/ribonucleasa y un dominio

sensor del estrés del ER localizado en el lumen (Chen & Brandizzi, 2013a). En el caso de las plantas como *Arabidopsis thaliana*, se codifican dos copias homólogas de IRE1: IRE1a y IRE1b las cuales se localizan en el espacio perinuclear del ER (Moreno et al., 2012), ambas proteínas son responsables del *splicing* no convencional del ARNm de *bzip60* (Duwi Fanata et al., 2013).

En *Arabidopsis thaliana*, IRE 1 es considerado como un sensor de estrés del ER, actúa con las proteínas malformadas y posteriormente se activa para realizar el *splicing* del ARNm de *bzip60* en el citoplasma, proceso en el que un intrón de 23 nucleótidos se escinde produciendo un desplazamiento del marco de lectura en el ARNm de *bzip60* (Ruberti et al., 2015). Posteriormente, codifica una proteína sin el dominio transmembrana denominada bZIP60s (*bZIP60 spliced*), la cual se moviliza al núcleo donde regula el aumento de la expresión de genes relacionados a la UPR (Iwata & Koizumi, 2012). Mientras que, en ausencia de estrés del ER, la proteína no procesada bZIP60u (*bZIP60 unspliced*) presenta el dominio transmembrana que le permite anclarse a la membrana del ER (Figura 6). Sin embargo, no se sabe la función que desempeña (Bao & Howell, 2017; Iwata & Koizumi, 2012).

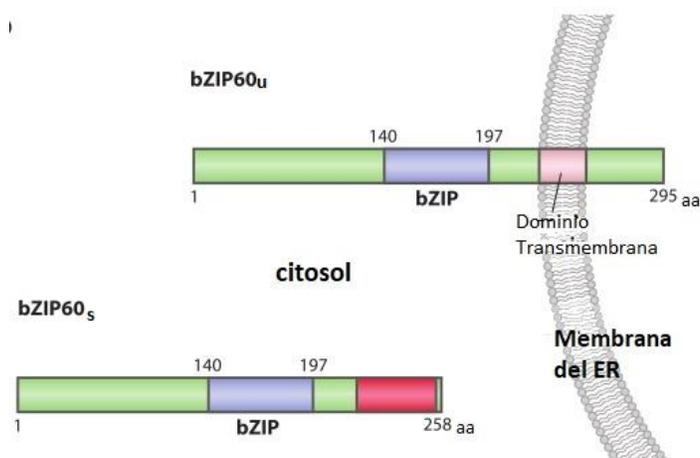


Figura 6. Proteínas codificadas por los dos tipos de ARNm de *bZIP60*. Fuente: (Howell, 2013).

Nota: La proteína codificada por la forma bZIP60u (*bZIP60 unspliced*) presenta un dominio transmembrana en el ER. Mientras que la proteína codificada por la forma bZIP60s (*bZIP60 spliced*) ha perdido su dominio transmembrana, y la nueva secuencia (en color rojo) contiene una señal de localización nuclear.

Se ha reportado que esta ruta de la UPR está involucrada en el estrés producido por infección con *Potexvirus* y *Potyvirus*, infección bacteriana, tunicamicina, calor o salinidad. (Arias Gaguancela et al., 2016; Duwi Fanata et al., 2013; Moreno et al., 2012).

2.2.1.2 Factores de transcripción asociados a la membrana del ER

En *Arabidopsis thaliana*, bZIP17 y bZIP28 son factores de transcripción que poseen un dominio C-terminal en el lumen y un dominio N-terminal citoplasmático que contiene un motivo bZIP (Figura 7) (Liu et al., 2007a, 2007b). Bajo condiciones de homeostasis celular, estos sensores se encuentran anclados a la membrana del ER a través de la unión con la chaperona BiP (Srivastava et al., 2013). Sin embargo, bajo condiciones de estrés, BiP se disocia de los factores de transcripción bZIP17 o bZIP28 y se dirige hacia las proteínas malformadas. Posteriormente bZIP17 o bZIP28 se transloca al aparato de Golgi, en donde su dominio C-terminal es cortado por la proteasa S1P (*site-1 protease*) y su dominio N-terminal, por S2P (*site-2 protease*) (Liu et al., 2007a, 2007b). La proteólisis secuencial libera el dominio citosólico N-terminal, convirtiéndose en un factor de transcripción bZIP funcional que se dirige al núcleo para activar la expresión de genes relacionados a la UPR (Duwi Fanata et al., 2013; Iwata & Koizumi, 2012; Liu & Howell, 2010).

En esta ruta metabólica no existen reportes que demuestren su activación por virus. Sin embargo, se ha observado que tanto bZIP17 como bZIP28 responden al estrés causado por temperatura, reactivos químicos o estrés osmótico (Duwi Fanata et al., 2013; Iwata & Koizumi, 2012).



Figura 7. Estructura de las proteínas AtbZIP17 y AtbZIP28. Fuente: (Wan & Jiang, 2016).

Nota: Pertenecen a las proteínas de membrana tipo II del retículo endoplasmático, contienen un dominio bZIP en su extremo N-terminal citosólico, y un dominio C-terminal en el lumen. Además, poseen un dominio de activación transcripcional (TAD: *transcriptional activation domain*), un dominio rico en prolina (PRD: *proline-rich domain*) y un dominio transmembrana (TMD: *transmembrane domain*). S1P y S2P son dos proteasas residentes en el aparato de Golgi, las cuales modifican a las proteínas AtbZIP17 y AtbZIP28.

2.2.1.3 Rol de la UPR en la infección viral en plantas

El estudio del rol que desempeña la UPR frente a la infección viral en plantas ha sido reciente (Verchot, 2014a; Ye et al., 2011). Hasta ahora, IRE1/bZIP60 es la única ruta metabólica de la UPR que se encuentra implicada en la infección viral en plantas (Zhang & Wang, 2016).

Se ha reportado que las proteínas virales TGB3 y 6K2 del género *Potexvirus* y *Potyvirus* respectivamente, inducen al aumento de la expresión de factores de transcripción bZIP60 y algunas chaperonas residentes en el ER de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* durante una infección viral (Arias Gaguancela et al., 2016; Ye et al., 2011; Ye et al., 2013; Zhang, Chen, Brandizzi, Verchot, & Wang, 2015).

Al parecer, la función que ejerce la UPR entre el virus y el huésped es ambigua. Por una parte, parece ayudar en la inmunidad de las plantas restringiendo la infección viral y aliviando la citotoxicidad. Pero, por otra parte parece que el virus manipula esta maquinaria para su beneficio (Chan, 2014; Zhang & Wang, 2016). Ello lleva a la necesidad de realizar más investigaciones en el tema, para poder conocer cuál es la forma exacta de activación de la UPR frente al ataque por virus en plantas.

2.2.2 Muerte celular programada (PCD)

En situaciones en las que el estrés severo en plantas no puede ser resuelto por la UPR, la célula se deteriora y activa el mecanismo de la PCD como una forma de respuesta a las señales tóxicas, eliminando las células dañadas bajo condiciones de estrés del ER para proteger a las demás células, y así lograr homeostasis en los tejidos y órganos (Sitia & Braakman, 2003).

No se conoce con claridad las rutas metabólicas que permiten una conexión entre la UPR y la PCD (Tabas & Ron, 2011; Yang et al., 2014). Sin embargo, se ha reportado que la activación de la UPR permite la inducción de genes relacionados a la PCD en plantas. Por ejemplo, se ha determinado que la sobre expresión de NAC089, importante regulador de la PCD, bajo condiciones de estrés del ER inducido por tunicamicina y ditiotreititol, es controlada directamente por bZIP28 y bZIP60, considerados como importantes reguladores de la UPR en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Yang et al., 2014). También se ha reportado que BAG7, miembro de la familia de proteínas BAG (*Bcl-2-associated athanogene*) en plantas de *Arabidopsis thaliana*, está involucrado en la UPR durante la respuesta al estrés del ER causado por temperatura o tunicamicina (Williams et al., 2010).

A diferencia de las investigaciones que existen acerca de la conexión entre la muerte celular programada y la UPR bajo condiciones de estrés del ER inducido por agentes químicos, poco se conoce acerca de esta conexión en infecciones virales (Ye et al., 2013). Sin embargo, se ha reportado un aumento en los niveles de ARN de *skp1*, que posteriormente traduce a una proteína implicada en la PCD, en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con la proteína TGBp3 de PVX, esta sobre expresión puede ser al menos parcialmente controlada por bZIP60 (Ye et al., 2011).

2.2.2.1 BAG6

En *Arabidopsis thaliana*, se han encontrado siete proteínas pertenecientes a la familia de proteínas BAG. Se trata de un grupo de co-chaperonas moleculares con un

dominio BAG en el C-terminal (BD), ayudan en el plegamiento de proteínas, regulan algunos procesos en la célula, incluyendo aquellos relacionados con el ataque de patógenos y estrés abiótico así como también con la PCD (Doukhanina et al., 2006; Takayama & Reed, 2001; Williams et al., 2014).

BAG6, miembro de la familia de proteínas BAG en plantas, contiene un dominio de unión a calmodulina cercano al BD y presenta dos secuencias de localización nuclear (Doukhanina et al., 2006; Kabbage, Kessens, & Dickman, 2016; Kang et al., 2006). BAG 6 está regulado por NAC089 bajo condiciones de estrés de ER, y existe la posibilidad de que se encuentre involucrado en los mecanismos de la PCD y la UPR (Yang et al., 2014).

2.2.2.2 BAG7

BAG7 es otro miembro de las proteínas BAG en plantas, también contiene un dominio de unión a calmodulina cercano al BD y presenta una secuencia de localización nuclear (Kabbage, Kessens, & Dickman, 2016). En plantas de *Arabidopsis thaliana* se localiza en el ER, sin embargo bajo condiciones de estrés por calor, se desencadena el proceso de sumoylación, proteólisis y finalmente la translocación de BAG7 desde el ER hasta el núcleo, donde BAG7 interactúa con el factor de transcripción WRKY29, regulador de la transcripción inducida por estrés biótico y abiótico (Eulgem, Rushton, Robatzek, & Somssich, 2000; Li et al., 2016).

BAG7 está involucrado en la PCD e interactúa con la proteína BiP2 y con el factor de transcripción bZIP28, conocidos componentes de la UPR, en respuesta al estrés abiótico (Figura 8) (Li, Williams, et al., 2016; Williams et al., 2010).

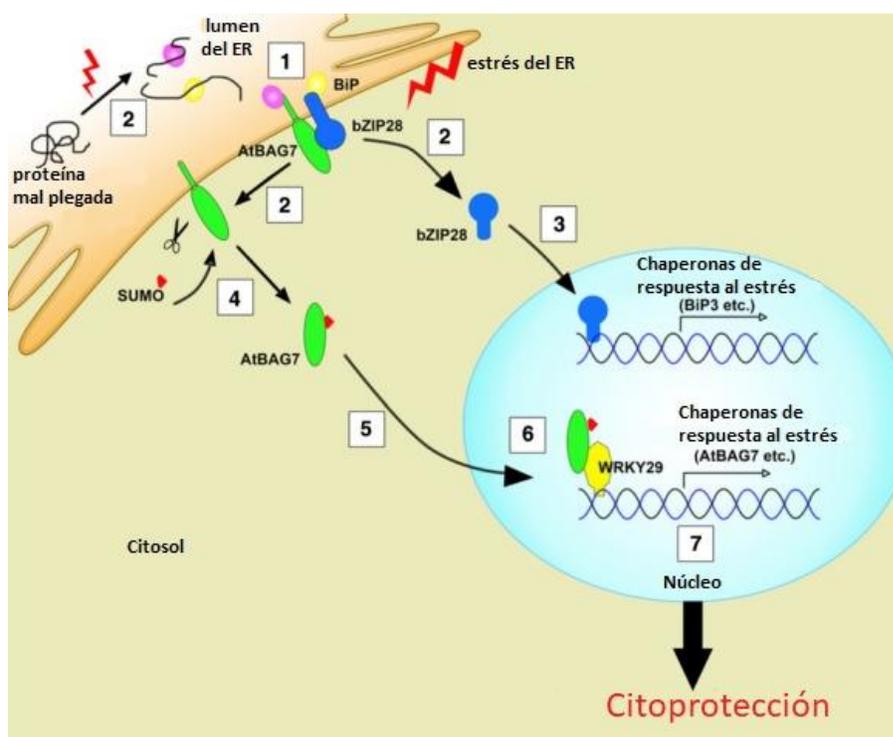


Figura 8. Tolerancia al estrés por calor mediado a través del atanogen 7 asociado a Bcl-2 en *Arabidopsis thaliana* (BAG7). Fuente: (Li et al., 2016).

Nota: La modificación postraduccional y la translocación son procesos clave de la tolerancia al calor mediada por BAG7. (1) BAG7 se une a BiP2 y bZIP28 en el retículo endoplasmático (ER), (2) el estrés por calor induce a la acumulación de proteínas mal plegadas en el ER y a la disociación de BAG7 y bZIP28 de BiP2, (3) BAG7 sufre modificaciones a través del proceso de sumoylación y proteólisis, (4) la proteína BAG7 procesada se transloca al núcleo, (5) BAG7 interactúa con WRKY29, y posteriormente WRKY29 se une con el promotor de BAG7, (6) WRKY29 induce la transcripción de BAG7 y otras chaperonas, y (7) bZIP28 se transloca al núcleo para inducir la expresión de chaperonas incluyendo BiP3.

2.2.2.3 SKP1

SKP1 es un componente del complejo ubiquitin-ligasa SCF (*SKP1/Cullin1/F-box protein*), el cual realiza la ubiquitinación de proteínas como una señal para la degradación en el proteasoma 26S (Cheng et al., 2011; Smalle & Vierstra, 2004). En plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*, SKP1 está involucrado en la respuesta al jasmonato, la señalización de auxinas, defensa contra la infección de *Polyovirus* (Gfeller, Liechti, & Farmer, 2010; Pazhouhandeh et al., 2006; Zheng et al., 2011).

Por otra parte, Ye et al. (2013) ha reportado que la proteína TGBp3 de PVX induce la sobre expresión de *skp1* y que, además, el silenciamiento de SKP1 compromete de alguna forma la PCD en plantas de *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo, el rol de este componente durante la infección viral aún no está descrito.

2.3 *Arabidopsis thaliana* como planta modelo

Arabidopsis thaliana pertenece a la familia *Brassicaceae*, es una planta pequeña, de ciclo de vida corto (seis-ocho semanas), presenta un genoma diploide de aproximadamente 157 Mbp, es susceptible a patógenos que tienen una amplia gama de huéspedes (Al-Shehbaz & O'Kane, 2002; Bennett, Leitch, Price, & Johnston, 2003; Krämer, 2015; Piquerez et al., 2014); características que han despertado interés en la comunidad científica como planta modelo logrando el desarrollo de su genética, biología molecular y genómica (Krämer, 2015).

Dichos avances han permitido un amplio entendimiento de los procesos biológicos que se llevan a cabo en las plantas, incluyendo las rutas metabólicas por las cuales responden ante el estrés biótico y abiótico (Piquerez et al., 2014). Es por ello que *Arabidopsis thaliana* se ha convertido en uno de los mejores sistemas modelos para elucidar los componentes que regulan el mecanismo de la UPR en plantas (Chen & Brandizzi, 2013b).

El conocimiento adquirido a partir de este tipo de sistemas modelos puede ser transferido a cultivos económicamente importantes. Se ha observado que las proteínas GmRIN4a y GmRIN4b de la soya, proteínas con secuencias altamente similares a las de *A. thaliana*, participan en los mecanismos de resistencia frente a *Pseudomonas syringae* (Selote and Kachroo, 2010). Por otra parte, Xu et al (2013) menciona que las proteínas SnRK2, involucradas en la señalización el ácido abscísico e identificada previamente en *A. thaliana* (Hrabak et al., 2003), están siendo caracterizada en arroz.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Participantes

La investigación titulada “Propagación de PlAMV del género *Potexvirus* y TuMV del género *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes relacionados a la respuesta celular frente al estrés del retículo endoplasmático” se realizó en los laboratorios del Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma (Oklahoma State University, OSU) bajo la tutela de la Dra. Jeanmarie Verchot y el M.Sc. Omar Arias Gaguancela en el marco de la Carta de Intención de cooperación académica y científica firmada por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y OSU.

3.2 Zona de estudio

La fase experimental se desarrolló en los laboratorios del Departamento de Entomología y Fitopatología de la Universidad Estatal de Oklahoma, ubicado en Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos de Norte América, Latitud: 36°07'30.6"N, Longitud: 97°04'12.4"W.

3.3 Periodo de tiempo de la investigación

La investigación se inició en el mes de septiembre del año 2016 y finalizó en el mes de marzo del año 2017.

3.4 Procedimientos

3.4.1 Plásmidos y cepas bacterianas

Los clones infecciosos de los virus insertados en los plásmidos eran portadores de la proteína fluorescente verde (GFP: *Green Fluorescent protein*), usada para visualizar *in vivo* la propagación del virus en las plantas de *Arabidopsis thaliana*. Se emplearon

plásmidos binarios pCAMBIA que contenían el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S CaMV) y clones infecciosos de TuMV-GFP donados por el Dr. Aiming Wang (Southern Crop Protection and Food Research Center – Ontario, Canadá) o clones infecciosos de PIAMV-GFP aislados de una cepa de virus no necrótica encontrada en lirios (PIAMV-Li6) (Arias, 2017; Komatsu et al., 2008).

Dichos plásmidos se mantuvieron en *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa GV3101 a 4 °C en agar extracto de levadura y peptona (YEP), con antibióticos rifampicina y kanamicina (50 µg/mL) (Arias Gaguancela et al., 2016).

3.4.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-O y plantas transgénicas homocigotas con inserciones de T-DNA de los genes *bzip60-1* (SALK_050203; locus At1g42990), *bzip28-2* (SALK_132285), *bzip17* (SALK_104326), *bzip17/bzip60*, *bzip28/bzip60*, *bag7* (SALK_065883C), *bag6* (SALK_047959C), *skp1* (CS 320876) obtenidas de *Arabidopsis* Information Resource Center (Ohio State University).

Inicialmente, las semillas de *Arabidopsis thaliana* (Figura 9) fueron desinfectadas durante un minuto con isopropanol y por 5 minutos con una solución de hipoclorito de sodio al 50% (v/v) y Tritón-X 100 al 0.05% (v/v). Las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Sigma-Aldrich) con 0.4 % de agar, estas semillas crecieron a 23°C durante dos semanas (Figura 10).

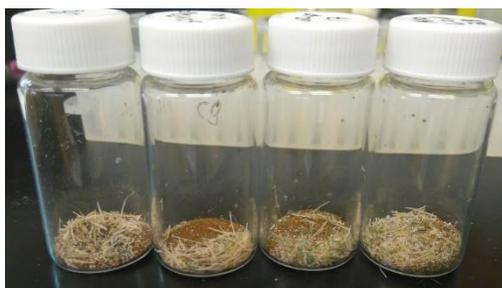


Figura 9. Semillas de *Arabidopsis thaliana*.

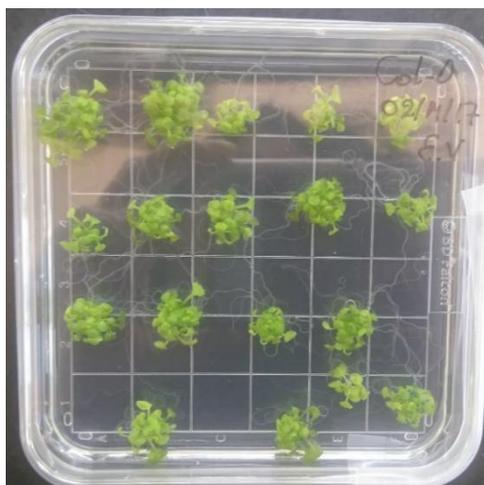


Figura 10. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas de crecimiento.

Posteriormente las plántulas se transplantaron en sustrato de cultivo (Metro-Mix) rico en turba de musgo de *Sphagnum* canadiense (35-45%), vermiculita grado para horticultura, corteza de pino compostada y caliza dolomítica. Se colocó de cuatro a seis gotas del fertilizante Quick Start Planting & Transplanting Starting Solution (Miracle-Gro) en cada planta, después de la primera semana de crecimiento en el sustrato. Las plántulas se desarrollaron en cámaras de crecimiento en condiciones controladas de luz (16-h de luz/8-h de oscuridad) y temperatura (23°C) (Arias Gaguancela et al., 2016), durante dos semanas (Figura 11) para luego infectarlas con el material genético viral mediado por *Agrobacterium tumefaciens*.



Figura 11. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de cuatro semanas de crecimiento

3.4.3 Infección en tejido vegetal mediante suministro de material genético viral mediado por *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens modificado con el plásmido que contiene virus-GFP, se sembró en medio líquido YEP (1% extracto levadura, 1% Bacto peptona, 0.5% NaCl, pH= 7.5) con 50 µg/mL de rifampicina y 50 µg/mL de kanamicina, en agitación constante (220 rpm) y a 28°C por 16 h (Kang, Oh, Kim, Choi, & Baek, 2010). Posteriormente, los cultivos celulares se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm, se conservó el precipitado y se re suspendió en medio de infiltración (10 mM Mg₂Cl₂, 10 mM MES, pH=7) con acetosiringona (5 mM) (Ye et al.,2011). La densidad óptica correspondiente fue de OD₆₀₀ = 0.4 - 0.6, finalmente la solución de *A. tumefaciens* se incubó a temperatura ambiente (23°C) durante una hora y entonces se infiltró la solución en el envés de tres hojas opuestas de cada planta de *A. thaliana*, empleando para ello una jeringa sin aguja de 1 mL (Figura 12) (Arias, 2017).



Figura 12. Agroinfiltración en *Arabidopsis thaliana*.

3.4.4 Análisis de proteínas de la cubierta viral mediante la técnica de Western Blot

Las hojas inoculadas se recolectaron en nitrógeno líquido y se extrajo la proteína total de cada una, para ello se usó 150 µL de buffer de extracción proteica (100 mM Tris

HCl pH=7.5, 10mM KCl, 0.4 M Sucrosa, 5 mM MgCl₂, 10% glicerol y 10mM β-mercaptoetanol) (Ye et al., 2013) y con ayuda del micropistilo se trituró el tejido foliar hasta obtener un líquido espeso de color verde (Figura 13). La solución se centrifugó a 1 rcf durante 10 min y se recuperó el sobrenadante.

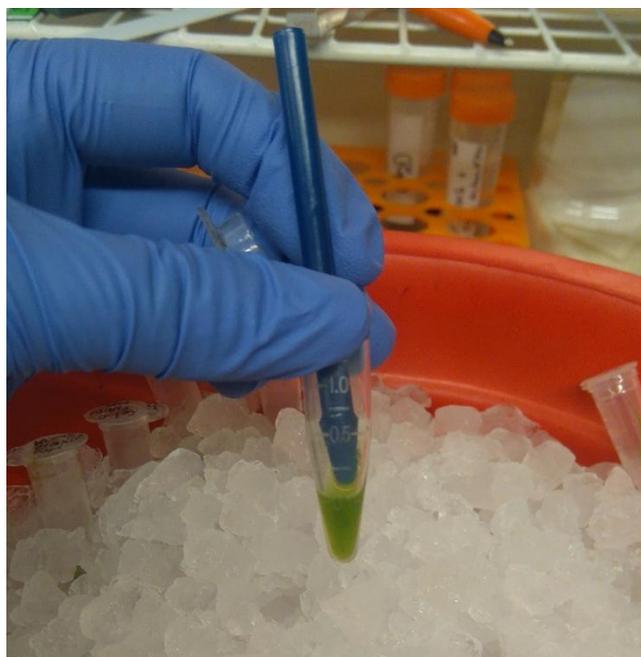


Figura 13. Lisis del tejido foliar.

Los niveles de proteína total fueron cuantificados mediante el método Bradford (Bradford, 1976), usando para ello el kit comercial Coomassie Plus Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) y estableciendo una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA, realizada por el M.Sc. Omar Arias Gaguancela. Es así que la cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en dicha curva.

La proteína se desnaturalizó mediante incubación de 10 minutos a 95°C en tampón de carga 2X (0.25M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 40% glicerol, 4% β-mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol). Se cargó 9 µg de la proteína desnaturalizada en geles de poliacrilamida con SDS (Tabla 1 y 2) y se separó mediante electroforesis

(SDS-PAGE) a 0.08A durante 18 min en tampón de corrida 1X (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0.1% SDS, ph=8.3) (Bio-Rad bulletin 6040).

Tabla 1.

Composición del gel separador.

Gel Separador al 15%	
Reactivo	Volumen
Tampón 2x ¹	12.5 mL
Acrilamida 30%	9.35 mL
Agua	3.15 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	300 µL
Tetrametiletilenediamino (TEMED)	70 µL

¹ Contiene 0.75 M Tris-HCl (pH 8.8) y 0.2% SDS (Modificado de Bio-Rad bulletin 6040 y basado en Nic-Can & De la Peña, 2012).

Tabla 2.

Composición del gel concentrador.

Gel Concentrador al 4%	
Reactivo	Volumen
Tampón 2x ¹	1.28 mL
Acrilamida 30%	0.67 mL
Agua	3.075 mL
Persulfato de amonio (APS) al 10%	50 µL
Tetrametiletilenediamino (TEMED)	70 µL

¹ Contiene 0.25 M Tris-HCl (pH 6.8) y 0.2% SDS (Modificado de Bio-Rad bulletin 6040 y basado en Nic-Can & De la Peña, 2012).

Posteriormente, se armó el sánduche (Figura 14) para la electro-transferencia de las proteínas contenidas en el gel a una membrana de PVDF Amersham Hybond P de 0.45 μm (GE Healthcare Life Sciences), se utilizó un tampón de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol) (Bio-Rad bulletin 2895), se lo incubó a una corriente constante de 25 mA, con agitación, en un cuarto frío a 4 °C y durante toda la noche. Después, se realizó una tinción Ponceau S (0.5 % Ponceau S, 1 % ácido acético) de la membrana de PVDF para comprobar visualmente que la cantidad de proteína fue similar en los diferentes pocillos (Nic-Can & De la Peña, 2012).



Figura 14. Ensamblaje del sánduche para la electro-transferencia de proteínas.

Para la inmunodetección de las proteínas de la cubierta viral, se incubó la membrana de PVDF con solución de bloqueo al 5% compuesta por 4g de Amersham ECL Blocking Agent (GE Healthcare Life Sciences) y 80 mL de PBS (138 mM NaCl, 3mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4), durante una hora y en agitación. A continuación, la membrana se incubó con 10 mL de la solución de bloqueo al 5% y 30 μL del anticuerpo primario *anti-Nandina Mosaic Virus* para PIAMV (AGDIA) o *anti-Turnip Mosaic Virus* para TuMV (AGDIA) durante una hora y en agitación. Se descartó la solución anterior y se realizó un lavado con PBS durante 20 min y en agitación. Posteriormente, se colocó 10 mL de la solución de bloqueo al 5% junto con 40 μL de anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano de Amersham ECL (GE Healthcare Life Sciences) y se incubó la membrana de PVDF durante una hora y

bajo agitación. A continuación, se descartó la solución anterior y se realizó un nuevo lavado con PBS durante 20 minutos y en agitación (Arias, 2017; Bio-Rad bulletin 2895).

Finalmente, se realizó la reacción quimioluminiscente mediante el kit de Western Blot Amersham ECL (GE Healthcare Bio Sciences) con un tiempo de exposición de un minuto y las fotos de las bandas de las proteínas se tomaron mediante el equipo FluorChem E (ProteinSimple) (Arias Gaguancela et al., 2016).

3.4.5 Fotografías y análisis de datos mediante el programa Image J

Tanto la infección local como la infección sistémica visible en las plantas de *A. thaliana* fue monitoreada a través de la fluorescencia de GFP, tras la exposición a una lámpara de luz UV (Blak-Ray, modelo B 100). Se llevó un registro de la infección local y sistémica a diferentes periodos de tiempo.

En el caso de la infección local, se recolectaron hojas inoculadas de cinco y ocho días post inoculación (dpi) para PIAMV y TuMV, respectivamente y a continuación se tomaron imágenes de dichas hojas. Con respecto a la infección sistémica, se tomaron fotografías de toda la planta a los 10, 12, 17 y 19 dpi (Arias Gaguancela et al., 2016). Las fotografías fueron tomadas con una cámara D3100 DSLR (Nikon) con lentes de 18-55 mm, estas imágenes se exportaron al programa Image J, el cual permite seleccionar el área del tejido que presenta fluorescencia de GFP (área infectada por el virus), dando como resultado los valores de intensidad de fluorescencia medidos como densidad integrada (IntDen) (Image J software). Los resultados se exportaron al programa Microsoft Excel-2016 para su posterior análisis estadístico.

La medida que se escogió como referencia, necesaria para el programa Image J, fue el ancho del porta objetos (26 mm) en el caso de las hojas locales, mientras que para las hojas sistémicas se usó el diámetro de la maceta (100 mm).

El nivel de cambio (*fold change*) de la intensidad de fluorescencia en las hojas inoculadas, fue calculado dividiendo el valor IntDen de las líneas mutantes para el valor

IntDen de las plantas Col-O de *Arabidopsis thaliana* (Arias Gaguancela et al., 2016; Blalock, 2003).

3.5 Análisis estadístico

El programa InfoStat (InfoStat versión estudiantil 2016; Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) fue utilizado tanto para los gráficos como para los análisis estadísticos de la infección local y sistémica mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que permitió conocer si existe o no diferencia en la acumulación del virus al comparar los valores de intensidad de fluorescencia de las plantas de tipo salvaje (Col-O) con plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*. El nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0.05$. Para ello se utilizaron los valores de intensidad de fluorescencia de seis hojas (infección local) o seis plantas (infección sistémica) de *Arabidopsis thaliana* de cada uno de los siguientes genotipos: Col-O, *bzip17*, *bzip28*, *bzip60*, *bzip60/17*, *bzip60/28*, *bag6*, *bag7* y *skp1*. Estos genotipos se dividieron en dos grupos, el primero relacionado con los genes de la UPR (*bzip17*, *bzip28*, *bzip60*, *bzip60/17*, *bzip60/28*) y el segundo con los genes de la PCD (*bag6*, *bag7* y *skp1*). Ambos grupos fueron infectados con PIAMV o TuMV.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Patrones de infección producida por virus del género *Potexvirus* y *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60*

En respuesta al estrés del ER existen dos ramas de la UPR, la primera involucra a IRE1 que regula la expresión de bZIP60 y la segunda está dirigida por bZIP17/bZIP28 (Verchot, 2016). Existen reportes acerca de la sobre expresión de los genes *bzip60*, *bzip17* y *bzip28* inducidos por las proteínas TGB3 de *Potexvirus* o 6K2 de *Potyvirus* a los 2 o 5 dpi (Arias, 2017). Por lo tanto, para estudiar si las proteínas bZIP60, bZIP17 o bZIP28 restringen la infección causada por *Potexvirus* o *Potyvirus*, se usaron plantas de *Arabidopsis thaliana* de cada uno de los siguientes genotipos: Col-O, *bzip17*, *bzip28*, *bzip60*, *bzip60/bzip17* y *bzip60/bzip28* inoculadas con PIAMV-GFP o TuMV-GFP.

4.1.1. Infección local y sistémica producida por PIAMV del género *Potexvirus* en plantas mutantes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60*

La acumulación local del virus fue examinada a los 5 dpi en las hojas inoculadas con PIAMV-GFP. La fluorescencia de GFP fue medida en las hojas inoculadas, y el nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia (NC_{int}) se comparó entre las hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-O (n=6) y las hojas de las líneas mutantes (n=6) (Figura 15A). El nivel de la intensidad de fluorescencia fue de 7 a 9 veces mayor en las hojas de plantas mutantes *bzip60* ($p < 0.01$), *bzip17* ($p < 0.001$) o *bzip60/17* ($p < 0.001$) al compararlas con Col-O, mientras que las hojas inoculadas de líneas mutantes *bzip28* o *bzip60/bzip28* no presentaron un cambio significativo ($p > 0.1$) en comparación con Col-O. Además, los análisis de Western blot (Figura 15B) en al menos tres réplicas, también indicaron que la proteína de la cubierta viral de PIAMV se encontraba acumulada en altas cantidades en las hojas de las plantas de *A. thaliana* mutantes de los genes *bzip60*, *bzip17* y *bzip60/17* en comparación con las hojas control Col-O. Estos datos demuestran que tanto bZIP17 como bZIP60 tienen un rol importante en la restricción de la acumulación local de PIAMV-GFP en plantas de *A. thaliana*.

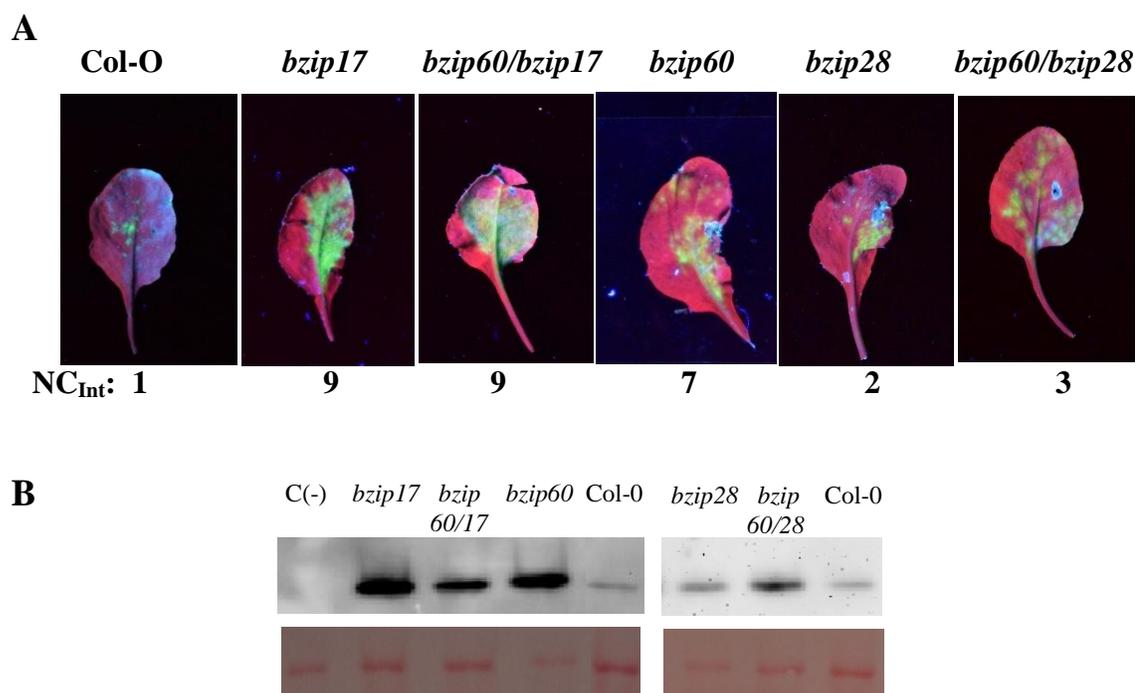


Figura 15. Infección local de PIAMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60*. A) Fotografías representativas de hojas inoculadas a los 5 dpi. B) Detección de la cubierta viral de PIAMV (21 kDa) en hojas inoculadas a los 5 dpi, mediante Western blot. La tinción Ponceau S abajo de los Western blots demuestra que la cantidad de proteína cargada fue similar en cada pocillo. C(-) es el control negativo representado por hojas de *A. thaliana* sin inocular. NC_{Int}: nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a Col O.

Para evaluar si la infección sistémica producida por PIAMV-GFP en las plantas mutantes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60* ($n = 28$) se encontraba alterada en comparación con la infección de las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col O ($n = 28$), se monitoreó el porcentaje de plantas que presentaban infección sistémica a los 10 y 12 días después de la inoculación (Figura 16). La infección sistémica en algunos casos apareció como pequeños puntos fluorescentes, mientras que en otros casos se presentó como grandes manchas en las hojas no inoculadas. A los 10 dpi, el 43% de las plantas Col O,

del 55 al 56% de las plantas mutantes para los genes *bzip28*, *bzip60/bzip28* o *bzip60* y del 67 al 68% de las plantas *knock out* para los genes *bzip17* o *bzip60/bzip17* fueron sistémicamente infectadas. Mientras que, a los 12 dpi se observó que el 57% de las plantas Col O, del 65 al 66% de las plantas *knock out* para los genes *bzip28* o *bzip60/bzip28* y del 75 al 81% de las plantas mutantes para los genes *bzip17*, *bzip60/bzip17* o *bzip60* fueron sistémicamente infectadas.

En general, estos datos indican que las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60* fueron más susceptibles a PIAMV-GFP que las plantas control Col O, sin embargo, *bzip17*, *bzip60* o *bzip60/bzip17* tuvieron una acumulación sistémica del virus en una mayor cantidad de plantas a los 10 o 12 dpi comparadas con Col O (Figura 16).

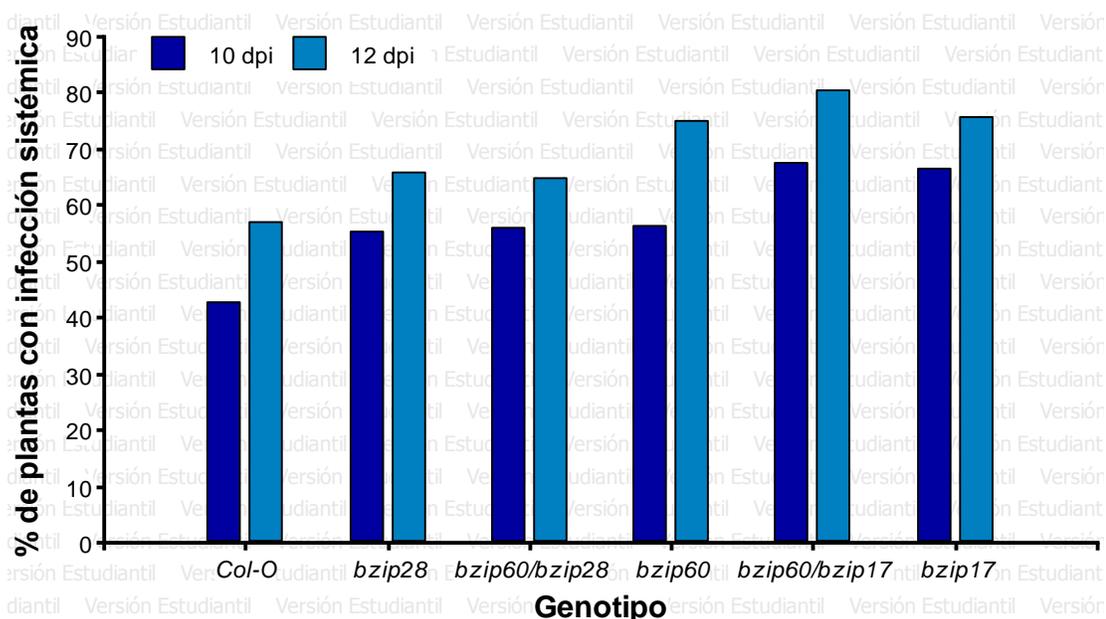


Figura 16. Porcentaje de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip* (n=28) con presencia de infección sistémica causada por PIAMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.

Para llevar a cabo el seguimiento *in vivo* de la propagación viral en las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se combinó un análisis cualitativo mediante fotografías que

demostraban la infección sistémica visible monitoreada a través de la fluorescencia de GFP en las hojas no inoculadas, y un análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia del área de esas hojas infectadas sistémicamente por el virus (Figuras 17, 20, 23 y 26).

Se fotografiaron las hojas de las plantas silvestres Col O (n=6) y de las plantas mutantes (n=6) para los genes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60* que fueron infectadas por PIAMV-GFP a los 10, 12, 17 y 19 dpi (Figura 17A). La medida de intensidad de fluorescencia en dichas plantas se graficó a través del tiempo (Figura 17B). Se observó que las plantas mutantes *bzip17*, *bzip60* y *bzip60/bzip17* presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en el tejido sistémico en el transcurso del tiempo con respecto a Col O ($p < 0.001$), alcanzando así una invasión viral de casi toda la planta hasta el día 19 después de la inoculación (Figura 17A), mientras que la acumulación sistémica de PIAMV-GFP fue similar entre las plantas *bzip28*, *bzip60/bzip28* y Col O ($p > 0.05$; Figura 17).

Al eliminar la expresión de *bzip17* y/o *bzip60* se incrementaron de forma similar los patrones de acumulación de PIAMV-GFP en el tejido local y sistémico, sugiriendo que bZIP17 y bZIP60 pueden interactuar y restringir la propagación de la infección de PIAMV en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

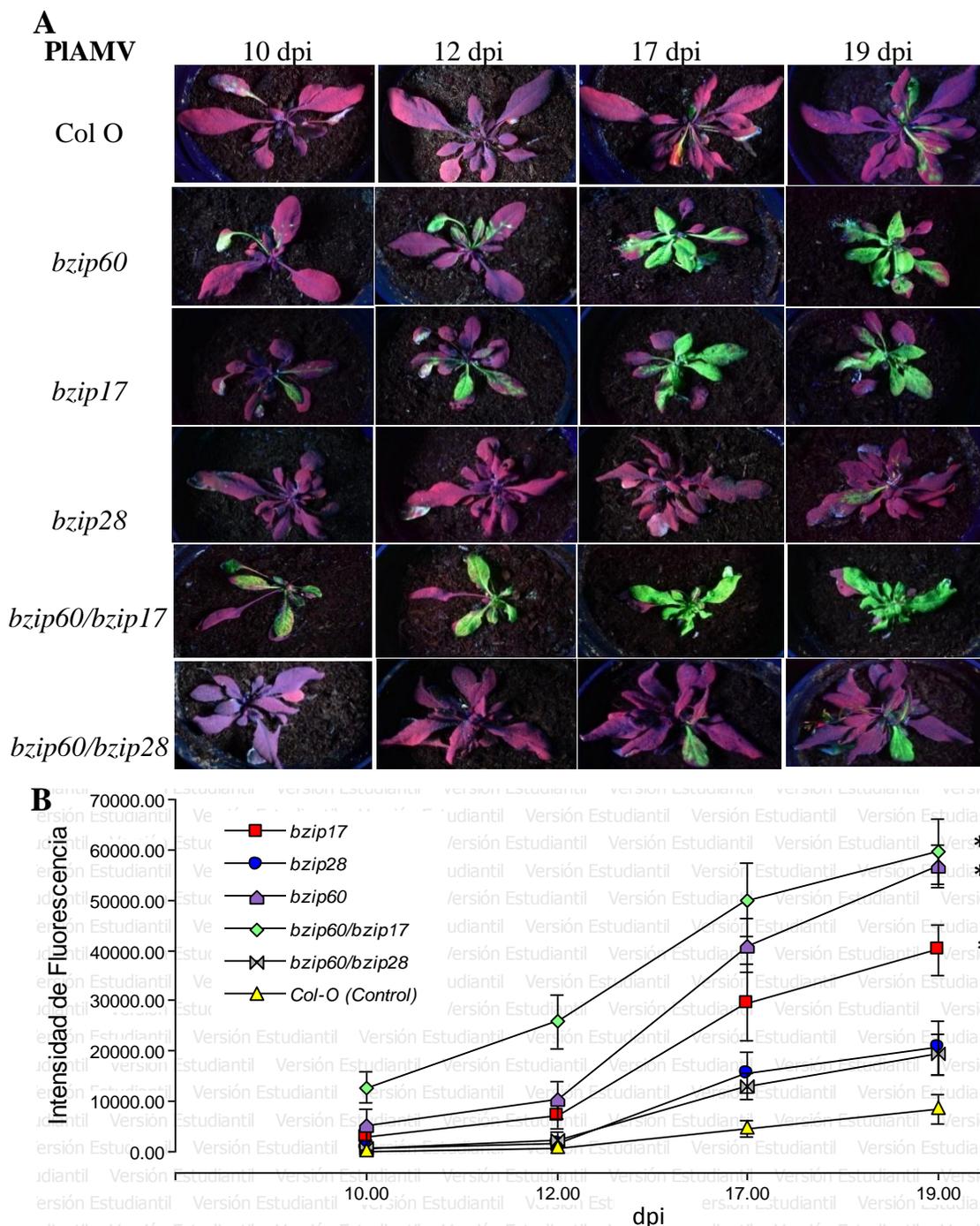


Figura 17. Infección sistémica de PIAMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip*. A) Fotografías de la propagación del virus a diferentes días post inoculación (dpi), tomadas con lámpara de UV. B) Gráfico de líneas que demuestra los valores de intensidad de fluorescencia (media \pm error estándar) de las plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (n=6) infectadas con el virus en el transcurso del tiempo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre la planta mutante comparada con el ecotipo silvestre Col O.

4.1.2. Infección local y sistémica producida por TuMV del género *Potyvirus* en plantas mutantes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60*

La diseminación de la infección de TuMV-GFP fue más lenta que PIAMV-GFP en las hojas locales, ya que no se observó la fluorescencia de GFP sino hasta el séptimo u octavo día después de la infiltración de TuMV-GFP en *Arabidopsis thaliana*. Por ello, la acumulación local de TuMV-GFP fue examinada a los 8 dpi en las hojas inoculadas. Se midió la fluorescencia de GFP y el NC_{int} se comparó entre las hojas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-O (n=6) y las hojas de las líneas mutantes (n=6) (Figura 18A). El nivel de la intensidad de fluorescencia fue 3 veces mayor en las hojas de plantas mutantes *bzip60* ($p < 0.05$) y *bzip28* ($p < 0.05$) en comparación con Col-O. Mientras que, las hojas inoculadas de *bzip17*, *bzip60/bzip17* y *bzip60/bzip28* no presentan una diferencia significativa ($p > 0.1$) al compararlas con Col-O.

Además, los análisis de Western blot (Figura 18B) en al menos tres réplicas, demostraron que había mayor cantidad de la proteína de la cubierta viral de TuMV en las hojas de *A. thaliana* mutantes de los genes *bzip60* y *bzip28* en contraste con las hojas control Col-O. Estos datos indican que bZIP28 y bZIP60 podrían jugar un rol importante en la restricción de la infección local de TuMV-GFP en plantas de *A. thaliana*.

Con frecuencia se observó que la acumulación de TuMV se retrasa en comparación a PIAMV, además fue más notoria la fluorescencia de GFP en el tejido sistémico que en las hojas inoculadas con TuMV. Posiblemente, en las hojas inoculadas TuMV puede trasladarse hacia el floema de una forma más rápida que PIAMV, evitando una gran propagación a través del tejido foliar inicialmente infectado, y dirigiéndose de esta manera hacia el tejido sistémico (Arias Gaguancela et al., 2016). Este movimiento limitado en las hojas inoculadas podría deberse a las interacciones entre la planta y el virus (Hull, 2002).

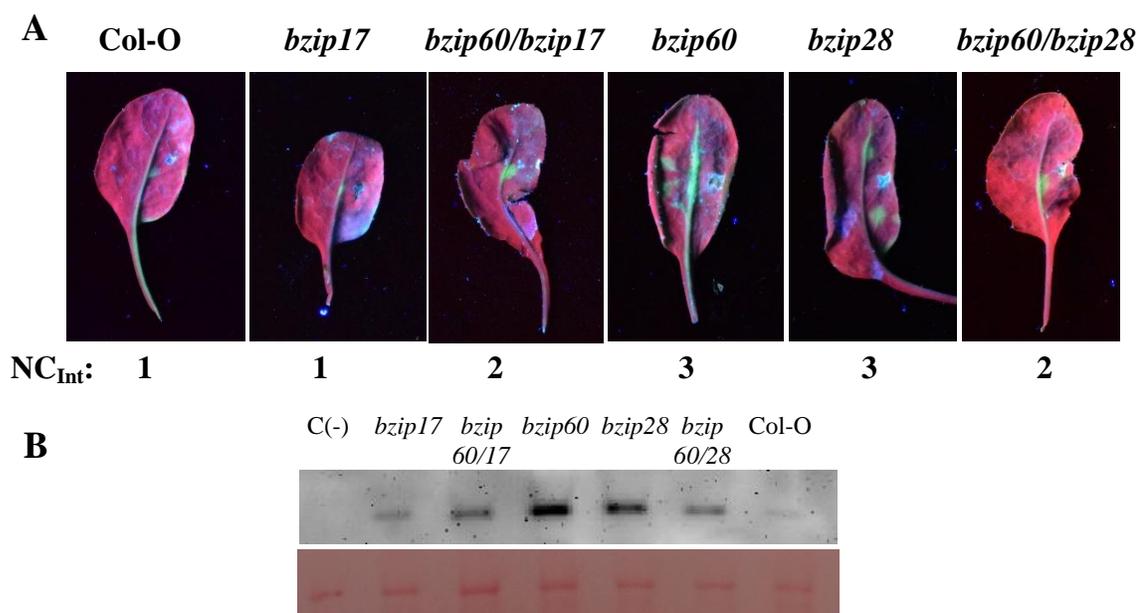


Figura 18. Infección local de TuMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60*. A) Fotografías representativas de hojas inoculadas a los 8 dpi. B) Detección de la cubierta viral de TuMV (34 kDa) en hojas inoculadas a los 8 dpi, mediante Western blot. La tinción Ponceau S abajo de los Western blots demuestra que la cantidad de proteína cargada fue similar en cada pocillo. C(-) es el control negativo representado por hojas de *A. thaliana* sin inocular. NC_{Int}: nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a Col O.

Por otra parte, se analizó la cantidad de plantas mutantes *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60* (n = 27) que presentaban infección sistémica causada por TuMV-GFP para evaluar si existe alguna diferencia con respecto a la infección en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col O (n = 27) (Figura 19). A los 10 dpi, el 33% de las plantas Col O, el 47% de las plantas mutantes para los genes *bzip28* y *bzip17*, el 59% de las plantas *knock out* para los genes *bzip60* y *bzip60/bzip28* y el 71% de las plantas *bzip60/bzip17* presentaron infección sistémica. Mientras que, a los 12 dpi se observó que el 49% de las plantas Col O, el 58% de las plantas *knock out* para los genes *bzip28*, del 66 al 67% de las plantas mutantes para los genes *bzip60/bzip28*, *bzip60* o *bzip17* y el 79% de

las plantas *bzip60/bzip17* se encontraban infectadas sistémicamente. De forma general, estos datos indican que las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes simples o dobles de los genes *bzip* fueron más susceptibles a TuMV-GFP que las plantas control Col O, sin embargo, solo las plantas *bzip60/bzip17*, *bzip60/bzip28* y *bzip60* presentaron acumulación sistémica del virus en una mayor cantidad de plantas tanto a los 10 dpi como a los 12 dpi.

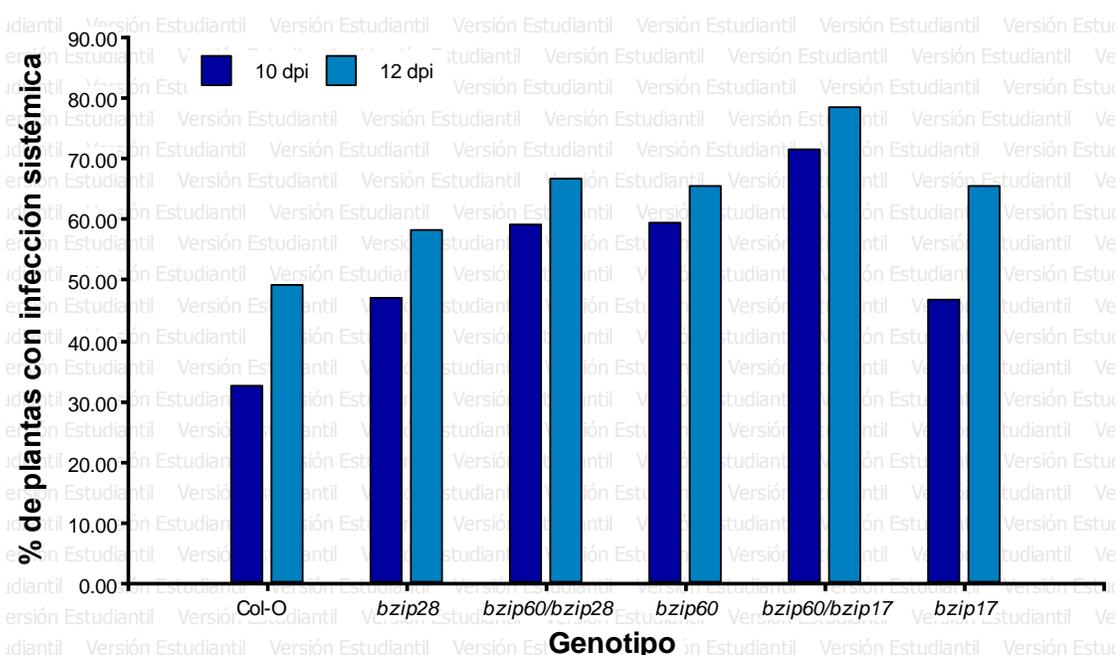


Figura 19. Porcentaje de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip* (n=27) con presencia de infección sistémica causada por TuMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.

De forma similar al anterior experimento, las plantas Col O (n=6) y las plantas mutantes (n=6) *bzip17*, *bzip28* y/o *bzip60* que presentaban infección sistémica causada por TuMV-GFP fueron fotografiadas a los 10, 12, 17 y 19 dpi (Figura 20A). La cantidad de intensidad de fluorescencia del área de las hojas infectadas sistémicamente, en cada uno de los tiempos analizados después de la inoculación se puede observar en la Figura 20B. La intensidad de fluorescencia de GFP fue significativamente mayor en las plantas *bzip28* ($p \leq 0.01$), *bzip60* ($p \leq 0.05$), *bzip60/bzip17* ($p \leq 0.01$) y *bzip60/bzip28* ($p \leq 0.01$)

en comparación de las plantas control Col O, pero no fue diferente para las plantas *bzip17* ($p > 0.1$; Figura 20).

Estos datos revelan que la pérdida de la expresión de *bzip60* y/o *bzip28* permite de forma similar el incremento de la diseminación de TuMV-GFP en el tejido foliar, sugiriendo que bZIP60 y bZIP28 pueden interactuar y restringir la propagación de la infección de TuMV en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

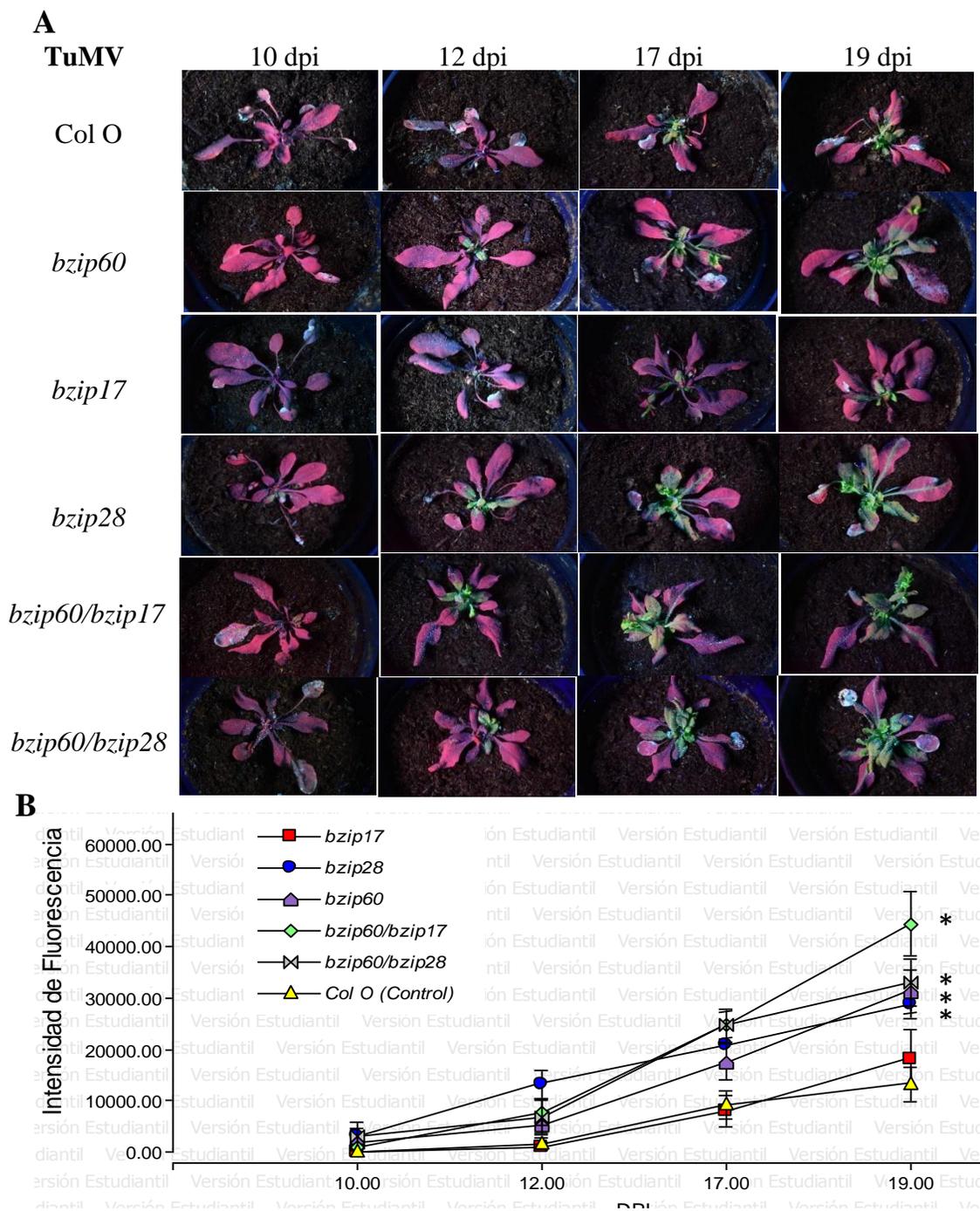


Figura 20. Infección sistémica de TuMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bzip*. A) Fotografías de la propagación del virus a diferentes días post inoculación (dpi), tomadas con lámpara de UV. B) Gráfico de líneas que demuestra los valores de intensidad de fluorescencia (media \pm error estándar) de las plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (n=6) infectadas con el virus en el transcurso del tiempo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre la planta mutante comparada con el ecotipo silvestre Col O.

Mutaciones en *bzip60*, *bzip17* y *bzip28* en *Arabidopsis thaliana* fueron empleadas para demostrar que las proteínas bZIP60, bZIP17 o bZIP28, componentes de la UPR activada por el estrés del ER, restringen la infección causada por PIAMV del género *Potexvirus* o TuMV del género *Potyvirus*. Se demostró que al eliminar la expresión de *bzip17* y/o *bzip60* se incrementó la acumulación de PIAMV-GFP en el tejido local y sistémico, mientras que la acumulación de TuMV-GFP fue mayor en las plantas *bzip28* y/o *bzip60* en comparación con *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col O.

Previas investigaciones han reportado que bZIP60 y bZIP17/bZIP28, dos ramas de la UPR, pueden converger para permitir la regulación de sus genes: 1) bZIP60 forma heterodímeros con bZIP28 y bZIP17 (Iwata, Yoneda, Yanagawa, & Koizumi, 2009; Liu & Howell, 2010; Song et al., 2015) y 2) genes dependientes de bZIP28 y bZIP60 como el gen *bip3* se sobre expresa bajo condiciones de estrés del ER en *Arabidopsis thaliana* (Iwata et al., 2008; Liu & Howell, 2010). Los resultados presentados en este estudio confirman dicho modelo, y sugieren que bZIP60 y bZIP17 podrían interactuar para activar genes que restringen el movimiento de PIAMV, mientras que bZIP60 y bZIP28 podrían asociarse para activar genes que restringen el movimiento de TuMV.

Además, estos resultados demuestran que bZIP60 puede ser un factor del huésped que permite la restricción hacia ambos virus, en cambio bZIP17 y bZIP28 son factores específicos que restringen la infección de PIAMV o TuMV, respectivamente (Arias, 2017). Estos datos son consistentes con reportes anteriores que demuestran la activación de bZIP60 durante la infección por *Potexvirus* o *Potyvirus* (Arias Gaguancela et al., 2016; Mitsuya et al., 2009; Ye et al., 2011; Zhang et al., 2015). Otros estudios mencionan la especificidad de bZIP17 y bZIP28 en la respuesta hacia factores que producen estrés celular. Se ha observado que el factor de transcripción bZIP17 se activa bajo condiciones de estrés por salinidad, mientras que bZIP28 no lo hace (Liu et al., 2007a, 2007b). Los resultados de esta investigación forman parte del primer reporte que relaciona a la segunda ruta metabólica de la UPR, *bzip17/bzip28*, con una infección viral (Arias, 2017).

4.2. Patrones de infección producida por virus del género *Potexvirus* o *Potyvirus* en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de genes *bag6*, *bag7* y *skp1*

El estrés crónico del ER que no se ha mitigado a través de la UPR puede desencadenar el mecanismo de la PCD como una forma de respuesta a las señales tóxicas para eliminar las células dañadas (I. Kim, Xu, & Reed, 2008; Sitia & Braakman, 2003). En estudios previos realizados en plantas se ha reportado la sobre expresión de algunos genes involucrados en la PCD y que son inducidos bajo condiciones de estrés del ER; por ejemplo: *bag6*, *bag7* y *skp1* (Li et al., 2016; Williams et al., 2010; Yang et al., 2014; Ye et al., 2011). Por ello, para evaluar si las proteínas BAG6, BAG7 o SKP1 restringen la infección viral, se inocularon plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bag6*, *bag7* y *skp1* con PIAMV-GFP o TuMV-GFP.

4.2.1. Infección local y sistémica producida por PIAMV del género *Potexvirus* en plantas mutantes *bag6*, *bag7* y *skp1*

La infección local de PIAMV-GFP fue examinada a los 5 dpi en las hojas inoculadas. De manera similar a los anteriores ensayos, el NC_{Int} fue comparado entre las hojas de *Arabidopsis thaliana* Col-O (n=6) y las hojas de las plantas mutantes (n=6) (Figura 21A). El nivel de la intensidad de fluorescencia fue 3 y 7 veces mayor en las hojas de plantas mutantes *skp1* ($p \leq 0.05$) y *bag7* ($p < 0.001$) en comparación con Col-O, respectivamente. Mientras que, las hojas inoculadas de líneas mutantes *bag6*, no presentan una diferencia significativa ($p > 0.1$) al compararlas con el ecotipo silvestre Col-O. Los análisis de Western blot (Figura 21B) en al menos tres réplicas, también demostraron que una gran cantidad de la proteína de la cubierta viral de PIAMV se encontraba en las hojas de *A. thaliana* mutantes de los genes *skp1* y *bag7* en contraste con las hojas control Col-O. Estos análisis indican que SKP1 y BAG 7 podrían jugar un rol importante en la restricción del movimiento célula a célula de PIAMV-GFP en plantas de *A. thaliana*.

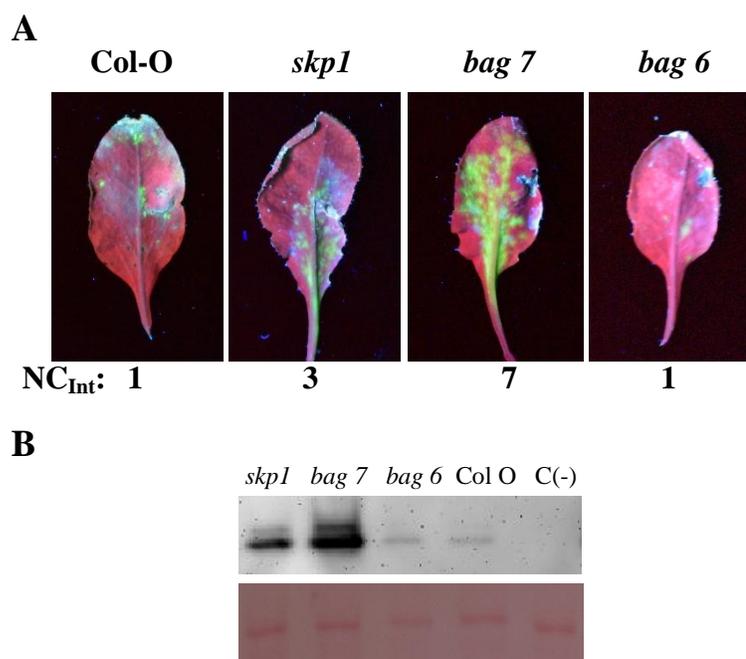


Figura 21. Infección local de PIAMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag 6*, *bag 7* y *skp1*. A) Fotografías representativas de hojas inoculadas a los 5 dpi. B) Detección de la cubierta viral de PIAMV (21 kDa) en hojas inoculadas a los 5 dpi, mediante Western blot. La tinción Ponceau S abajo de los Western blots demuestra que la cantidad de proteína cargada fue similar en cada pocillo. C(-) es el control negativo representado por hojas de *A. thaliana* sin inocular. NC_{Int}: nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a Col O.

El porcentaje de plantas mutantes *bag6*, *bag7* y *skp1* (n = 27) que indicaban infección sistémica por PIAMV-GFP fue monitoreado para conocer si existía alguna diferencia con la infección sistémica de las plantas control Col O (n = 27) a los 10 y 12 dpi (Figura 22). El 43% de las plantas Col O indicaron infección sistémica a los 10 dpi, este porcentaje aumentó al 57% a los 12 dpi. A los 10 dpi, el 18% de las plantas *knock out* para el gen *bag 6*, el 26% de las plantas *skp1* y el 42 % de las plantas *bag7* demostraron infección sistémica. A los 12 dpi se observó que el 36% de las plantas *bag6*, el 44% de las plantas *knock out* para el gen *skp1* y el 54 % de las plantas *bag7*

presentaban infección sistémica. Estos datos muestran que las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bag6*, *bag7* y *skp1*, a diferencia de los mutantes para los genes *bzip*, presentaron una susceptibilidad a PIAMV-GFP menor o similar que las plantas control Col O a los 10 o 12 dpi.

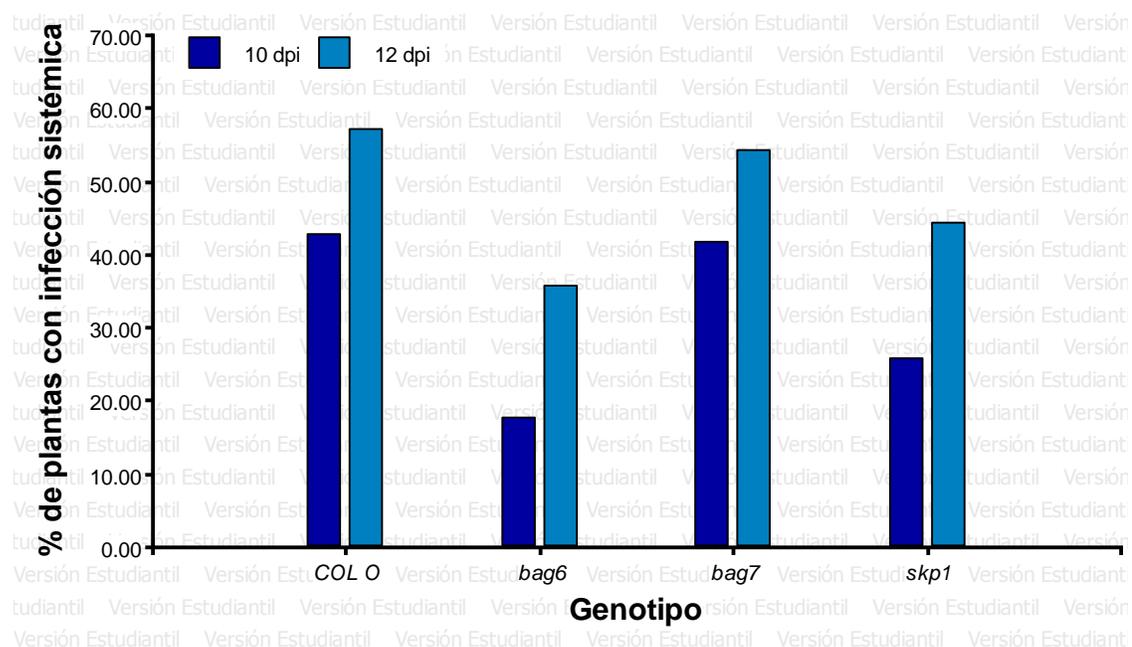


Figura 22. Porcentaje de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag6*, *bag7* y *skp1* (n=27) con presencia de infección sistémica causada por PIAMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.

Las plantas Col O (n=6) y las plantas mutantes (n=6) *bag6*, *bag7* y *skp1* infectadas con PIAMV-GFP fueron fotografiadas a los 10, 12, 17 y 19 dpi (Figura 23A). El gráfico de líneas (Figura 23B) indicó que la intensidad de fluorescencia del área de las hojas infectadas sistémicamente fue significativamente mayor en las plantas *bag7* ($p \leq 0.001$) y *skp1* ($p \leq 0.01$) en comparación a las plantas control Col O, pero no fue significativamente diferente para las plantas *bag6* ($p > 0.05$). Estos resultados revelan que BAG7 y SKP1 también restringen el movimiento local y sistémico de PIAMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

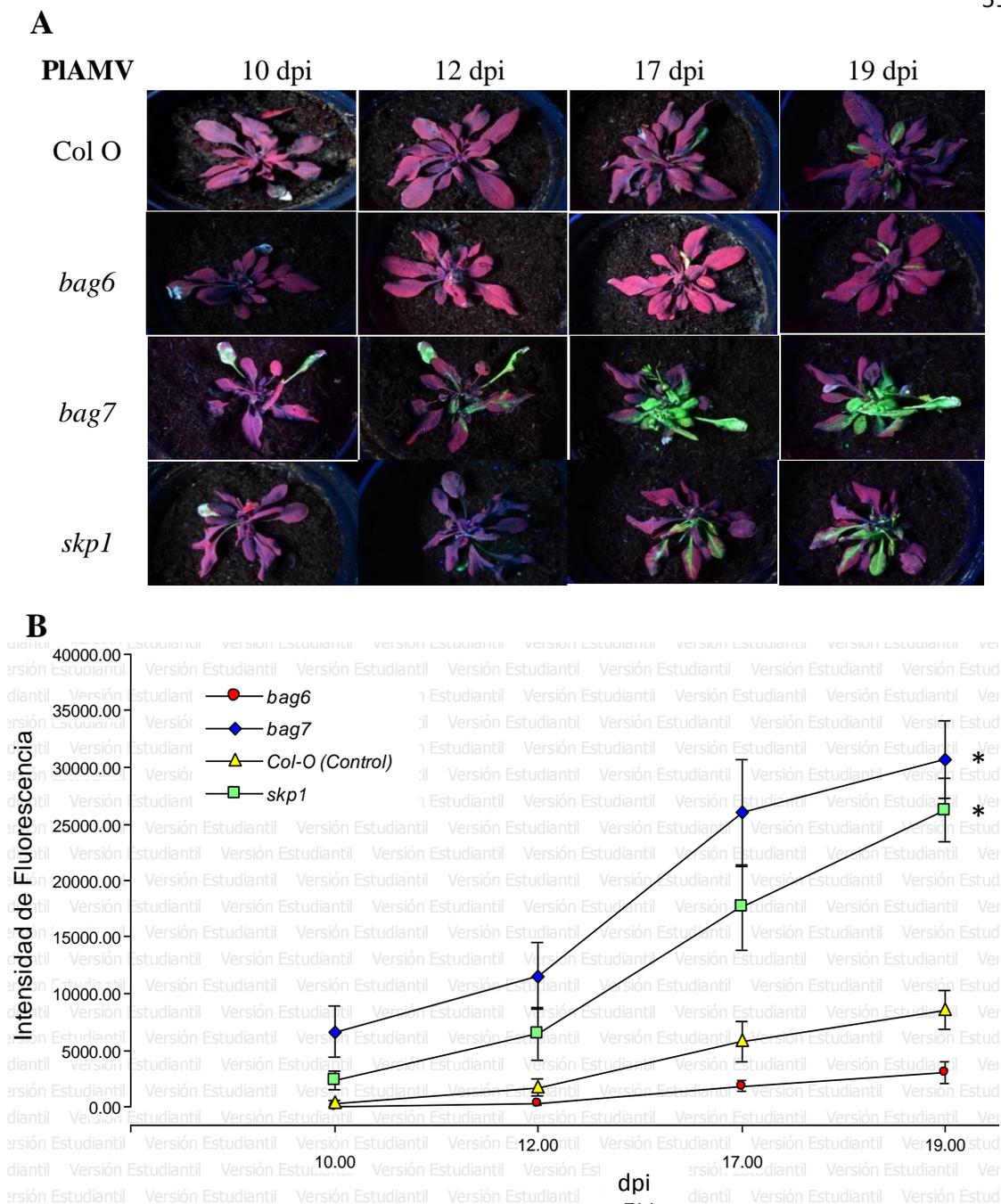


Figura 23. Infección sistémica de PIAMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag6*, *bag7* y *skp1*. A) Fotografías de la propagación del virus a diferentes días post inoculación (dpi), tomadas con lámpara de UV. B) Gráfico de líneas que demuestra los valores de intensidad de fluorescencia (media \pm error estándar) de las plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (n=6) infectadas con el virus en el transcurso del tiempo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre la planta mutante comparada con el ecotipo silvestre Col O.

4.2.2. Infección local y sistémica producida por TuMV del género *Potyvirus* en plantas mutantes *bag6*, *bag7* y *skp1*

La acumulación local de TuMV-GFP fue examinada a los 8 dpi en las hojas inoculadas. El NC_{Int} se comparó entre las hojas Col-O y las hojas de las líneas mutantes ($n=6$) (Figura 24A). No se presentaron cambios significativos ($p > 0.1$) al comparar el NC_{Int} de las hojas de líneas mutantes *skp1*, *bag 6* o *bag 7* con hojas Col-O. Consistente con estos resultados, los análisis de Western blot (Figura 24B) en al menos tres réplicas, indicaron que la proteína de la cubierta viral de TuMV se encontraba acumulada en cantidades similares en las hojas de las plantas de *A. thaliana* mutantes y las hojas control Col-O.

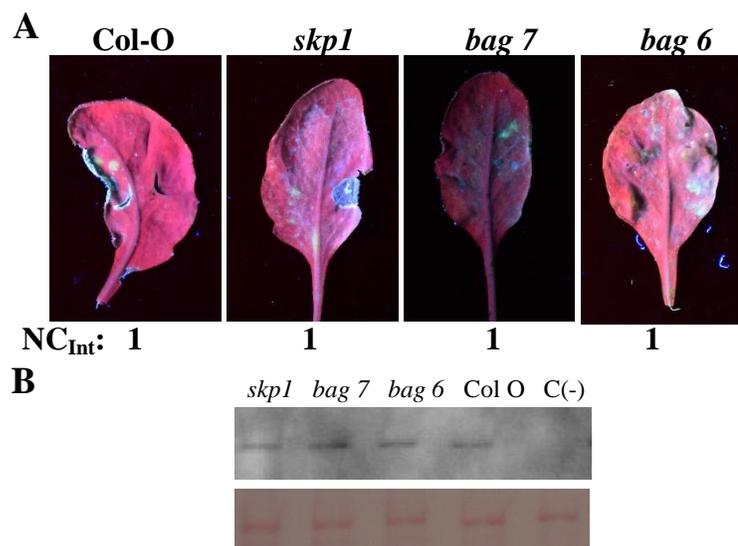


Figura 24. Infección local de TuMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag 6*, *bag 7* y *skp1*. A) Fotografías representativas de hojas inoculadas a los 8 dpi. B) Detección de la cubierta viral de TuMV (34 kDa) en hojas inoculadas a los 8 dpi, mediante Western blot. La tinción Ponceau S abajo de los Western blots demuestra que la cantidad de proteína cargada fue similar en cada pocillo. C(-) es el control negativo representado por hojas de *A. thaliana* sin inocular. NC_{Int} : nivel de cambio de la intensidad de fluorescencia con respecto a Col O.

De manera similar a los anteriores experimentos, se analizó el porcentaje de plantas *bag6*, *bag7* y *skp1* ($n = 24$) y plantas control Col O ($n = 24$) que presentaban infección sistémica causada por TuMV-GFP (Figura 25). A los 10 dpi, el 33% de las plantas Col O, el 18% de las plantas *bag6*, el 25% de las plantas *skp1* y el 28% de las plantas *bag7* presentaron infección sistémica. Mientras que, a los 12 dpi se observó que el 49% de las plantas Col O, el 36% de las plantas *bag6*, el 50% de las plantas *skp1* y el 45% de las plantas *bag7* se encontraban infectadas sistémicamente. Estos datos muestran que las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bag6*, *bag 7* y *skp1*, a diferencia de las mutantes para los genes *bzip*, presentaron una susceptibilidad a TuMV-GFP menor o similar que las plantas control Col O a los 10 o 12 dpi.

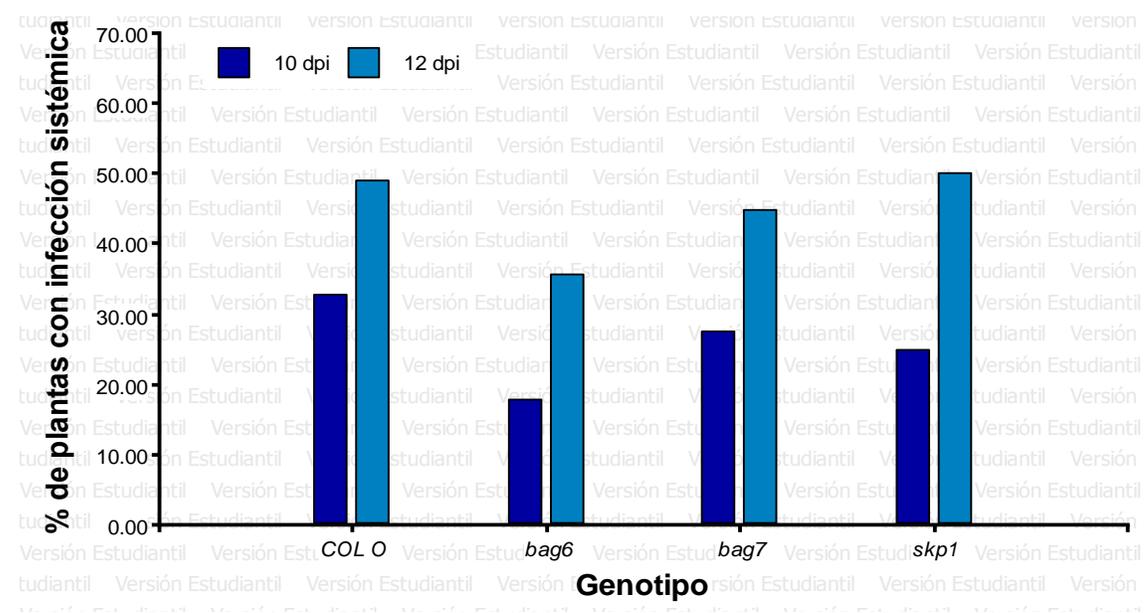


Figura 25. Porcentaje de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag6*, *bag7* y *skp1* ($n=24$) con presencia de infección sistémica causada por TuMV-GFP en el tejido foliar a los 10 y 12 dpi.

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col O ($n=6$) y las plantas mutantes ($n=6$) *bag6*, *bag7* y *skp1* infectadas con TuMV-GFP también fueron fotografiadas a los 10, 12, 17 y 19 dpi (Figura 26A). El gráfico de líneas (Figura 26B) demostró que las plantas *bag7* presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en el tejido sistémico en el transcurso del tiempo con respecto a Col O ($p \leq 0.05$). Mientras

que, no hubo diferencia significativa en la acumulación sistémica de TuMV-GFP en las plantas *bag6* y *skp1* con respecto a Col O ($p > 0.1$).

Estos datos revelan que la pérdida de la expresión de *bag7* permite el incremento de la propagación sistémica de TuMV-GFP en el tejido foliar, demostrando que BAG7 también juega un papel fundamental en la restricción del movimiento sistémico de TuMV en *Arabidopsis thaliana*.

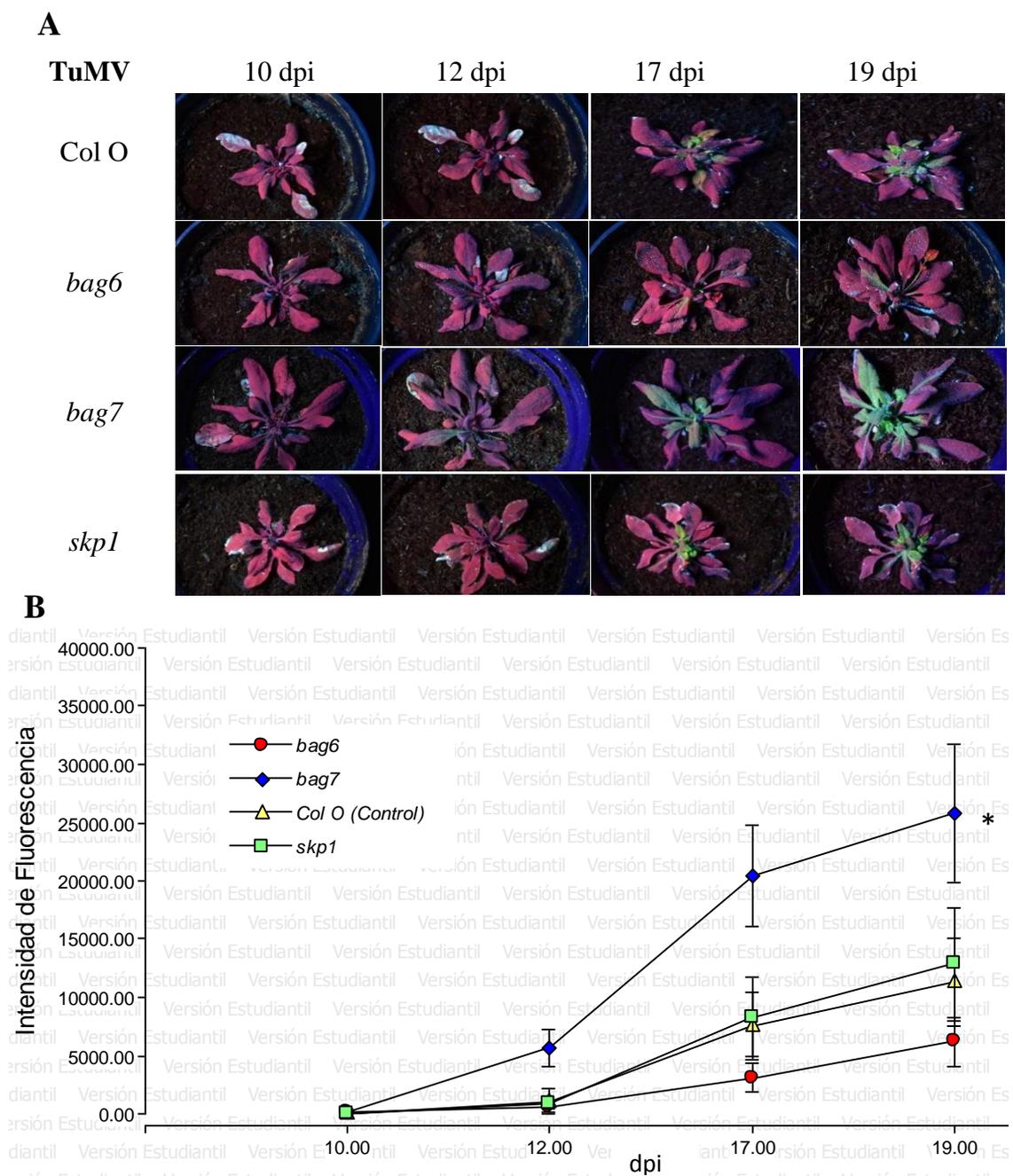


Figura 26. Infección sistémica de TuMV-GFP en plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes de los genes *bag6*, *bag7* y *skp1*. A) Fotografías de la propagación del virus a diferentes días post inoculación (dpi), tomadas con lámpara de UV. B) Gráfico de líneas que demuestra los valores de intensidad de fluorescencia (media \pm error estándar) de las plantas silvestres y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (n=6) infectadas con el virus en el transcurso del tiempo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre la planta mutante comparada con el ecotipo silvestre Col O.

Con respecto a los genes involucrados en la PCD, se encontró un aumento en la diseminación tanto de PIAMV-GFP como de TuMV-GFP en plantas mutantes *bag7*, al compararlas con *Arabidopsis thaliana* Col O. Mientras que, las plantas mutantes para el gen *bag6* no presentaron una diferencia significativa en la acumulación de ambos virus con respecto a Col O. Entonces BAG7 limita el movimiento de PIAMV y TuMV, sugiriendo que podría actuar como un factor del huésped que permite la restricción de ambos virus.

Aunque la información acerca de la familia de proteínas BAG en plantas es limitada, más aún durante una infección viral, recientes investigaciones han demostrado las diferentes respuestas que presentan a estímulos bióticos y abióticos. En el análisis *in silico* llevado a cabo por Nawkar y colaboradores (2017), no se reportó una inducción de *bag7* pero sí de *bag6* en respuesta al hongo necrotrófico *Botrytis cinerea* y a *Pseudomonas syringae* DC3000. Se demostró que a diferencia de BAG7, BAG6 si contribuye a la resistencia específica de *Botrytis cinerea* en *Arabidopsis thaliana* (Doukhanina et al., 2006; Li, Kabbage, Liu, & Dickman, 2016). Además, las líneas mutantes *bag7* presentaron mayor susceptibilidad al estrés del ER provocado por calor y frío (Williams et al., 2010), mientras que las plantas *bag6* no indicaron un cambio significativo a esos elicitores (Kang et al., 2006). Dichos resultados son consistentes con los obtenidos en esta investigación, ya que demuestran que BAG6 y BAG7 tienen diferentes respuestas bajo condiciones de estrés.

Li y colaboradores (2016) mencionan que BAG7 interactúa con bZIP28 y BiP2, así coordinan la señalización desde el ER hacia el núcleo como parte de la UPR para aliviar el estrés provocado por el calor. En base a este modelo y a los resultados que reflejaron la importancia de BAG7 y bZIP28 en la limitación del movimiento de TuMV-GFP, se propone que ambas proteínas podrían interactuar para mitigar el estrés producido por la infección viral de TuMV. El incremento de los niveles de *BiP2* en respuesta a TuMV-6K2 (Arias, 2017) proporcionan soporte a esta idea.

Por otra parte, Ye et al (2011) ha observado que TGB₃, proteína de movimiento en los *Potexvirus* y elicitor de la UPR, induce el aumento de la expresión de los genes

skp1 y *bzip60* en una fase temprana de la infección. Como se demostró en los resultados de las Figuras 17 y 23, en las plantas de *skp1* y *bzip60* la propagación de PIAMV-GFP (*Potexvirus*) se incrementó en comparación con las plantas control Col O. Se podría mencionar que la inducción de dichos genes es llevada a cabo para proteger a la planta durante el ataque de PIAMV.

Aunque no se demostró una evidencia de la interacción directa entre las proteínas virales y los sensores de estrés del ER, con estos resultados es lógico mencionar que las células de la planta movilizan la maquinaria de la UPR para protegerse durante la infección viral. Sin embargo, más investigaciones son requeridas al respecto.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La acumulación local de PIAMV en las hojas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bzip60*, *bzip60/bzip17* y *bzip17* fue de siete a nueve veces mayor que el control silvestre Col O, hecho confirmado por los análisis de Western blot para la cubierta viral. Se puede concluir que tanto bZIP60 como bZIP17 limitan la infección local de PIAMV en *Arabidopsis thaliana*.

La acumulación local de TuMV en las hojas de las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes para los genes *bzip60* y *bzip28* fue tres veces mayor que el control silvestre Col O, hecho confirmado por los análisis de Western blot para la cubierta viral. Se puede concluir que tanto bZIP60 como bZIP28 limitan la infección local de TuMV en *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis thaliana* bZIP60 es un factor del huésped que permite la restricción viral tanto para PIAMV como para TuMV, mientras que bZIP17 y bZIP28 son factores específicos que restringen la infección para PIAMV o TuMV, respectivamente.

La pérdida de la expresión de *bzip60* y/o *bzip17* incrementó de forma similar la propagación local y sistémicamente de PIAMV en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana*. Se deduce que bZIP60 y bZIP17 restringen la infección causada por PIAMV, sugiriendo la formación de heterodímeros entre ambas proteínas que activan genes para tal propósito.

La pérdida de la expresión de *bzip60* y/o *bzip28* incrementó de forma similar la propagación local y sistémicamente de TuMV en el tejido foliar de *Arabidopsis thaliana*. Se infiere, por tanto, que bZIP60 y bZIP28 restringen la infección causada por TuMV, sugiriendo la formación de heterodímeros entre ambas proteínas que activan genes para tal propósito.

Los mutantes *bag7* y *skp1* presentaron una diseminación local de PIAMV siete y tres veces mayor, respectivamente al compararlas con Col O. Por el contrario, la acumulación local de TuMV no varió entre estos mutantes y Col O. Hechos

corroborados, además, en los análisis de la cubierta viral mediante la técnica de Western blot. Por ello se puede concluir que BAG7 y SKP1 limitan específicamente la propagación local de PIAMV.

En las plantas mutantes para el gen *bag7* se presentó un aumento en la acumulación sistémica de PIAMV y TuMV. Se concluye que BAG7 limita el movimiento sistémico de ambos virus en *Arabidopsis thaliana*.

En las plantas mutantes para el gen *skp1* existió un incremento en la propagación sistémica de PIAMV. Por el contrario, la cantidad de TuMV no varió entre estos mutantes y las plantas silvestre Col O. Se deduce que SKP1 además limita el movimiento sistémico de PIAMV en *Arabidopsis thaliana*.

En *Arabidopsis thaliana* BAG7 es un factor del huésped que restringe la infección de PIAMV y TuMV, mientras que SKP1 únicamente restringe la infección viral para PIAMV.

Existió un incremento en la cantidad de plantas infectadas sistémicamente por PIAMV y TuMV, en los mutantes de los genes *bzip17*, *bzip28* y *bzip60* a los 10 y 12 días post inoculación en comparación con el control silvestre Col O. Mientras que los mutantes de los genes involucrados en la PCD: *bag6*, *bag7* y *skp1* presentaron similar o menor cantidad de plantas infectadas sistémicamente por PIAMV y TuMV a los 10 y 12 días post inoculación en comparación con el control silvestre Col O.

La eliminación de los sensores del estrés del ER como bZIP60, bZIP17, bZIP28, BAG7 o SKP1 permitió una mayor acumulación de PIAMV o TuMV, indicando que el mecanismo de la UPR de cierta forma proporciona protección contra la infección viral en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Debido a que el conocimiento acerca de la activación de la UPR en plantas es limitado y más aún en virus, se recomienda incrementar las investigaciones que permitan un mejor entendimiento de esta ruta para así diseñar e implementar cultivos de importancia económica que contengan genes de resistencia a las infecciones virales, logrando una medida más efectiva, económica y ecológica para controlarlas.

Sería interesante investigar cuál es el comportamiento de bZIP60, bZIP17, bZIP28, BAG7 y SKP1 en plantas de papa (*Solanum tuberosum*) durante la infección causada por PVX (*Potexvirus*) y PVY (*Potyvirus*), para comparar si dichos sensores se activan de forma similar ante la infección de virus de la misma familia en distintos huéspedes y así implementar estrategias biotecnológicas que permitan reducir el impacto de estas enfermedades en su rendimiento y comercialización.

Se debería realizar ensayos de co-inmunoprecipitación para confirmar las interacciones entre bZIP60 y bZIP17 o bZIP60 y bZIP28.

Se recomienda analizar cómo los sensores de estrés del ER reconocen a los patógenos y desencadenan la cascada de señalización de la UPR en las plantas.

Se debería realizar análisis en los que se utilice las proteínas BiP durante la infección viral para determinar en qué medida limitan o contribuyen a su propagación.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamakis, I. D. S., Panteris, E., & Eleftheriou, E. P. (2011). The fatal effect of tungsten on *Pisum sativum* L. root cells: Indications for endoplasmic reticulum stress-induced programmed cell death. *Planta*, 234(1), 21–34. doi:10.1007/s00425-011-1372-5
- Adams, M., Antoniw, J., & Beudoin, F. (2005). Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 471–487. doi:10.1111/J.1364-3703.2005.00296.X
- Ahlquist, P. (2006). Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (5), 371–382.
- Ahlquist, P., Noueir, A. O., Lee, W., Kushner, D. B., & Dye, B. T. (2003). Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Journal of Virology*, 77(15), 8181–8186. doi:10.1128/JVI.77.15.8181
- Al-Shehbaz, IA., & O'Kane,SL.(2002). The Arabidopsis Book. The American Society of Plant Biologists; Taxonomy and phylogeny of Arabidopsis (Brassicaceae) pp. 1–22.
- Arias, O. (2017). Virus- Induced ER stress in plants. Oklahoma State University, United States of America.
- Arias Gaguancela, O. P., Zúñiga, L. P., Arias, A. V., Halterman, D., Flores, F. J., Johansen, I. E., ... Verchot-Lubicz, J. (2016). The IRE1/bZIP60 pathway and Bax inhibitor 1 suppress systemic accumulation of potyviruses and potexviruses in Arabidopsis and *N. benthamiana* plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(10), MPMI-07-16-0147-R. doi:10.1094/MPMI-07-16-0147-R
- Atabekov, J.G., Rodionova, N.P., Karpova, O.V., Kozlovsky, S.V., Poljakov, V.Y. (2000). The movement protein-triggered in situ conversion of Potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology*. 271, 259–263.

- Bao, Y., & Howell, S. H. (2017). The Unfolded Protein Response Supports Plant Development and Defense as well as Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–6. doi:10.3389/fpls.2017.00344
- Beauchemin, C., Boutet, N., & Laliberté, J.-F. (2007). Visualization of the Interaction between the Precursors of VPg , the Viral Protein Linked to the Genome of Turnip Mosaic Virus , and the Translation Eukaryotic Initiation Factor iso 4E In Planta . *Journal of Virology*, 81(2), 775–782. doi:10.1128/JVI.01277-06
- Benali-Furet, N. L., Chami, M., Houel, L., De Giorgi, F., Vernejoul, F., Lagorce, D., Buscail, L., Bartenschlager, R., Ichas, F., Rizzuto, R., & Paterlini-Brechot, P. (2005). Hepatitis C virus core triggers apoptosis in liver cells by inducing ER stress and ER calcium depletion. *Oncogene*, 24,4921-4933
- Bennett, MD., Leitch, IJ., Price, HJ., & Johnston JS. (2003). Comparisons with Caenorhabditis (approximately 100 Mb) and Drosophila (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in Arabidopsis to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the Arabidopsis genome initiative estimate of approximately 125 Mb. *Annals of Botany*. 91:547–557. doi: 10.1093/aob/mcg057
- Bio-Rad bulletin 6040. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. Recuperado de: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf
- Bio-Rad bulletin 2895. Protein Blotting Guide. Recuperado de: www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf
- Blalock, E. (2003). Experimental Design and Data Analysis. En Blalock, E (Ed.), A beginner's guide to microarrays. Boston: Kluwer Academic Publisher, USA.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Bray, EA. (2004). Genes commonly regulated by water-deficit stress in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot*, 55, 2331–2341.

- Burrows, M., & Zitter, T. (2005). Virus Problems of Potatoes. Recuperado de: http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Potato_Virus.htm
- Carette, J.E., Stuiver, M., Van Lent, J., Wellink, J., & Van Kammen, A. (2000). Cowpea mosaic virus infection induces a massive proliferation of endoplasmic reticulum but not Golgi membranes and is dependent on de novo membrane synthesis. *J. Virol.* 74 (14), 6556–6563
- Chan, S. (2014). The unfolded protein response in virus infections. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–2. doi:10.3389/fmicb.2014.00518
- Chen, Y & Brandizzi, F. (2013a). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol.* 23, 547–555.
- Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013b). Analysis of Unfolded Protein Response in Arabidopsis Yani. *Methods Mol Biol.*, 1043, 73–80. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-532-3>
- Cheng, Y.T., Li, Y., Huang, S., Huang, Y., Dong, X., Zhang, Y. and Li, X. (2011) Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 14 694–14 699.
- Cho, J., Choi, H., Kim, J., Kim, K., & Kim, K. (2003). Symptom variances in mixed infections of six turnip mosaic virus and one ribgrass mosaic virus isolates in crucifers. *Plant Pathol.J.*, 19(2), 111–116. doi:10.5423/PPJ.2003.19.2.111
- Chung, B. Y., Miller, W. A., Atkins, J. F., & Firth, A. E. (2008). An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5897–5902.
- Comité Internacional de la Taxonomía de Virus (ICTV). (2016). Virus Taxonomy: 2016 Release. Recuperado de: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., ... Laliberté, J.-F. (2009). Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *Journal of Virology*, 83(20), 10460–71. doi:10.1128/JVI.00819-09
- Cui, H., & Wang, A. (2016). Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of

- Infection. *Journal of Virology*, 90(10), 5119–5131. doi:10.1128/JVI.00024-16.Editor
- Daròs JA, Schaad MC, Carrington JC. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J Virol.* 73:8732–40.
- Deng, Y., Humbert, S., Liu, JX., Srivastava, R., Rothstein, SJ., Howell, SH. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108,7247–7252. doi: 10.1016/j.jprot.2013.04.023
- Deng, Y., Srivastava, R., & Howell, S. H. (2013). Protein kinase and ribonuclease domains of IRE1 confer stress tolerance, vegetative growth, and reproductive development in Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 110(48), 19633–8. doi:10.1073/pnas.1314749110
- Diaz A, Gallei A, & Ahlquist P. (2012). Bromovirus RNA replication compartment formation requires concerted action of 1a's self-interacting RNA capping and helicase domains. *J Virol*, 86:821-834.
- Dolja VV, McBride HJ, Carrington JC. (1992). Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of b-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 10 208–10 212.
- Doukhanina, E. V., Chen, S., Van Der Zalm, E., Godzik, A., Reed, J., & Dickman, M. B. (2006). Identification and functional characterization of the BAG protein family in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18793–18801. doi:10.1074/jbc.M511794200
- Duwi Fanata, W., Lee, S. Y., & Lee, K. O. (2013). The unfolded protein response in plants: A fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses. *Journal of Proteomics*, 93, 356–368. doi:10.1016/j.jprot.2013.04.023
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science.* 5: 199–206.
- Fernández, A., Guo, H. S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., & García, J. A. (1997). The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in

- NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Research*, 25, 4474–4480.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2008). Año internacional de la papa. Recuperado de <http://www.fao.org/potato-2008/es/index.html>.
- Gfeller, A., Liechti, R. and Farmer, E.E. (2010). Arabidopsis jasmonate signaling pathway. *Sci. Signal* 3, cm4. doi: 10.1126/scisignal.3109cm4
- Goldbach, R., Wellink, J., Verver, J., van Kammen, A., Kasteel, D., & van Lent, J. (1994). Adaptation of positive-strand RNA viruses to plants. En Brinton, M.A., Calisher, C.H., & Rueckert, R. (Eds.). Positive-Strand RNA Viruses. Archives of Virology Supplementum, vol 9. Springer, Vienna
- Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H., Laliberté, JF. (2012). Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J Virol*. 86: 9255–9265
- Grangeon, R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H., & Laliberté, J. (2013). 6K 2 - induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2013.00351
- Guillemette, T., Calmes, B., & Simoneau, P. (2014). Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence*, 5(2), 357–364. doi:10.4161/viru.26772
- Hamada T, Tominaga M, Fukaya T, Nakamura M, Nakano A, Watanabe Y, Hashimoto T, Baskin TI. (2012). RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant Cell Physiol*, 53,699-708
- Heinlein, M. (2015). Plant virus replication and movement. *Virology*, 657–671. doi:10.1016/j.virol.2015.01.025
- Heinlein, M., Padgett, H.S., Gens, J.S., Pickard, B.G., Casper, S.J., Epel, B.L., Beachy, R.N. (1998). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell*, 10 (7), 1107–1120

- Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V., & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–24. doi:10.3389/fpls.2013.00154
- Howell, S. H. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol*, 64, 477–499. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120053
- Hrabak, E. M., Chan, C.W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., et al. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*. 132, 666–680. doi: 10.1104/pp.102.011999
- Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*. Academic Press, San Diego, CA.
- Hwang, Y.T., McCartney, A.W., Gidda, S.K., Mullen, R.T. (2008). Localization of the Carnation Italian ringspot virus replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex. *BMC Cell Biol*. 9, 54.
- Ivanov, K. I., Eskelin, K., Lo, A., & Ma, K. (2014). Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *Journal of General Virology*, 1415–1429. doi:10.1099/vir.0.064220-0
- Iwata Y, Fedoroff NV, Koizumi N (2008) Arabidopsis bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Plant Cell*, 20(11):3107–3121
- Iwata, Y., & Koizumi, N. (2005). An Arabidopsis transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 5280–5285.
- Iwata, Y., & Koizumi, N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends in Plant Science*, 17(12), 720–727. doi:10.1016/j.tplants.2012.06.014
- Iwata, Y., Yoneda, M., Yanagawa, Y., and Koizumi, N. (2009). Characteristics of the nuclear form of the Arabidopsis transcription factor AtbZIP60 during the endoplasmic reticulum stress response. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 865–869
- Janda, M., Haisel, D., Jind, B., Fousek, J., Burketová, L., Noemi, Č., & Moravec, T. (2015). Growth and stress response in Arabidopsis thaliana, Nicotiana

- benthamiana , Glycine max , Solanum tuberosum and Brassica napus cultivated under polychromatic LEDs. *Plant Methods*, 11, 1–14. doi:10.1186/s13007-015-0076-4
- Jiang,J., & Laliberté,J. (2016). Membrane Association for Plant Virus Replication and Movement. En Wang, A., & Zhou, X. (Eds.). *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 67-86). Cham, Switzerland: Springer. doi:10.1007/978-3-319-32919-2-3
- Johnson, J. A., Bragg, J. N., Lawrence, D. M., & Jackson, A. O. (2003). Sequence elements controlling expression of Barley stripe mosaic virus subgenomic RNAs in vivo. *Virology*. 313(1), 66-80.
- Kabbage, M., Kessens, R., & Dickman, M. B. (2016). A plant Bcl-2-associated athanogene is proteolytically activated to confer fungal resistance. *Microbial Cell*, 3(5), 224–226. doi:10.15698/mic2016.05.501
- Kalinina, N.O., Rakitina, D.A., Solovyev, A.G., Schiemann, J., Morozov, S.Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*. 296, 321–329.
- Kang, C.H., Jung,W. Y., Kang, Y.H., Kim, J. Y., Kim, D.G., Jeong, J. C., Baek, D.W., Jin, J. B., Lee, J. Y., Kim, M.O., Chung,W. S., Mengiste,T.,Koiwa, H., Kwak, S. S.,Bahk, J.D., Lee,S. Y.,Nam, J. S.,Yun,D. J., & Cho,M. J. (2006). AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death Differ*. 13, 84–95
- Kang, S., Oh, S., Kim, J., Choi, D., & Baek, K. (2010). NMMP1 , a Matrix Metalloprotease in Nicotiana benthamiana Has a Role in Protection against Bacterial Infection. *Plant Pathol.J.*, 26(4), 402–408. doi:10.5423/PPJ.2010.26.4.402
- Kim, I., Xu, W., & Reed, J. C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature*, 7. doi:10.1038/nrd2755
- Kim, K., & Hemenway, C. L. (1999). Long-distance RNA – RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *Cambridge University Press*, 636–645.

- King, A. M. Q., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (Eds). (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press. London.
- Koizumi, N., Martinez, IM., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H., Chrispeels, MJ. (2001). Molecular characterization of two arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases. *Plant Physiol*, 127, 949–962
- Komatsu, K., Hashimoto, M., Maejima, K., Shiraishi, T., Neriya, Y., Miura, C., ... Namba, S. (2011). A Necrosis-Inducing Elicitor Domain Encoded by Both Symptomatic and Asymptomatic *Plantago asiatica* mosaic virus Isolates , Whose Expression Is Modulated by Virus Replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(4), 408–420.
- Komatsu, K., Yamaji, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Kagiwada, S., Takahashi, S., & Namba, S. (2008). Report Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. *Arch Virol*, 153(1), 193–198. doi:10.1007/s00705-007-1078-y
- Kørner, C. J., Du, X., Vollmer, M. E., & Pajeroska-Mukhtar, K. M. (2015). Endoplasmic reticulum stress signaling in plant immunity???at the crossroad of life and death. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26582–26598. doi:10.3390/ijms161125964
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife*, 4, e06100. <http://doi.org/10.7554/eLife.06100>
- Kriechbaumer, V., Botchway, SW., Slade, SE., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, KJ., Hawes C. (2015). Reticulomics: protein–protein interaction studies with two plasmodesmata-localised reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, ER and the plasma membrane. *Plant Physiol*, 169, 1933–1945
- Labiberté, J.-F., Sanfaçon, H., & Sanfaçon, E. (2010). Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 69–91. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114239

- Langenberg, W. G., & Zhang, L. Y. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology*, 118, 243–247
- Li, Y., Humbert, S., Howell, S. H. (2012). ZmbZIP60 mRNA is spliced in maize in response to ER stress. *BMC Res. Notes*, 5, 144.
- Li, Y., Kabbage, M., Liu, W., & Dickman, M. B. (2016). Aspartyl protease mediated cleavage of AtBAG6 is necessary for autophagy and fungal resistance in plants. *The Plant Cell*, 28, 233–247. doi:10.1105/tpc.15.00626
- Li, Y., Williams, B., & Dickman, M. (2016). Arabidopsis B-cell lymphoma2 (Bcl-2)-associated athanogene 7 (BAG7)-mediated heat tolerance requires translocation, sumoylation and binding to WRKY29. *New Phytologist*, 2. doi:10.1111/nph.14388
- Liu, C., & Nelson, R. S. (2013). The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Front Plant Sci*, 4, 1–10. doi:10.3389/fpls.2013.00012
- Liu, J. X., & Howell, S. H. (2016). Managing the protein folding demands in the endoplasmic reticulum of plants. *New Phytologist*, 211(2), 418–428. doi:10.1111/nph.13915
- Liu, J., & Howell, S. H. (2010). bZIP28 and NF-Y Transcription Factors Are Activated by ER Stress and Assemble into a Transcriptional Complex to Regulate Stress Response Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22, 782–796. doi:10.1105/tpc.109.072173
- Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007a). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in Arabidopsis Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *The Plant Cell Online*, 19(12), 4111–4119. doi:10.1105/tpc.106.050021
- Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., & Howell, S. H. (2007b). Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *The Plant Journal*, 51(5), 897–909. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03195.x

- Mandal, D. M. J. B. S. B. (2014). Expression of symptoms, viral coat protein and silencing suppressor gene during mixed infection of a N – Wi strain of potato virus Y and an asymptomatic strain of potato virus X. *VirusDis.*, 25(3), 314–321. doi:10.1007/s13337-014-0204-1
- Martelli, G. P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., & Dolja, V. V. (2007). Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 73–100. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401
- Martínez F, Daròs JA. (2014). Tobacco etch virus protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *J Virol*, 88:10725–10737. doi:10.1128 /JVI.00928-14
- Martínez, F., Rodrigo, G., Aragonés, V., Ruiz, M., Lodewijk, I., Fernández, U., ... Daròs, J. (2016). Interaction network of tobacco etch potyvirus NIa protein with the host proteome during infection. *BMC Genomics*, 1–13. doi:10.1186/s12864-016-2394-y
- Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, et al. (2009) Spermine signaling plays a significant role in the defense response of Arabidopsis thaliana to cucumber mosaic virus. *J Plant Physiol*, 166: 626–643
- Meng, M., & Lee, C. (2017). Function and Structural Organization of the Replication Protein of Bamboo mosaic virus. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.00522
- Moreno, A. A., Mukhtar, M. S., Blanco, F., Boatwright, J. L., Moreno, I., Jordan, M. R., ... Pajerowska-Mukhtar, K. M. (2012). IRE1/bZIP60-mediated unfolded protein response plays distinct roles in plant immunity and abiotic stress responses. *PLoS ONE*, 7(2). doi:10.1371/journal.pone.0031944
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). Biochimica et Biophysica Acta NAC transcription factors in plant abiotic stress responses . *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 97–103. doi:10.1016/j.bbagrm.2011.10.005
- Nawkar, G. M., Maibam, P., Park, J. H., Woo, S. G., Kim, C. Y., Lee, S. Y., & Kang, C. H. (2017). In silico study on Arabidopsis BAG gene expression in response to

- environmental stresses. *Protoplasma*, 254(1), 409–421. doi:10.1007/s00709-016-0961-3
- Nic-Can,G & De la Peña,C. (2012). Determination of Histone Methylation in Mono-and Dicotyledonous Plants. En Loyola, V & Ochoa,N. (Eds.). *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 877, do: 10.1007/978-1-61779-818-4_24
- Noh, S., & Kwon, CS. (2002). Characterization of two homologs of Ire1p, a kinase/endoribonuclease in yeast, in *Arabidopsis thaliana*. *BBA-Gene Struct Expr*, 1575,130–134.
- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., & Iwawaki, T. (2010). Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1?? *Nucleic Acids Research*, 38(18), 6265–6273. doi:10.1093/nar/gkq452
- Okushima, Y., Koizumi, N., Yamaguchi, Y., Kimata, Y., Kohno, K., Sano, H. (2002). Isolation and characterization of a putative transducer of endoplasmic reticulum stress in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*. 43:532–539
- Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K. Maejima, K., Himeno, M., Senshu, H., Kawanishi, T., Kagiwada, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2009). The N-terminal region of the *Plantago asiatica* mosaic virus coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 22:677-685.
- Park, M.-R., Jeong, R.-D., & Kim, K. (2014). Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. *Front Plant Sci.*, 5, 1–12. doi:10.3389/fpls.2014.00060
- Pasin F, Simón-Mateo C, García JA. (2014). The hypervariable amino- terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathog*,10:e1003985. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003985>.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer,O., Kretsch, T., Richards, K.E., Genschik, P. and Ziegler-Graff, V. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1994–1999.

- Piquerez, S. J. M., Harvey, S. E., Beynon, J. L., & Ntoukakis, V. (2014). Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Frontiers in Plant Science*, 5(DEC), 671. doi:10.3389/fpls.2014.00671
- Rajamäki ML, Kelloniemi J, Alminaitte A, Kekarainen T, Rabenstein F, Valkonen JP. (2005). A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology*. 342:88–101. doi: 10.1016/j.virol .2005.07.019.
- Revers, F., & García, J. A. (2015). Molecular Biology of Potyviruses. *Advances in Virus Research* (1st ed.). Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.aivir.2014.11.006
- Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piequet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., Pfeiffer, P. (2002). Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J. Virol.* 76 (17), 8808–8819
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E., Pirone, E. D., & Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, 74, 1945–1949.
- Roossinck, M. J. (2012). Plant Virus Metagenomics : Biodiversity and Ecology. *Annu Rev Genet*, 46, 359–369. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155600
- Ruberti, C., & Brandizzi, F. (2014). Conserved and plant-unique strategies for overcoming endoplasmic reticulum stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–8. doi:10.3389/fpls.2014.00069
- Ruberti, C., Kim, S.-J., Stefano, G., & Brandizzi, F. (2015). Unfolded protein response in plants: one master, many questions. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 59–66. doi:10.1016/j.pbi.2015.05.016
- Ryu, K. H., & Hong, J. S. (2009). *Potexvirus*. En Mahy,B & Van Regenmortel, M (Eds.), Desk encyclopedia of plant and fungal virology (pp, 298-302). London: Elsevier Academic Press, UK.
- Schaad M. C., Jensen P. E., Carrington J. C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16, 4049–4059.

- Schoelz, J. E., Harries, P. A., & Nelson, R. S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant*, 4(5), 813-831. doi: 10.1093/mp/ssr070
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1–2), 29–63. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.056
- Selote, D., and Kachroo, A. (2010). RIN4-like proteins mediate resistance protein-derived soybean defense against *Pseudomonas syringae*. *Plant Signal. Behav.* 5, 1453–1456. doi: 10.1104/pp.110.158147
- Seo, Jang-Kyun., & Kim, Kook-Hyung. (2016). Long-Distance Movement of Viruses in Plants. En Wang, A., & Zhou, X. (Eds.). *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 153-172). Cham, Switzerland: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-32919-2_6
- Shen W, Yan P, Gao L, Pan X, Wu J, et al. (2010). Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Mol Plant Pathol.* 11: 335–346
- Singh, A. K., Sharma, V., Pal, A. K., Acharya, V., and Ahuja, P. S. (2013). Genome-wide organization and expression profiling of the NAC transcription factor family in potato (*Solanum tuberosum* L.). *DNA Res.* 20, 403–423.
- Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C., and Schubert, J. (2008). The naming of Potato virus Y strains infecting potato. *Arch. Virol.* 153:1-13
- Sitia, R., Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature*, 426: 891–894.
- Smalle, J. and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 555–590.
- Snyder, C., Stefano, GB. (2015). Mitochondria and chloroplasts shared in animal and plant tissues: significance of communication. *Med Sci Monit*, 21, 1507-1511
- Song ZT, Sun L, Lu SJ, Tian Y, Ding Y, Liu JX. (2015). Transcription factor interaction with COMPASS-like complex regulates histone H3K4 trimethylation for specific

- gene expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112: 2900–2905
- Srivastava, R., Deng, Y., Shah, S., Rao, A. G., & Howell, S. H. (2013). BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(4), 1416–29. doi:10.1105/tpc.113.110684
- Sun, L., Lu, S. J., Zhang, S. S., Zhou, S. F., Sun, L., & Liu, J. X. (2013). The lumen-facing domain is important for the biological function and organelle-to-organelle movement of BZIP28 during ER stress in arabidopsis. *Molecular Plant*, 6(5), 1605–1615. doi:10.1093/mp/sst059
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13, 184–190.
- Takayama, S., & Reed, J.C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat. Cell Biol.* 3: E237–E241
- Tian, D., Traw, M. B., Chen, J. Q., Kreitman, M., and Bergelson, J. (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in Arabidopsis thaliana. *Nature*, 423, 74–77
- Tian, Y. P., Liu, J. L., Zhang, C. L., Liu, Y. Y., Wang, B., Li, X., ... Valkonen, J. P. T. (2011). Genetic Diversity of Potato virus Y Infecting Tobacco Crops in China. *Phytopathology*, 101(3), 377–387.
- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N., & Oparka, K. J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *J Cell Biol.* 201(7), 981-995. doi: 10.1083/jcb.201304003
- Tsai, Y. C., & Weissman, A. M. (2010). The Unfolded Protein Response , Degradation from the Endoplasmic Reticulum , and Cancer. *Genes Cancer*, 1, 764–778. doi:10.1177/1947601910383011
- Turner, K.A., Sit, T.L., Callaway, A.S., Allen, N.S., & Lommel, S.A. (2004). Red clover necrotic mosaic virus replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. *Virology*. 320 (2), 276–290
- Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74:157–175

- Valli, A., Gallo, A., Calvo, M., Pérez, J. d. J., & García, J. A. (2014). A novel role of the potyviral helper component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. *Journal of Virology*, 88, 9808–9818.
- Verchot J, Koonin EV, Carrington JC. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of a potyviral polyprotein functions as a third virus- encoded proteinase. *Virology*. 185:527–535. [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90522-D](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(91)90522-D).
- Verchot, J. (2014a). Targeting the Unfolded Protein response for reducing virus infection in potato. Recuperado de <https://portal.nifa.usda.gov/web/crisprojectpages/1001883-targeting-the-unfolded-protein-response-for-reducing-virus-infection-in-potato.html>.
- Verchot, J. (2014b). The ER quality control and ER associated degradation machineries are vital for viral pathogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 66. doi:10.3389/fpls.2014.00066
- Verchot, J. (2016). How does the stressed out ER find relief during virus infection? *Current Opinion in Virology*, 17, 74–79. doi:10.1016/j.coviro.2016.01.018
- Verchot, J., Angell, S. M., & Baulcombe, D. C. (1998). In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *J. Virol.* 72, 8316–8320
- Verchot-lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O., & Gilmer, D. (2010). Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block – Encoding Viruses. *Mol. Plant Microbe Interact*, 23(10), 1231–1247.
- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-takekuchi, N., & Miller, W. A. (2012). Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N- PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog*, 8(4). doi:10.1371/journal.ppat.1002639
- ViralZone. (2008). Potexvirus. Recuperado de: http://viralzone.expasy.org/272?outline=all_by_species
- ViralZone. (2012). Potyvirus. Recuperado de: <http://viralzone.expasy.org/50>
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*. 103, 157–167.

- Walsh, J., & Jenner, C. (2002). Pathogen profile. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology*, 3(5), 289–300.
- Wan, S., & Jiang, L. (2016). Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma*, 253(3), 753–764. doi:10.1007/s00709-015-0842-1
- Wang, X., Basnayake, B.M.V. S., Zhang, H., Li, G., Li, W., Virk, N., et al. (2009). The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1227–1238
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., et al. (2010). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens*. 6, e1000962.
- Williams, B., Kabbage, M., Britt, R., & Dickman, M. B. (2010). AtBAG7, an Arabidopsis Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(13), 6088–6093. doi:10.1073/pnas.0912670107
- Williams, B., Verchot, J., & Dickman, M. B. (2014). When supply does not meet demand-ER stress and plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 5, 211. doi:10.3389/fpls.2014.00211
- Xu, M.-R., Huang, L.-Y., Zhang, F., Zhu, L.-H., Zhou, Y.-L., and Li, Z.-K. (2013). Genome-wide phylogenetic analysis of stress-activated protein kinase genes in rice (OsSAPKs) and expression profiling in response to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* infection. *Plant Mol. Biol. Rep.* 31, 877–885. doi: 10.1007/s11105-013-0559-2
- Yang, L., Xu, Y., Liu, Y., Meng, D., Jin, T., & Zhou, X. (2016). HC-Pro viral suppressor from tobacco vein banding mosaic virus interferes with DNA methylation and activates the salicylic acid pathway. *Virology*, 497, 244-250. doi: 10.1016/j.virol.2016.07.024

- Yang, Z. T., Lu, S. J., Wang, M. J., Bi, D. L., Sun, L., Zhou, S. F., & Liu, J. X. (2014). A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in Arabidopsis. *Plant Journal*, 79(6), 1033–1043. doi:10.1111/tpj.12604
- Yang, Z.-T., Wang, M.-J., Sun, L., Lu, S.-J., Bi, D.-L., Sun, L., ... Liu, J.-X. (2014). The Membrane-Associated Transcription Factor NAC089 Controls ER-Stress-Induced Programmed Cell Death in Plants. *PLoS Genetics*, 10(3), e1004243. doi:10.1371/journal.pgen.1004243
- Ye, C. M., Chen, S., Payton, M., Dickman, M. B., & Verchot, J. (2013). TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. *Molecular Plant Pathology*, 14(3), 241–255. doi:10.1111/mpp.12000
- Ye, C., Dickman, M. B., Whitham, S. A., Payton, M., & Verchot, J. (2011). The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein. *Plant Physiology*, 156(2), 741–755. doi:10.1104/pp.111.174110
- Zhang, D., Vjestica, A., & Oliferenko, S. (2012). Plasma membrane tethering of the cortical ER necessitates its finely reticulated architecture. *Current Biology*, 22(21), 2048–2052. doi:10.1016/j.cub.2012.08.047
- Zhang, L., Chen, H., Brandizzi, F., Verchot, J., & Wang, A. (2015). The UPR Branch IRE1-bZIP60 in Plants Plays an Essential Role in Viral Infection and Is Complementary to the Only UPR Pathway in Yeast. *PLoS Genetics*, 11(4), 1–37. doi:10.1371/journal.pgen.1005164
- Zhang, L., & Wang, A. (2016). ER Stress, UPR and Virus Infections in Plants. In Wang, A., & Zhou, X. (Eds.). *Current Research Topics in Plant Virology* (pp. 173-195). Cham, Switzerland: Springer. doi:10.1007/978-3-319-32919-2-7
- Zheng, X., Miller, N.D., Lewis, D.R., Christians, M.J., Lee, K.H., Muday, G.K., Spalding, E.P., & Vierstra, R.D. (2011). AUXIN UP-REGULATED F-BOX PROTEIN1 regulates the cross talk between auxin transport and cytokinin signaling during plant root growth. *Plant Physiol.* 156, 1878–1893.

