



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

MÉTODOS MOLECULARES Y GENÉTICOS PARA EL ESTUDIO DE *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* EN PLANTAS

TANIA OCAMPO OCAMPO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2017


CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe M.C. Tania Ocampo Ocampo, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Métodos moleculares y genéticos para el estudio de Tomato spotted wilt virus (TSWV) en plantas

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 14 de Noviembre de 2017


Firma del
Alumno (a)


Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Métodos moleculares y genéticos para el estudio de *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* en plantas**, realizada por la alumna: **Tania Ocampo Ocampo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

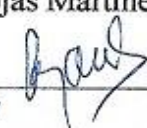
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

ASESOR




Dr. Sergio Ramírez Rojas

ASESOR



Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán

ASESOR



Dra. Erika Janet Zamora Macorra

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2017.

MÉTODOS MOLECULARES Y GENÉTICOS PARA EL ESTUDIO DE *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) EN PLANTAS

Tania Ocampo Ocampo, DC.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

El TSWV se encuentra entre los virus más importantes que infectan plantas, debido a sus características genéticas, biológicas y su amplia distribución. El TSWV tiene la capacidad de infectar a un amplio número de especies de plantas de importancia económica. Tiene la habilidad de formar distintos aislamientos por la recombinación de sus tres fragmentos de ARN y por su alta frecuencia de error de su replicasa. Asimismo, tiene la capacidad de romper la resistencia en diversas especies de plantas. Dichas características se deben a que el genoma del TSWV está compuesto por tres cadenas de ARN, los cuales son nombrados como segmento grande (L), mediano (M) y pequeño (S). El segmento S codifica a la proteína NSs, que está involucrada en suprimir el mecanismo de silenciamiento de ARN con la finalidad de realizar una eficaz infección en el hospedante. Sin embargo, no se conoce como interfiere la proteína NSs en la actividad de los componentes que conforman el mecanismo de silenciamiento de ARN de la planta. Por lo cual, el objetivo de la presente investigación fue clonar el fragmento NSs con la ayuda de técnicas moleculares y genéticas. Con base en los análisis moleculares y genéticos, los cuales sirvieron para identificar y monitorear el fragmento NSs, se demostró el comportamiento de los clones del fragmento NSs al suprimir el mecanismo de silenciamiento de ARN de la planta. La generación y utilización de los clones del fragmento NSs, ayudara a comprender y a generar bases para determinar su mecanismo en el proceso de silenciamiento génico de la planta cuando es infectada por el TSWV.

Palabras claves: TSWV, proteína NSs, silenciamiento génico.

MOLECULAR AND GENETIC METHODS FOR THE STUDY OF *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) IN PLANTS

Tania Ocampo Ocampo, DC.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

TSWV has the ability to infect a wide range of plant species of economic importance. TSWV is among the most important viruses that infect plants, due to its genetic, biological characteristics and wide distribution. TSWV it has the capacity to form different isolates by the recombination of its three fragments of RNA and by the high frequency of replicase error. Furthermore, it has the ability to break resistance in several plant species. These characteristics are due to the fact TSWV genome is composed of three RNA strands, which are named as large (L), medium (M) and small (S) segments. The S segment encoded to the NSs protein, which is involved in suppressing the RNA silencing, with the purpose of an effective infection in the host. However, the role of NSs silencing suppression in virus infection and movement has not been determined. For this reason, the objective of the present investigation was to clone the NSs fragment using molecular and genetic techniques. Based on molecular and genetic analyzes was demonstrated the behavior of clones of the NSs fragment by suppressing the mechanism of RNA silencing of the host. The generation and utilization of clones of the NSs fragment will help us to understand and generate bases for determining the gene silencing process of the plant during TSWV infection.

Key words: TSWV, NSs protein, gene silencing.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado durante mis estudios de Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas del Postgrado de Fitosanidad-Fitopatología por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

A mi consejo particular: Dra. Reyna I. Rojas Martínez, Dr. Sergio Ramírez Rojas, Dr. Héctor Lozoya Saldaña, Dra. María del Pilar Rodríguez Guzmán y a la Dra. Erika Janet Zamora Macorra por creer en mí, brindarme su apoyo, por su guía y conocimientos brindados durante esta etapa de mi vida.

A todos mis compañeros y amigos por compartir sus conocimientos y por su apoyo brindado durante estos 4 años de Doctorado.

Al Dr. Hernan Garcia-Ruiz por su guía y dirección en la etapa de investigación, así como a su familia por cobijarme durante mi estancia en la Universidad de Nebraska.

A la Universidad de Nebraska por brindarme sus instalaciones para la realización de la investigación.

A todas aquellas personas que directa e indirectamente permitieron la realización y conclusión de mi etapa de Postgrado.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme un día más de vida.

A mi madre y hermanos por su apoyo, comprensión, preocupación hacia mi persona, y sobre todo por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

A toda mi familia por su preocupación y apoyo recibido.

A Esteban por compartir sus días conmigo, y sobretodo porque siempre está apoyándome y motivándome para ser una mejor persona.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ASPECTOS FUNDAMENTALES Y RESEÑA DEL <i>Tomato spotted wilt virus</i> EN MÉXICO	3
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	3
Taxonomía.....	5
Estructura.....	6
Genoma.....	7
Ciclo de infección del TSWV	9
Transmisión por vectores.....	11
Diseminación.....	12
Síntomas.....	13
Sinergismo entre TSWV y otros virus	15
Distribución mundial.....	15
Distribución en México.....	16
Estatus normativo.....	16
Métodos de control.....	17
CONCLUSIONES	25
LITERATURA CITADA.....	26
CAPÍTULO 2. ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS CONTRA VIRUS FITOPATÓGENOS	35
RESUMEN.....	35
ABSTRACT.....	35
INTRODUCCIÓN	36
Historia del silenciamiento génico	37
Mecanismo del silenciamiento génico en plantas inducido por virus	38
Características de las proteínas implicadas en el mecanismo de silenciamiento génico: DCL, AGO y RDR.....	39
Formación de ARN pequeños involucrados en el mecanismo de silenciamiento génico en plantas: miARN y siARN	44
Supresores virales del silenciamiento génico en plantas.....	47
Aplicaciones del silenciamiento génico	55

CONCLUSIONES	59
LITERATURA CITADA.....	60
CHAPTER 3. ANTIVIRAL RNA SILENCING SUPPRESSION ACTIVITY OF <i>Tomato spotted wilt virus</i> NSS PROTEIN	72
ABSTRACT.....	72
INTRODUCTION	72
MATERIAL AND METHODS.....	75
RESULTS.....	81
DISCUSSION	91
ACKNOWLEDGMENTS.....	93
REFERENCES	94
SUPPLEMENTARY MATERIAL	98

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies de virus pertenecientes al género Tospovirus.....	6
Cuadro 2. Síntomas ocasionados por TSWV en algunas especies vegetales de importancia agrícola.	14
Cuadro 3. Distribución en México del TSWV en diferentes cultivos agrícolas.	16
Cuadro 4. Material vegetativo que debe ingresar a México libre de TSWV de acuerdo a la NOM-007-FITO-1995.	17
Cuadro 5. Agentes de control biológico utilizados contra <i>Frankliniella occidentalis</i>	23
Cuadro 6. Insecticidas recomendados por SENASICA y DGIAAP (2011) para el control de <i>F. occidentalis</i>	24
Cuadro 7. Proteínas DCL involucradas en la ruta de silenciamiento génico en <i>A. thaliana</i>	41
Cuadro 8. Proteínas RDRs que intervienen en el mecanismo de silenciamiento génico en plantas.	44
Cuadro 9. Proteínas supresoras de virus en plantas y sus funciones en el mecanismo de silenciamiento génico*.	49
Cuadro 10. Virus usados en el silenciamiento génico para inducir el mecanismo VIGS. ...	56

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

- Figura 1.** A) Estructura y componentes de la partícula viral del TSWV. B) Organización genómica del TSWV. El tamaño del ARN y proteínas se indica en kilobases (kb) y kilo Daltons (kDa), respectivamente. Modificado de Eifan *et al.*, 2013. ... 9
- Figura 2.** Ciclo de infección del TSWV dentro de una célula vegetal. Modificado de van Knippenberg, 2005. 11
- Figura 3.** Distribución mundial del TSWV y de su vector *F. occidentalis* (EPPO, 1999; Plantwise, 2016). 15

Capítulo 3:

- Figure 1.** *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome organization and systemic symptoms..... 74
- Figure 2.** *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) virion purification and genomic RNA extraction. Total and virion protein and RNA extracted from 20 g mock-inoculated (-) or TSWV-infected (+) *Nicotiana benthamiana* plants at 21 days post inoculation..... 82
- Figure 3.** NSs clones and amino acid sequence..... 84
- Figure 4.** Suppression of transgene silencing by NSs. Single-stranded green fluorescent protein (ssGFP) was infiltrated alone or in combination with NSs in *Nicotiana benthamiana* 16c leaves. Beta-glucuronidase (GUS) and P19 were used as negative and positive controls, respectively. Five days after infiltration, GFP fluorescence was visualized under ultraviolet light. The histogram shows average GFP fluorescence \pm standard error relative to leaves infiltrated with P19, based on 16 leaves from two independent experiments. Bars with the same letter do not significantly differ (Tukey's test with $\alpha = 0.05$). UTR = untranslated region. 85
- Figure 5.** Complementation of suppressor-deficient *Turnip crinkle virus*-green fluorescent protein (TCV-GFP) and *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-GFP by NSs in *Nicotiana benthamiana*. Twelve leaves were infiltrated per treatment and visualized under ultraviolet light 6 days later. Green spots are local infection foci. Average numbers of visible local infection foci per leaf are given below pictures. The histogram shows average number of local infection foci \pm standard error, relative to that observed on leaves infiltrated with P19. Bars with the same letter are not statistically different (Tukey's test with $\alpha = 0.05$). GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region.. 86
- Figure 6.** Virus and virus-derived small RNA (sRNA) accumulation. *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-green fluorescent protein (GFP) was co-infiltrated at an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.125 with NSs (OD₆₀₀= 0.5) or controls

in *Nicotiana benthamiana*. Four days after infiltration, photographs were taken and samples collected for protein and RNA extraction. Accumulation of TuMV-AS9-GFP coat protein (CP), NSs transcript, and TuMV-AS9-GFP-derived small interfering RNA (siRNA) was determined in four biological replicates. GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region..... 88

Figure 7. Virus-induced green fluorescent protein (GFP) silencing after mechanical inoculation of *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-GFP 1 day after infiltration of NSs or controls in *Nicotiana benthamiana* 16c plants. Photographs were taken and infection efficiency is expressed as in Figure 5. GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region. 90

S1 Figure. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) virion purification. 98

S2 Figure. NSs cloning strategy. Two versions were cloned, one containing and one lacking the 5' untranslated region (UTR). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products were ligated into pENTR and subsequently inserted in pMDC32.. 99

INTRODUCCIÓN

El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) tiene la capacidad de infectar más de 1 000 especies de plantas, como monocotiledóneas o dicotiledóneas, causando grandes pérdidas económicas al reducir la calidad de frutas, hortalizas y ornamentales (Pappua *et al.*, 2009).

Algunos de los hospedantes del TSWV de importancia agrícola son: jitomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annum*), papa (*Solanum tuberosum*), lechuga (*Lactuca sativa*), chícharo (*Pisum sativum*), cacahuete (*Arachys hypogaea*), cebolla (*Allium cepa*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), apio (*Apium graveolens*), y varias especies de plantas ornamentales como el crisantemo (*Chrysantemun morifolium*), dalia (*Dahlia* sp.), gerbera (*Gerbera jamesonii*), iris (*Iris* spp.), begonia (*Begonia* sp.) y zinnia (*Zinnia elegans*) (Best, 1968; Morales-Díaz *et al.*, 2008). TSWV se ha encontrado en plantas silvestres que sirven como reservorios y fuente de inóculo primario, el cual no es transferido a través de semilla (Cho *et al.*, 1987a).

El TSWV presenta una gran variación genética debido a las siguientes características:

- Alta frecuencia de error de la replicasa viral (de Oliveira *et al.*, 1992; Kaye *et al.*, 2011)
- Capacidad del virus de replicarse en los trips que actúan como vectores (Margaría *et al.*, 2014).
- Recombinación molecular (Bag *et al.*, 2012).
- Organización tripartita de su genoma, lo que permite el reordenamiento de fragmentos completos para formar distintos aislados o especies (Aramburu *et al.*, 2007).

El genoma del TSWV está compuesto por tres cadenas de ARN, cubiertas por la nucleoproteína N (de Haan *et al.*, 1991; Heinze *et al.*, 2001). Los tres segmentos de ARN son nombrados como segmento grande (L), mediano (M) y pequeño (S) (Hu *et al.*, 2011; Law y Moyer, 1990).

En el segmento S se encuentra codificada la proteína no estructural denominada NSs, que está implicada en la inducción de síntomas y en la supresión del silenciamiento del ARN viral (Takeda *et al.*, 2002).

El mecanismo de silenciamiento de ARN, es el sistema de regulación de la expresión génica durante el desarrollo de la planta y contrarresta las enfermedades virales y de otros patógenos (García y Pallas, 2015). Los virus tienen proteínas que evaden de manera eficiente el mecanismo de silenciamiento de ARN, los cuales se denominan como supresores de silenciamiento de ARN (García y Pallas, 2015). En el caso de TSWV, la proteína NSs es un supresor de silenciamiento de ARN (Takeda *et al.*, 2002). Hasta el momento, se tienen reportes que la proteína NSs tiene la capacidad de unirse al ARN de doble cadena (ARNds) del virus (Díaz-Pendon y Ding, 2008; Schnettler *et al.*, 2010). También, la NSs se une al micro ARN precursor (pre-miARN) y al micro ARN (miARN), los cuales son los factores principales para activar la maquinaria de silenciamiento de ARN (Eifan *et al.*, 2013; Schnettler *et al.*, 2010). Sin embargo, no se cuenta con un amplio conocimiento sobre la interacción del TSWV con los genes endógenos de la planta que contrarrestan la infección viral.

Por tal motivo, debido al poco conocimiento de la actividad del TSWV frente a la maquinaria de silenciamiento de ARN viral de las plantas, en este trabajo se caracterizó al virus con la ayuda de técnicas moleculares y genéticas. Por lo tanto, uno de los objetivos fueron: 1) Clonar el fragmento NSs mediante la modificación de los protocolos de transmisión del virus y purificación de la nucleocápside viral, 2) Observar y demostrar el comportamiento de los clones del fragmento NSs al suprimir el mecanismo de silenciamiento de ARN. Teniendo como hipótesis que la generación y utilización de los clones del fragmento NSs, nos ayudara a comprender y a generar bases para determinar su mecanismo ante el proceso de silenciamiento génico de la planta cuando es infectada por el TSWV. También esta investigación permitirá determinar las características genéticas de este mecanismo en futuras investigaciones así como para establecer el proceso de infección, movimiento del virus y el desarrollo de los síntomas. Asimismo, dará pauta para nuevas investigaciones sobre los genes de la planta involucrados en el mecanismo de silenciamiento génico.

CAPÍTULO 1. ASPECTOS FUNDAMENTALES Y RESEÑA DEL *Tomato spotted wilt virus* EN MÉXICO

RESUMEN.

El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) se encuentra entre los virus fitopatógenos más importantes a nivel mundial a las pérdidas de producción que causa en diferentes cultivos, por su gran variedad de hospedantes y su fácil diseminación a través de insectos (trips) y material vegetativo. Tales características hacen que el TSWV constituya un riesgo potencial en cultivos de importancia económica. El presente escrito tiene como objetivo integrar la información relevante de las características del virus, así como su distribución en México y manejo, se discute el conocimiento generado y se sugieren algunas líneas de investigación. En México, el virus está reportado en los estados de Baja California Norte, México, Morelos, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Sinaloa, Querétaro y Zacatecas, infectando cultivos de jitomate, chile, tomate de cáscara, lechuga, pimiento, crisantemo, alstroemeria y zinnia. Hasta el momento, la erradicación del virus no ha sido efectiva en invernadero y campo. Por tal motivo, para su manejo se recomienda no utilizar una sola medida de control si no integrar diversos métodos culturales, genéticos, químicos y biológicos contra el virus o el vector. Además, es necesario generar conocimiento de la interacción planta hospedante-virus-vector al abarcar los aspectos moleculares para comprender dicha relación íntima, y de esta forma mejorar las estrategias de manejo del virus.

Palabras claves adicionales: TSWV, trips, hospedante.

ABSTRACT.

Tomato spotted wilt virus (TSWV) is among the most important phytopathogenic viruses in the worldwide due to the production losses in different crops, their range of hosts and their easy spread through thrips and vegetative material. These characteristics make the TSWV a potential risk in crops of economic importance. The purpose of this paper is to integrate the relevant information about the characteristics of the virus, as well as its distribution in Mexico and management, the knowledge generated is discussed and some lines of research are suggested. In Mexico, the virus is reported in the states of Baja California Norte, Mexico, Morelos, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Sinaloa, Queretaro and Zacatecas, Infecting crops of tomato, chilli, green tomato, lettuce, pepper, chrysanthemum, alstroemeria and zinnia. So far, virus eradication has not been fully effective in greenhouse and field. Therefore, it is recommended to integrate diverse cultural, genetic, chemical and biological methods, to counteract virus or vector, and not to use a single control measure. Furthermore is necessary to generate research in the plant-virus-vector interaction in the molecular aspects to understand this intimate relation, and thus generate new management strategies for the efficient control of the virus.

Key words: TSWV, thrips, host.

La enfermedad “marchitez manchada” del jitomate (tomato spotted wilt disease) fue descrita por primera vez en 1915 en el estado de Victoria, Australia, donde ocasionó pérdidas de 50 % en el cultivo de jitomate (Brittlebank, 1919). Después, se demostró que el agente causal de la enfermedad era un virus transmitido por trips (Pittman, 1927) al que se llamó *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, virus de la marchitez manchada del jitomate) (Samuel *et al.*, 1930). Años más tarde, el TSWV se reportó en el Reino Unido (Smith, 1931) y posteriormente en varios países de Europa, Asia, América y África durante la década de 1930 (Best, 1968). De 1940 a 1980 la incidencia de la enfermedad decreció y en 1980 resurgió en Norte América dispersándose a los demás continentes a través de los trips y actualmente está presente a nivel mundial (Kirk y Terry, 2003).

El TSWV puede infectar a 1 300 hospedantes (PLH, 2012b) pertenecientes a 15 familias de monocotiledóneas, 69 familias de dicotiledóneas y una familia de pteridofitas (Parrella *et al.*, 2003). El virus tiene gran relevancia por afectar la calidad y rendimiento de cultivos de importancia económica entre los que se encuentran: jitomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*), lechuga (*Lactuca sativa*), papa (*Solanum tuberosum*), cacahuete (*Arachys hypogaea*) y especies ornamentales como crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*), gerbera (*Gerbera jamesonii*), iris (*Iris* spp.), zinnia (*Zinnia elegans*), nochebuena (*Euphorbia pulcherrima*) y helecho (*Asplenium nidus*) (Sundaraj *et al.*, 2014; Parrella *et al.*, 2003; Wilson, 2001).

El TSWV se encuentra entre los virus fitopatógenos más importantes debido a las pérdidas económicas que ocasiona, la complejidad de la interacción virus-vector-planta, sus características genéticas y biológicas, y su amplia distribución (Scholthof *et al.*, 2011; Rybicki, 2015). Entre las principales características genéticas del TSWV, está su gran variabilidad debido a la alta frecuencia de error de su replicasa (de Oliveira *et al.*, 1992; Kaye *et al.*, 2011), su capacidad de replicarse en los trips (Margaria *et al.*, 2014) y la organización de su genoma en tres fragmentos de ARN que facilita su reorganización y recombinación para formar distintos aislados (Aramburu *et al.*, 2007; Bag *et al.*, 2012). También posee un alto grado de diversidad biológica expresada por la gran variedad de síntomas que ocasiona, las diferencias en patogenicidad y virulencia, su especificidad con ciertas especies de trips,

su amplia gama de hospedantes y su capacidad de romper la resistencia en diversas especies vegetales (Pappu *et al.*, 2009).

Debido a las características antes mencionadas, el TSWV continúa representando un peligro para diversos cultivos de importancia económica en el país. Por tal motivo, en el presente escrito se integra la información relevante de las características del virus, así como su distribución en México y manejo, se discute el conocimiento generado y se sugieren algunas líneas de investigación.

Taxonomía.

Hasta 1990 el *Tomato spotted wilt virus* se incluía dentro del “Grupo TSWV” como único miembro. Posteriormente, debido a las similitudes encontradas en la estructura y organización de su genoma, se ubicó en el actual sistema de clasificación del International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) dentro de la familia *Bunyaviridae* y género *Tospovirus* (Francki *et al.*, 1991; Milne y Francki, 1984). De acuerdo con el ICTV (2014), el TSWV se clasifica de la siguiente manera:

Grupo: Grupo V (-ssARN)

Orden: No asignado

Familia: *Bunyaviridae*

Subfamilia: No asignado

Género: *Tospovirus*

Especie: *Tomato spotted wilt virus*

Durante mucho tiempo, el TSWV se consideró como el único miembro del género *Tospovirus* hasta la descripción del *Impatiens necrotic spot virus* (INSV, virus de la mancha necrótica de los belenes) (Law y Moyer, 1990). Posteriormente, un creciente número de virus fueron descubiertos y clasificados dentro de dicho género. Actualmente, se ubican 27 especies de virus dentro del género *Tospovirus* (Cuadro 1), 11 de las cuales son especies confirmadas por el ICTV (ICTV, 2014) y 16 son especies tentativas (PLH, 2012a).

Cuadro 1. Especies de virus pertenecientes al género Tospovirus.

Especie	Acrónimo	Sinónimo	Referencia**
<i>Alstroemeria necrotic streak virus</i>	ANSV	*	1
<i>Bean necrotic mosaic virus</i>	BeNMV	*	1
<i>Calla lily chlorotic spot virus</i>	CCSV	*	1
<i>Capsicum chlorosis virus</i>	CaCV	<i>Tomato necrosis virus</i>	1
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>	CSNV	*	1
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	GBNV	<i>Peanut bud necrosis virus</i>	2
<i>Groundnut chlorotic fan-spot virus</i>	GCFSV	<i>Peanut chlorotic fan-spot virus</i>	1
<i>Groundnut ringspot virus</i>	GRSV	*	2
<i>Groundnut yellow spot virus</i>	GYSV	<i>Peanut yellow spot virus</i>	2
<i>Hippeastrum chlorotic ringspot virus</i>	HCRV	*	3
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	INSV	*	2
<i>Iris yellow spot virus</i>	IYSV	*	2
<i>Melon severe mosaic virus</i>	MeSMV	*	1
<i>Melon yellow spot virus</i>	MYSV	<i>Physalis severe mottle virus</i>	1
<i>Pepper necrotic spot virus</i>	PNSV	*	1
<i>Pepper chlorotic spot virus</i>	PCSV	*	4
<i>Polygonum ring spot virus</i>	PoRSV	*	2
<i>Soybean vein necrosis-associated virus</i>	SVNaV	*	1
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>	TCSV	*	2
<i>Tomato necrotic ringspot virus</i>	TNRV	*	1
<i>Tomato necrotic spot virus</i>	TNSV	*	1
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV	<i>Pineapple yellow spot virus</i>	2,5
<i>Tomato yellow ring virus</i>	TYRV	*	1
<i>Tomato zonate spot virus</i>	TZSV	*	1
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>	WBNV	*	2
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	WSMoV	*	2
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>	ZLCV	*	2

*Sin sinónimo; **1) PLH, 2012a; 2) ICTV, 2014; 3) Dong *et al.*, 2013; 4) Cheng *et al.*, 2014; 5) EPPO, 1999

Estructura.

La partícula del TSWV es de forma icosaédrica cubierta por una membrana lipídica derivada del hospedante en la cual se encuentran incrustadas dos proteínas virales llamadas G1 y G2 (Daughtrey *et al.*, 2000; Margaria *et al.*, 2015). La partícula viral mide entre 80 y

120 nm de diámetro (de Haan *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 2011) y está constituida de proteínas (65%), lípidos (20%), carbohidratos (7%) y ARN (5%) (Best, 1968).

Genoma.

El genoma del TSWV está compuesto por tres cadenas de ARN cubiertas por ribonucleoproteínas (RNPs) (Whitfield *et al.*, 2005) (Figura 1A). Las RNPs están conformadas por ARN viral (ARNv) y en menor cantidad ARN viral complementario (ARNvc) de la proteína de la nucleocápside (N) y de la proteína ARN polimerasa-ARN dependiente (RdRp) (Kormelink *et al.*, 1992; Whitfield *et al.*, 2005).

Las tres cadenas de ARN del genoma viral son nombradas como fragmento grande (L), mediano (M) y pequeño (S) (Hu *et al.*, 2011; Law y Moyer, 1990) (Figura 1B). La cadena de ARN del fragmento L es de sentido negativo, mientras que los fragmentos M y S son ambisentido, y miden 8.8, 4.8 y 2.9 kb, respectivamente (de Haan *et al.*, 1991; Heinze *et al.*, 2001) (Figura 1B). Las secuencias terminales 5' y 3' de los tres segmentos de ARN son idénticas en los primeros ocho nucleótidos, característica típica de las cadenas negativas de los virus con genoma ARN segmentado, las cuales se piensa que tienen una función importante en la replicación y transcripción del genoma (de Haan *et al.*, 1989; de Haan *et al.*, 1991).

El segmento L codifica la proteína RdRp de 331.5 kDa, la cual se encarga de la replicación y transcripción del genoma viral (Chapman *et al.*, 2003; de Haan *et al.*, 1991). Esta RdRp tiene una alta frecuencia de errores, lo que da origen a una gran variabilidad en los tres fragmentos virales (Kaye *et al.*, 2011). Recientemente, se encontraron evidencias de recombinación del fragmento L lo cual está asociado a la generación de nuevos aislamientos del TSWV (Margaria *et al.*, 2015).

El segmento M codifica en la cadena positiva a la proteína no estructural NSm de 33.6 kDa y en la cadena negativa a los precursores de las glicoproteínas G1 y G2 de 46 y 75 kDa, respectivamente (Kormelink *et al.*, 1992; Lewandowski y Adkins, 2005). La proteína NSm está implicada en el movimiento célula a célula del virus (Lewandowski y Adkins, 2005), forma una estructura tubular de 40 a 45 nm que modifica la estructura de los plasmodesmos para facilitar el movimiento del genoma viral en ausencia de otros componentes específicos del virus (Kormelink *et al.*, 1994, Storms *et al.*, 1995; van Lent y Schimtt-Keichinger, 2006).

Esta proteína también se ha encontrado en el epitelio del intestino medio del segundo instar larval de los trips vectores así como en las glándulas salivales y células musculares del intestino medio de los adultos (Storms *et al.*, 1995; Storms *et al.*, 1998; Storms *et al.*, 2002).

G1 y G2 son glicoproteínas que forman parte de la membrana viral y son las encargadas de ensamblar las partículas virales tanto en la planta como en el insecto vector (Kaye *et al.*, 2011; Kormelink *et al.*, 1992). Asimismo, estas proteínas tienen la capacidad de interactuar con las células intestinales de los trips, y son esenciales en la adquisición y transmisión del virus (Nagata *et al.*, 2000).

El segmento S codifica en la cadena positiva a la proteína NSs de 52.2 kDa y en la cadena negativa a la proteína N de 28.8 kDa (Aramburu *et al.*, 2007; Heinze *et al.*, 2001). NSs es una proteína implicada en la inducción de síntomas, rompimiento de la resistencia y en la supresión del silenciamiento del ARN viral (Margaria *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2002). El silenciamiento del ARN viral es un mecanismo de defensa del hospedante contra el virus (Aramburu *et al.*, 2007). Durante la supresión del silenciamiento de ARN viral, la proteína NSs funciona como secuestrador de ciertos ARNs pequeños de interferencia (siARNs), tiene la habilidad de unirse a cadenas largas de ARN bicatenario, micro ARN (miARN) y micro ARN precursor (pre-miARN) (Eifan *et al.*, 2013; García *et al.*, 2006; Schnettler *et al.*, 2010). La proteína NSs se une al ARN del fragmento S para impedir su reconocimiento y su degradación por las proteínas vegetales (Bag *et al.*, 2012). Por otra parte, se tienen reportes que la acumulación de NSs en el citoplasma coincide con el aumento de síntomas y de la virulencia (Kormelink *et al.*, 1992; Margaria *et al.*, 2007). Además, está implicada en la regulación de la traducción, apoptosis y en la actividad de la polimerasa viral (Colón-Ramos *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2001). También, tiene una función importante en la transmisión persistente del virus por trips, ya que puede localizarse y agregarse en forma paracristalina en el citoplasma de células de plantas e insectos (Kormelink *et al.*, 1992; Margaria *et al.*, 2014). Por otro lado, la N o proteína de la cubierta (CP), encapsida el ARN viral (Heinze *et al.*, 2001) y se asocia a la RdRp para formar ribonucleoproteínas activas (RNPs) que participan en la transcripción y la replicación del genoma viral (Kormelink *et al.*, 2011).

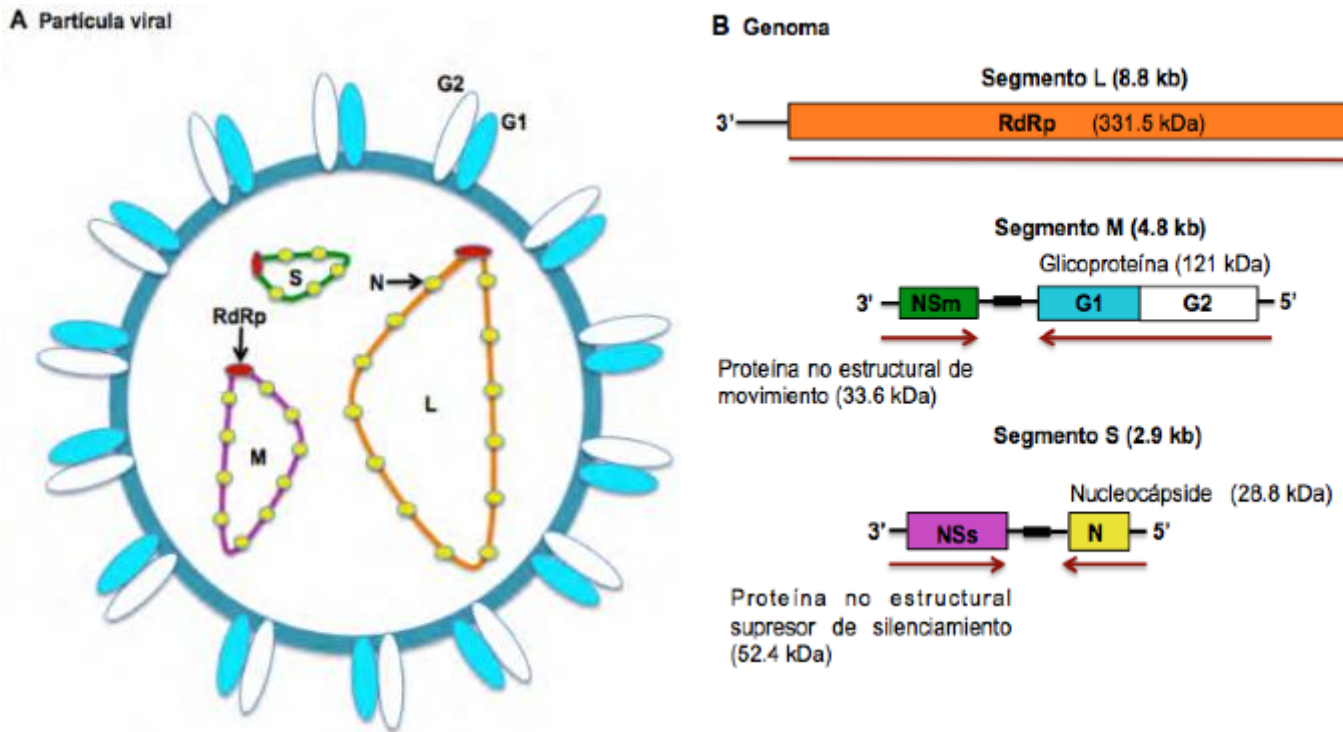


Figura 1. A) Estructura y componentes de la partícula viral del TSWV. B) Organización genómica del TSWV. El tamaño del ARN y proteínas se indica en kilobases (kb) y kilo Daltons (kDa), respectivamente. Modificado de Eifan *et al.*, 2013.

Ciclo de infección del TSWV

La infección ocasionada por el TSWV se inicia cuando el trips virulífero introduce la partícula viral en la célula vegetal al insertar su estilete para alimentarse de sus nutrientes (Whitfield *et al.*, 2008).

La membrana de glicoproteínas (G1 y G2) del virus se fusiona con la membrana vesicular de la célula vegetal y se separa de la partícula viral, liberando la nucleocápside en el citoplasma, activando las unidades independientes de transcripción y replicación que contiene el ARN viral, así como las enzimas que intervienen en estos procesos (van Knippenberg *et al.*, 2004; van Knippenberg, 2005).

Las ribonucleoproteínas activas (RNPs) presentes dentro del virión contienen ARN viral (ARN_v) y en menor cantidad ARN viral complementario (ARN_{vc}), las cuales se transcriben para formar los ARN mensajeros (ARN_m) virales que codifican para la proteína L, para las glicoproteínas G1 y G2, y la proteína N (Kormelink *et al.*, 1992; van Knippenberg,

2005). Posteriormente, las glicoproteínas pasan por un proceso de envoltura y se dividen proteolíticamente en dos proteínas (G1 y G2) (Naidu *et al.*, 2007; van Knippenberg, 2005).

Los ARNs mensajeros virales se traducen y las proteínas sintetizadas se acumulan en el citoplasma hasta alcanzar cierta concentración para iniciar nuevamente la replicación del genoma viral (van Knippenberg *et al.*, 2004; van Knippenberg, 2005). A continuación, cada segmento del genoma se copia por completo con la intervención de un conjunto de proteínas N y RdRp (Portela y Digard, 2002). En esta etapa puede activarse de manera independiente el cambio a la transcripción y, posteriormente, nuevamente a la replicación. En la nueva transcripción, se sintetizan los ARNm que codifican las proteínas NSs y NSm, completando la síntesis de proteínas virales (van Knippenberg *et al.*, 2004, van Knippenberg, 2005).

Los segmentos replicados son cubiertos por la proteína N y RdRp para formar nuevas RNPs, las cuales son transportadas a las células vecinas por las proteínas de movimiento célula-célula (NSm) (Soellick *et al.*, 2000; van Knippenberg, 2005). De esta manera, la infección avanza a las células vecinas provocando el movimiento sistémico del virus, el cual se facilita debido a que la proteína NSs suprime la resistencia del hospedante (Bag *et al.*, 2012; van Knippenberg, 2005).

La proteína estructural N, incluyendo las glicoproteínas, se acumulan en el aparato de Golgi para su maduración (Kuismanen *et al.*, 1984). Después, las partículas del virus envueltas en la cápside se fusionan en el retículo endoplásmico para unirse a las glicoproteínas establecidas en la cisterna del aparato de Golgi (Kikkert *et al.*, 1999; van Knippenberg, 2005).

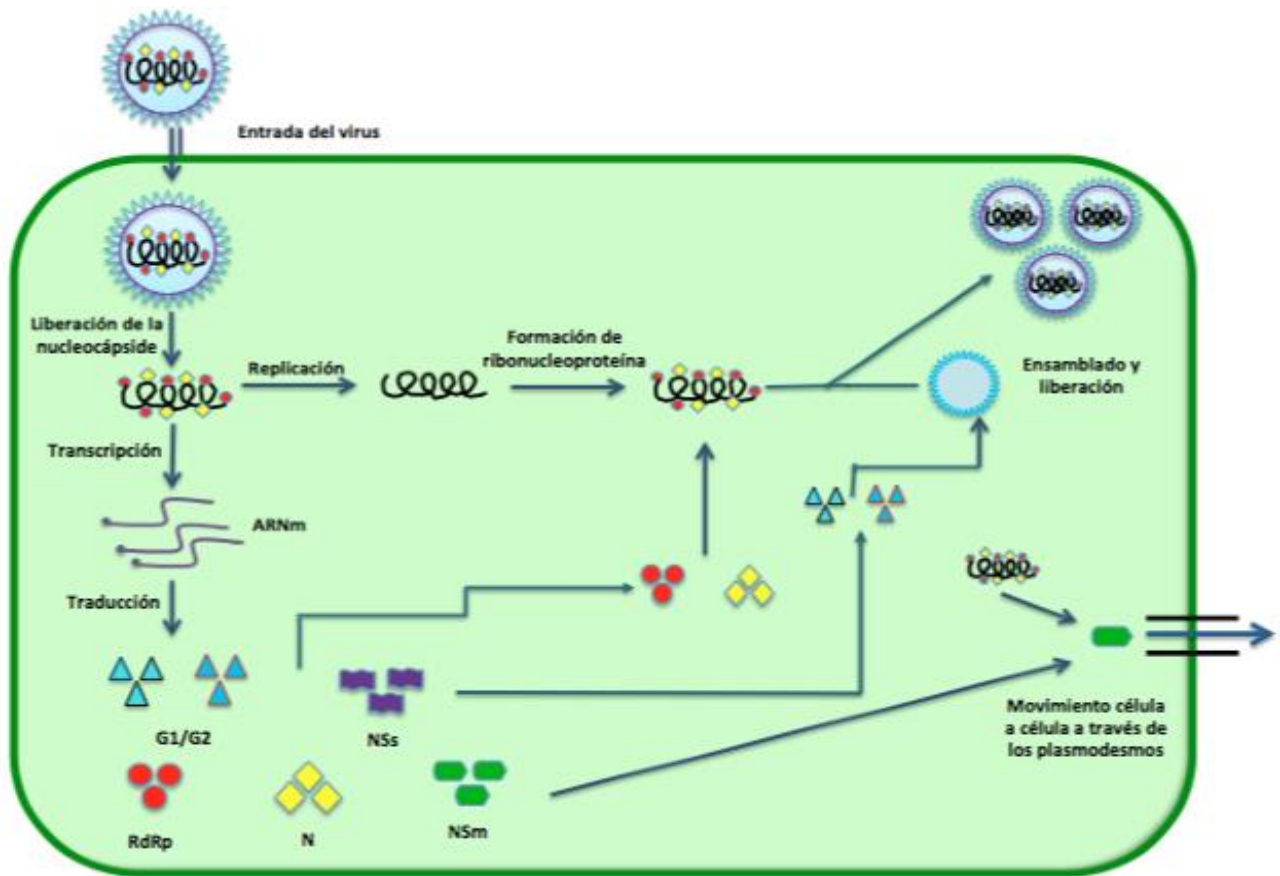


Figura 2. Ciclo de infección del TSWV dentro de una célula vegetal. Modificado de van Knippenberg, 2005.

Posteriormente, las partículas virales con envoltura se acumulan individualmente en las vesículas membranales para ser adquiridas por los trips en el momento de alimentarse y ser transmitidas a otras plantas (Kikkert *et al.*, 2001) (Figura 2).

Transmisión por vectores.

Las partículas virales son transmitidas por trips de forma persistente y transestadial (Whitfield *et al.*, 2008) a partir de plantas infectadas se replican dentro de ellos (Cho *et al.*, 1987). En la naturaleza, se conocen 10 especies de la familia Thripidae (Cho *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1990; Ohnishi *et al.* 2006; Sakimura, 1963; Ullman *et al.*, 2002; Wijkamp *et al.*, 1996; Wijkamp y Peters, 1993; Yeh *et al.*, 1992) que son vectores del TSWV:

1.- Trips occidental de las flores, *Frankliniella occidentalis*, es el vector más eficiente del TSWV.

- 2.- Trips común de la flor, *Frankliniella schultzei*.
- 3.- Trips de la cebolla, *Thrips tabaci*.
- 4.- Trips del tabaco, *Frankliniella fusca*.
- 5.- Trips de las flores, *Frankliniella intonsa*.
- 6.- *Frankliniella bispinosa*.
7. *Frankliniella cephalica*.
8. *Frankliniella gemina*.
- 9.- Trips del melón, *Thrips palmi*.
- 10.- *Thrips setosus*.

El virus es adquirido por los trips durante el primero y segundo instar larval cuando hay una asociación temporal entre el intestino medio, músculos viscerales y glándulas salivales permaneciendo virulífero hasta el estado adulto (Moritz *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando el TSWV es adquirido en la etapa adulta no se puede transmitir por una insuficiente multiplicación viral en el intestino medio, y por su poco movimiento y multiplicación a través de las glándulas salivales (Wijkamp *et al.*, 1996). Además, es importante mencionar que el virus no es transmitido a través de los huevecillos (Moritz *et al.*, 2004).

La adquisición del virus por las larvas de trips dura de 50 a 100 minutos dependiendo de la planta hospedante (Hull, 2004) y una vez adquirido comienza su replicación en las células epiteliales del intestino medio de donde se mueve a las células del músculo del intestino. Después, el virus llega y se replica en las glándulas salivales, propagándose de esta manera en el cuerpo del insecto (Badillo-Vargas *et al.*, 2012).

Los trips virulíferos prefieren alimentarse de las plantas infectadas con TSWV que de las sanas, ya que el virus suprime la respuesta anti-herbívoro al tiempo que estimula la activación de la ruta del ácido jasmónico en el hospedante (Abe *et al.*, 2012).

Diseminación

El TSWV es diseminado en la naturaleza únicamente por su insecto vector, que son las 10 especies de trips antes indicadas (Ullman *et al.*, 2002; Whitfield *et al.*, 2005). Además, por medio del comercio internacional y nacional, el virus puede ser dispersado a partir de material vegetal propagativo como plántulas, bulbos, cormos, raíces, rizomas, tallos,

tubérculos, esquejes, estacas o varetas, yemas, acodos y cultivos *in vitro* (EPPO, 1999; PLH, 2012b; Wilson 2001). A nivel nacional, se ha observado la diseminación del virus a través de la movilidad de plantas contaminadas con TSWV que pueden estar infestadas por el vector (EPPO, 1999). Hasta el momento, no se han encontrado evidencias de su transmisión por semilla (Pappu *et al.*, 2009).

Síntomas

Las plantas infectadas con virus muestran una variedad de síntomas cuya apariencia y severidad depende del genotipo, el estado de desarrollo de la planta, el aislamiento del virus y las condiciones ambientales (Jaramillo *et al.*, 2012). En este último caso, la luminosidad, humedad y temperatura son factores importantes en la expresión de síntomas y es posible que haya infecciones asintomáticas, o bien, que los síntomas sean diferentes si las condiciones ambientales no son las adecuadas. Otro aspecto importante que afecta la expresión de síntomas es el estado fenológico de la planta (en etapas tempranas hay mayor daño y los síntomas son más severos) y el nivel de nutrición del hospedante (Matthews, 1981).

Los síntomas foliares ocasionados por TSWV pueden ser clorosis, mosaico, moteado, estriado, anillos necróticos o cloróticos, malformaciones, enrollamiento, amarillamiento y necrosis de las venas; mientras que en el tallo típicamente produce necrosis, y en general las plantas presentan achaparramiento y marchitez (Domínguez y Crespo, 2008; EPPO, 1999). En los frutos se observan necrosis, manchas anulares cloróticas, amarillas o de tonos verde más claros y anillos concéntricos (Mumford *et al.*, 1996). El virus se puede encontrar en casi todos los tejidos y órganos de la planta porque ocasiona síntomas sistémicos (Agrios, 2010). A continuación, se describen los síntomas originados por TSWV en algunas plantas de importancia económica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Síntomas ocasionados por TSWV en algunas especies vegetales de importancia agrícola.

Hospedante	Síntomas				Referencias
	Hoja	Tallo	Fruto/flor	Sistémico	
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Bronceado, enrollamiento y necrosis	Necrosis	Áreas con anillos concéntricos de color pálido	Achaparramiento	Martínez <i>et al.</i> , 2014
Chile (<i>Capsicum annuum</i>)	Clorosis, mosaico y necrosis	Estrías necróticas que se extienden hasta los brotes terminales	Necrosis, manchas amarillas con anillos concéntricos y manchas anulares	Achaparramiento y clorosis	Martínez <i>et al.</i> , 2014; Zindović <i>et al.</i> , 2011
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	Clorosis, necrosis y deformación	NA	NA	Crecimiento unilateral de la planta y marchitez	Agenor <i>et al.</i> , 2008; Kamberoglu y Alan, 2011
Tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i>)	Manchas anulares o necróticas y anillos cloróticos	Necrosis	NR	Marchitez	Adkins <i>et al.</i> , 2006; De la Torre-Almaráz <i>et al.</i> , 2002
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	Manchas blancas	NR	NR	NR	Stanković <i>et al.</i> , 2012
Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	Manchas cloróticas, anulares y necróticas, anillos concéntricos	Entrenudos acortados	Agrietamiento	Necrosis y achaparramiento de la planta	Kaye <i>et al.</i> , 2011
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	Clorosis y necrosis	Lesiones acuosas y encorvamiento en los ápices	Deformación y anillos verdes en un fondo de color amarillo	Defoliación	Gonsalves y Trujillo, 1986
Crisantemo (<i>Dendranthema grandiflorum</i>)	Manchas necróticas, circulares cloróticas, deformación y engrosamiento de nervaduras	Anillos concéntricos cloróticos y necrosis	Malformación y necrosis	Clorosis, marchitez, achaparramiento y muerte de la planta	Bong-Nam <i>et al.</i> , 2006; Renukadevi <i>et al.</i> , 2015
Gerbera (<i>Gerbera</i> sp.)	Necrosis, clorosis, anillos concéntricos y deformación	NR	Malformación	NR	Marys <i>et al.</i> , 2014; Stanković <i>et al.</i> , 2011
Zinnia (<i>Zinnia elegans</i>)	Clorosis, anillos concéntricos necróticos y mosaicos	Disminución del tamaño	Pérdida del color de los pétalos y deformación	Achaparramiento y marchitez	Morales-Díaz <i>et al.</i> , 2008

NA. No aplica; NR. No hay reportes.

Sinergismo entre TSWV y otros virus

El sinergismo es la interacción entre dos o más virus ocasionando síntomas más severos en los hospedantes en comparación con aquellos causados por un solo virus (Salazar, 1995). El sinergismo puede ser mutuo cuando ambos virus aumentan su concentración; unilateral cuando solo uno de ellos presenta aumento en su concentración viral o neutral cuando no hay ningún cambio en la concentración viral de ambos; el aumento de dicha concentración en la planta se debe a que se ayudan en la replicación y al movimiento sistémico (Bag *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que el sinergismo entre tospovirus facilita la recombinación genética de sus tres fragmentos del genoma originando nuevas especies de virus (Bag *et al.*, 2012). Actualmente, se tienen reportes de interacciones entre los tospovirus GBNV y WBNV en sandía, TSWV e IYSV en cebolla, y TSWV e INSV en plantas ornamentales (Ghotbi *et al.*, 2005; Mullis *et al.*, 2004).

Distribución mundial

El TSWV es un virus cosmopolita por lo que se encuentra presente en la mayoría de los países debido principalmente a la fácil movilidad de los trips vectores del virus (EPPO, 1999; Plantwise, 2016) (Figura 3).



Figura 3. Distribución mundial del TSWV y de su vector *F. occidentalis* (Tomado de EPPO, 1999; Plantwise, 2016).

Distribución en México

El TSWV se ha reportado en los estados de Baja California Norte, México, Morelos, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Puebla, Sinaloa, Querétaro y Zacatecas en diversos cultivos de importancia agrícola (Cuadro 3) (Contreras *et al.*, 2007; De la Torre *et al.*, 1995; De la Torre *et al.*, 2002; González, 2014; Gutiérrez *et al.*, 1996; Holguín-Rueda y Rueda-Puente, 2007; Morales-Díaz *et al.*, 2008; Negrete-Fernández *et al.*, 2007; Pérez y Rico, 2004; Ochoa *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 2009; Velásquez *et al.*, 2009; Verdugo, 1989).

Cuadro 3. Distribución en México del TSWV en diferentes cultivos agrícolas.

Estados	Cultivo	Referencias
Baja California Norte	Jitomate	Holguín-Rueda y Rueda-Puente, 2007
México	Crisantemo, jitomate, tomate de cáscara, chile	De la Torre <i>et al.</i> , 1995; De la Torre <i>et al.</i> , 2002; Gutiérrez <i>et al.</i> , 1996; Ochoa <i>et al.</i> , 1996
Hidalgo	Jitomate	Negrete-Fernández <i>et al.</i> , 2007
Morelos	Jitomate, tomate de cáscara, chile, crisantemo, zinnia	De la Torre <i>et al.</i> , 1995; ; De la Torre <i>et al.</i> , 2002; Morales-Díaz <i>et al.</i> , 2008; Ramírez <i>et al.</i> , 2009
Guanajuato	Jitomate, lechuga, pimienta	González, 2014
Michoacán	Chile	Pérez y Rico, 2004
Puebla	Tomate de cáscara, chile, crisantemo	De la Torre <i>et al.</i> , 2002
Sinaloa	Jitomate, tomate de cáscara	Contreras <i>et al.</i> , 2007; Verdugo, 1989; De la Torre <i>et al.</i> , 1995
Querétaro	Jitomate, lechuga, pimienta	González, 2014
Zacatecas	Jitomate, chile	De la Torre <i>et al.</i> , 1995; Velásquez <i>et al.</i> , 2009; Verdugo, 1989

El jitomate es una de las principales especies de importancia económica en México y ocupa el segundo lugar entre los cultivos cíclicos con mayor aportación al Producto Interno Bruto (PIB) del sector agroalimentario (SIAP, 2015). De acuerdo al SIAP (2014), los principales estados productores de jitomate son Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Zacatecas, Baja California Sur y Baja California Norte, estando presente el TSWV en la mayoría de estas entidades ocasionando graves pérdidas económicas (Contreras *et al.*, 2007; Holguín-Rueda y Rueda-Puente, 2007; Verdugo, 1989).

Estatus normativo

En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-007-FITO-1995 establece los requisitos fitosanitarios y especificaciones para productos importados de material vegetal propagativo

libre de TSWV (Cuadro 4), entre otros virus, con finalidad de impedir el ingreso de patógenos.

Cuadro 4. Material vegetativo que debe ingresar a México libre de TSWV de acuerdo a la NOM-007-FITO-1995.

Producto importado	País de origen
Esquejes sin raíz de <i>Fuchsia boliviana</i>	Alemania
Esquejes de <i>Heliochrysum apiculatum</i>	
Bulbos de <i>Gloxinia crassifolia</i>	Australia
Esquejes de <i>Chrysanthemum carinatum</i>	Brasil
Esquejes de <i>Chrysanthemum máximum</i>	Colombia
Esquejes de <i>Chrysanthemum morifolium</i>	Costa Rica
Plántulas o esquejes de <i>Pelargonium australis</i>	
Plántulas de <i>Browallia americana</i>	E.U.A.
Esquejes de <i>Chrysanthemum alpinium</i> y <i>C. maximum</i>	
Plántulas de <i>Sinningia speciosa</i>	
Plántulas de <i>Solanum lycopersicum</i>	
Rosetas de <i>Ananas comosus</i> sin raíz	
Plántulas de <i>Begonia spp.</i>	Holanda
Bulbos de <i>Gloxinia macrophylla</i> , <i>G. perennis</i> y <i>G. speciosa</i>	

De acuerdo con la lista de los productos importados y a su origen, se sugiere restringir otros materiales vegetales que vienen de países con presencia de TSWV y de sus vectores. Un ejemplo, es el caso de las plántulas de lechuga que son importadas de Estados Unidos de América en cuyo caso sólo se establece que deben estar libres de *Pseudomonas marginalis*, *Vein lettuce virus*, *Lettuce mosaic virus* y *Bemisia argentifolii* (NOM-007-FITO-1995, 1995), y no de TSWV, el cual se ha reportado en Hawaii en cultivos de lechuga causando daños del 50 al 90 % (Cho *et al.*, 1987b).

Métodos de control

Para un manejo adecuado de la enfermedad ocasionada por el TSWV se deben considerar estrategias orientadas tanto para el virus como para su vector las cuales se indican a continuación:

Control cultural. Tiene la finalidad de impedir el desarrollo y establecimiento de la enfermedad a través de las prácticas agrícolas (Agris, 2010). A continuación, se presentan algunas medidas de este tipo para el caso específico del TSWV:

- Eliminar maleza alrededor y en el interior del cultivo que puedan ser hospedantes del virus.

-Supervisar continuamente el cultivo con la finalidad de eliminar las primeras plantas con síntomas del TSWV y evitar la diseminación del virus a partir de los trips.

-No utilizar plantas con síntomas de TSWV como material vegetal propagativo.

-Cuando se compren plántulas, éstas deben ser aisladas y supervisadas por una semana para verificar si están libres de trips y de TSWV.

-En el invernadero, los cultivos deben ser separados de acuerdo a su forma de propagación.

-Ingresar al invernadero con ropa limpia y sin haber tenido contacto con otras plantas.

-Eliminación de los residuos de cosecha para evitar la generación de tejidos reservorios.

-Limpiar y desinfectar los invernaderos y el sistema de riego antes de iniciar un nuevo ciclo de cultivo.

-Producir las plántulas de jitomate para tener la certeza de que crecieron libres de plagas y enfermedades. Es muy importante tener cuidado con las temperaturas elevadas para obtener plántulas con una altura y desarrollo de raíces adecuados, dicho problema se puede minimizar con un apropiado manejo de riego y de nutrición (Daughtrey *et al.*, 1997; Daughtrey *et al.*, 2000; EPPO, 1999; Hartman *et al.*, 2005; Osuna y Ramírez, 2012)

Utilización de compuestos naturales. La aplicación de alternativas ecológicas se usa para evitar la contaminación ambiental y toxicidad en humanos, ocasionados por el uso inadecuado y excesivo de agroquímicos (Zavaleta-Mejía, 2000). Ramírez-Flores *et al.*, (2006) observaron que aplicaciones de miel de abeja y melaza en plantas de jitomate infectadas por el TSWV disminuyen la severidad de los síntomas lo cual estuvo asociado a una menor movilidad y concentración del virus.

Inductores de resistencia. El acibenzolar-S-metil (ASM) y el ácido acetil salicílico son compuestos que se utilizan como activadores de resistencia contra enfermedades en plantas, los cuales inducen la acumulación de proteínas PR a nivel local y sistémico (Camarena y De la Torre, 2007; Díaz, 2011; Mandal *et al.*, 2008). Las proteínas PR activan

el sistema de defensa de la planta originando la resistencia al patógeno. El ASM reduce la replicación viral, el número de lesiones locales y el movimiento sistémico del TSWV en el hospedante (Mandal *et al.*, 2008), mientras que las aplicaciones de ácido acetyl salicílico en plantas de jitomate no afectan el movimiento sistémico de este virus aunque sí disminuye su concentración (Ramírez-Flores *et al.*, 2006). Se recomienda hacer aplicaciones de los inductores de resistencia desde el pretrasplante para proteger a las plantas antes del establecimiento de la enfermedad (Csinos *et al.*, 2001).

Transformación genética. La ingeniería genética ha permitido la generación de plantas transgénicas de jitomate, cacahuete y tabaco, a las cuales se les ha incorporado segmentos de los genes N y NSm del TSWV (Culbreath *et al.*, 2003; Gubba *et al.*, 2002; Herrero *et al.*, 2000). En el caso de crisantemo, la inserción del gen de la proteína N de este virus ocasiona el desarrollo de lesiones locales cloróticas sin que la infección se vuelva sistémica (Daughtrey *et al.*, 1997).

En la variedad de jitomate conocida como “Rey de los Tempranos”, la introducción de algunos alelos para contrarrestar al TSWV es conferida por una interacción semi-alélica dominante de 1 o 3 genes (Juliatti y Maluf, 2005), la cual ocasiona una reacción resistente contra TSWV (Maluf *et al.*, 1991).

En variedades de jitomate y pimiento, se han incorporaron genes de resistencia para TSWV. Las variedades comerciales de jitomate resistentes a TSWV son portadoras del gen *Sw-5* procedente de *Solanum peruvianum* (Rosello *et al.*, 1998; Spassova *et al.*, 2001), mientras que en el caso del pimiento se ha utilizado el gen *Tsw*, procedente de *Capsicum chinense* (López *et al.*, 2011). Los genes *Sw-5* y *Tsw* desencadenan una reacción de hipersensibilidad que origina la aparición de lesiones locales necróticas, las cuales confinan la infección en el punto de entrada de este virus e impiden su movimiento sistémico en la planta (Aramburu *et al.*, 2007; Rosello *et al.*, 1998). Sin embargo, la resistencia conferida por los genes *Sw-5* y *Tsw* no tiene una buena estabilidad y ha sido superada por diversas variantes del virus (Aramburu y Martí, 2003).

Hasta el momento, no se ha tenido éxito al introducir genes de resistencia a TSWV en los diferentes cultivares comerciales por la supresión del sistema de silenciamiento del ARN

viral por parte de la planta debido a la proteína NSs (De Ronde *et al.*, 2013; Margaria *et al.*, 2007), así como a la reorganización y recombinación del genoma del virus para formar diferentes aislados (Aramburu *et al.*, 2007; Bag *et al.*, 2012) que de manera individual o combinada rompen la resistencia en la planta.

Por otro lado, una estrategia a implementar para el control del TSWV es utilizar las nuevas herramientas biotecnológicas, al identificar los genes del hospedante que interactúan con el TSWV, los cuales ayudan a realizar una eficiente multiplicación y replicación del patógeno. Como lo menciona Kushner *et al.* (2013), el cual detectó los genes de *Saccharomyces cerevisiae* que están involucrados en la inhibición o multiplicación del virus *Brome mosaic virus* (BMV), utilizando el ARN y la proteína de la replicasa viral. La investigación identificó con que genes del hospedante tiene el virus una estrecha relación para replicarse de forma exitosa o impedir su establecimiento. Por lo tanto, para esta estrategia es necesario conocer todos los genes del hospedante que son responsables de la replicación del genoma viral, síntesis de ARN mensajero, entre otros pasos. Una vez, conocidos los genes involucrados en dicha interacción, se editarían a partir de la técnica CRISPR/Cas, para la inactivación de sus funciones durante la infección por TSWV. Asimismo, la replicación y multiplicación del virus sería suprimida por la ausencia de las actividades regulares de los genes del hospedante, ocasionando la desaparición de la reacción de compatibilidad y reconocimiento entre el hospedante y el virus. De esta forma, se obtendrían plantas modificadas en las actividades de los genes que interactúan con el virus durante la infección sin la necesidad de introducir agentes extraños como en las plantas transgénicas.

Otra alternativa, es utilizar la metagenómica para revelar las especulaciones sobre la evolución del virus al adaptarse a sus hospedantes y su interacción con otros organismos. Tales deducciones, se podrían aclarar al secuenciar el genoma completo de cada una de las variantes y aislamientos del TSWV, y complementar los estudios de variabilidad genética con los análisis de recombinación para determinar el posible origen de dichos cambios en sus proteínas y como están relacionados con el genoma del hospedante. Posteriormente, con la ayuda de los datos generados comprenderemos las estrategias de cada una de sus proteínas virales para adaptarse a su vector y a sus hospedantes; así como la biodiversidad genética del

patógeno. Además, entenderemos como afecta las condiciones ambientales ocasionadas por el cambio climático en la interacción virus-hospedante-vector. Asimismo, la sobrevivencia, movimiento, distribución, epidemias, emergencia en nuevas zonas geográficas o cultivos y el impacto que genera en el ecosistema.

Control del vector

El manejo del insecto vector es de gran importancia para impedir la rápida diseminación del virus. Por tal motivo, para un control eficiente de la enfermedad ocasionada por el TSWV, se recomienda implementar estrategias de manejo integrado contra los trips vectores del virus mediante la combinación de estrategias de control biológico, cultural y químico (Momol *et al.*, 2004).

Control cultural

Se emplea de forma preventiva para evitar la introducción, desarrollo y propagación del insecto plaga (Santamaría, 2004). Algunas medidas de prevención recomendadas en el caso del TSWV, tanto en invernadero como a cielo abierto, son las siguientes

- Eliminación de maleza.
- Mantener una zona libre de vegetación de 3 a 10 m alrededor del cultivo.
- Eliminación de los residuos de cosecha.
- Colocación de mallas antitrips en los invernaderos para evitar su entrada.
- Reparación constante de las roturas en los plásticos del invernadero.
- Inspección continúa de las plantas para eliminar aquellas que muestren síntomas.
- Colocación de trampas adhesivas amarillas y azules a la altura de la planta para conocer la fluctuación poblacional de los trips y decidir el momento adecuado de aplicación de algún insecticida. Se recomienda utilizar un control químico contra el vector cuando se tenga la presencia de 2 a 5 trips por trampa.
- Siembra intercalada de plantas repelentes a trips (como el ajo) dentro y alrededor del cultivo.

-Utilizar barreras físicas como invernaderos, los cuales deben tener mallas anti trips para evitar la entrada del vector.

-Los invernaderos deberán presentar en la entrada cortinas dobles de malla anti trips, y colocar un tapete sanitario para desinfectar los zapatos.

-Reparación constante de las roturas en los plásticos del invernadero para evitar la entrada del vector.

-Reducir el número de ingresos a los invernaderos para evitar la entrada del vector.

-Desinfectar el sustrato debido a que una etapa larvaria de los trips se encuentra en el suelo.

-Evitar una alta densidad de plantas por metro cuadrado para facilitar la aplicación de insecticidas y disminuir una alta humedad en el ambiente. Osuna y Ramírez (2012), recomiendan 3 plantas por metro cuadrado.

(CAB International, 2015; Daughtrey *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2012; Greenough *et al.*, 1990; Greer y Diver, 2000; Lacasa *et al.*, 1994; Osuna y Ramírez, 2012; Salas, 2004).

Control biológico. En el caso de *Frankliniella occidentalis* se han utilizado enemigos naturales como parásitos, depredadores o entomopatógenos (Cuadro 5) (Gill *et al.*, 2012; Greer y Diver, 2000). Las estrategias de control biológico, tanto en invernadero como en campo abierto, se emplean antes de la aplicación de insecticidas, ya que pueden disminuir la población de los organismos biológicos (Greer y Diver, 2000; Rueda y Shelton, 1996). La liberación de los agentes de control biológico se efectúa cuando se detectan los primeros trips en las trampas adhesivas o inclusive antes de la aparición de los mismos para evitar el aumento de su población (Greer y Diver, 2000).

Cuadro 5. Agentes de control biológico utilizados contra *Frankliniella occidentalis*.

Enemigos naturales	Especies	Referencias
Depredadores	- <i>Amblyseius barkeri</i> , <i>A. cucumeris</i> , <i>A. degenerans</i> , <i>A. intermedius</i> , <i>A. limonicus</i> , <i>A. swirskii</i> - <i>Dicyphus tamaninii</i> - <i>Geocoris pallens</i> , <i>G. punctipes</i> - <i>Hypoaspis aculeifer</i> , <i>H. miles</i> - <i>Macrolophus caliginosus</i> , <i>M. rubi</i> - <i>Neoseiulus cucumeris</i> - <i>Orius albidipenni</i> , <i>O. insidiosus</i> , <i>O. laevigatus</i> , <i>O. majusculus</i> , <i>O. niger</i> , <i>O. tristicolor</i> - <i>Typhlodromips lailae</i> , <i>T. montdorensis</i>	CAB International, 2015; Gill <i>et al.</i> , 2012; Greer y Diver, 2000
Entomopatógenos	- <i>Beauveria bassiana</i> - <i>Lecanicillium lecanii</i> - <i>Neozygites parvispora</i>	
Parásito	- <i>Ceranisus americensis</i> , <i>C. lepidotus</i> , <i>C. menes</i> - <i>Grandjeanella multisetosa</i> - <i>Steinernema feltiae</i> - <i>Thripinema nicklewoodii</i>	

Control químico

Los trips pueden desarrollar resistencia a los insecticidas sobre todo si éstos se aplican frecuentemente (CAB International, 2015). Para prolongar su efecto insecticida, se recomienda rotar en cada generación de trips (aproximadamente cada dos o tres semanas), la aplicación de determinado producto considerando su ingrediente activo (Cuadro 6) (Cloyd, 2011; EPPO, 1999).

Cuadro 6. Insecticidas recomendados por SENASICA y DGIAAP (2011) para el control de *F. occidentalis*.

Ingrediente activo	Dosis	Días a cosechar
Acefate	0.8 kg/ha	7
Acetamiprid	150-350 g/ha	7
Azinfos metílico	1.0-2.5 L/ha o 1100-1400 g/ha	28
Bifentrina	400-600 g/ha	3
Clorhidrato de formetanato	0.5-1.0 kg/ha	57
Clorpirifos etil	0.7-1.0 L/ha o 20-25 kg/ha	21
Clorpirifos etil + Gamma cyhalotrina	0.75-1.25 L/ha	*
Diazinon	0.5-1.0 L/ha	14
Dinotefuran	1.0-1.5 kg/ha	Sin límite
Dimetoato	0.75-8.0 L/ha	14
Disulfoton	10 kg/ha	Sin límite
Endosulfan	1.0-3.0 L/ha	10
Fenpropatrin	0.3-0.5 L/ha	21
Flonicamid	75-150 g/ha	Sin límite
Gamma cyhalotrina	150-200 mL/ha	7
Imidacloprid + Cyflutrin	0.25-0.3 L/ha	14
Malation	0.7-2.0 L/ha o 25 kg/ha	3
Metamidofos	1.0-1.5 L/ha	14
Metomilo	1.0-2.0 L/ha o 300-1600 g/ha	7
Ometoato	0.4-0.6 L/ha	*
Oxidemeton metil	1.0-2.0 L/ha	*
Paration metílico	0.75-1.5 L/ha	15
Spinetoram	333.3-500 mL/ha	1
Tau-Fluvalinato	300 mL/ha	Sin límite
Thiametoxam	300-400 g/ha	3
Triclorfon + Paration metílico	20-25 g/kg	28
Imidacloprid	0.3-0.45 mL/100 L	14
Lambdacyhalotrina (Cyhalotrina)	300-500 mL/ha	14
Spinosad	10-20 mL/100 L o 60-120 g/ha	1
Thiametoxam + Lambdacyhalotrina	200-400 mL/ha	14
Zeta-cipermetrina	40-45 mL/100 L o 450-650 mL/ha	1

* No determinado

Se recomienda iniciar las aplicaciones de los insecticidas en el cultivo cuando se tienen de 10 a 20 trips por trampa adhesiva (Daughtrey *et al.*, 2001), utilizar un equipo de aplicación que produzca gotas menores de 100 μ m con la finalidad de obtener una mayor cobertura entre las partes más difíciles de penetración de la planta y añadir un producto químico que tenga como ingrediente activo una piretrina para provocar la movilidad de los trips y facilitar que entre en contacto con el insecticida (Hoddle y Van Driesche, 2013).

CONCLUSIONES

La enfermedad ocasionada por el *Tomato spotted wilt virus* en diferentes cultivos de importancia agrícola se ha caracterizado por provocar graves daños y por su rápida dispersión a nivel mundial. Lo anterior se debe a las características biológicas y genéticas del virus, así como a su diseminación a través del insecto vector y del material vegetal propagativo asintomático. A nivel mundial, se ha publicado información relacionada con el genoma del virus, la función de las diferentes proteínas que codifica y que están relacionadas con su replicación, movimiento célula-célula, síntomas y supresión del silenciamiento del ARN viral por parte de la planta; también se han abordado los mecanismos de adquisición, replicación, movimiento y transmisión por trips; genes relacionados con resistencia, sintomatología, manejo y epidemiología en algunos cultivos, principalmente. En México, las investigaciones publicadas en revistas con arbitraje tratan de la detección del virus en diferentes especies vegetales y su descripción de síntomas; la variabilidad biológica de aislamientos de TSWV; identificación de trips como vectores y maleza hospedante del virus; severidad en diferentes hospedantes y temperaturas para el desarrollo del patógeno; epidemiología en crisantemo; efecto de miel y melaza en la concentración relativa y movimiento del virus. Por tal motivo en México, es necesario generar más investigaciones sobre los aspectos involucrados a nivel molecular, en la interacción planta hospedante-virus-vector para que de esta manera se logre discernir la forma de adaptación y evolución del virus en su nicho ecológico para encontrar un control adecuado durante la infección por TSWV. Así, como generar más conocimiento sobre la resistencia o tolerancia genética de las plantas ante la presencia del TSWV.

LITERATURA CITADA

- Abe, H., Tomitaka Y., Shimoda T., Seo S., Sakurai T., Kugimiya S., Tsuda S. and Kobayashi M. 2012. Antagonistic Plant Defense System Regulated by Phytohormones Assists Interactions Among Vector Insect, Thrips and a Tospovirus. *Plant Cell Physiology*. 53: 204-212.
- Adkins, S., Momol M.T., Dankers H., Reitz S. and Olson S. 2006. First report of *Tomato spotted wilt virus* in tomatillo in Florida. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2006-0607-03-BR.
- Agenor, P.M., Krause-Sakate R., da Silva N., Murilo Z.F. and Le G.O. 2008. Virus diseases of Lettuce in Brazil. *Plant Viruses*. 2: 35-41.
- Agrios, G.N. 2010. *Fitopatología*. 2ª edición. Editorial Limusa. México. 856 p.
- Aramburu, J., Galipienso L., Soler S. y López C. 2007. La enfermedad del bronceado en tomate y pimiento: un problema permanente en una situación cambiante. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*. 194: 24-29.
- Aramburu, J. and Martí M. 2003. The occurrence in Northeast Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *The Plant Pathology Journal*. 52:407.
- Badillo-Vargas, I.E., Rotenberg D., Schneeweis D.J., Hiromasa Y., Tomich J.M. and Whitfield A.E. 2012. Proteomic Analysis of *Frankliniella occidentalis* and Differentially Expressed Proteins in Response to *Tomato Spotted Wilt Virus* Infection. *Journal of Virology*. 86: 8793–8809.
- Bag, S., Mitter N., Eid S. and Pappu H.R. 2012. Complementation between Two Tospoviruses Facilitates the Systemic Movement of a Plant Virus Silencing Suppressor in an Otherwise Restrictive Host. *Plos One*. 7: e44803. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044803>.
- Best, R.J. 1968. Tomato spotted wilt virus. *Advances in Virus Research*. 13: 65–146.
- Bong-Nam, C., Ha-Seung P., Jae-A.J. and Jeong-Soo K. 2006. Occurrence of Tomato spotted wilt virus in *Chrysanthemum grandiflorum* in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 22: 230-234.
- Brittlebank, C.C. 1919. A new tomato disease, spotted wilt. *Journal of Agriculture, Victoria*. 27: 231-235.
- Camarena-Gutiérrez, G. y De la Torre-Almaraz R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 13: 157-162.
- CABI International, Centre for Agricultural Bioscience International. 2015. *Frankliniella occidentalis* (western flower thrips). <http://www.cabi.org/isc/datasheet/24426> (Fecha de consulta, marzo del 2016).
- Chapman, E.J., Hilson P and German T.L. 2003. Association of L protein and in vitro *Tomato spotted wilt virus* RNA-dependent RNA polymerase activity. *Intervirology*. 46:177-181.
- Cheng, Y-H., Zheng Y-X, Tai C-H, Yen J-H, Chen Y-K and Jan F-J. 2014. Identification, characterization and detection of a new tospovirus on sweet pepper. *Annals of Applied Biology*. 164: 107–115.
- Cho, J.J., Mau R.F.L., Mitchell W.C., Gonsalves D. and Yudin L.S. (a). 1987. Host list of plants susceptible to Tomato spotted wilt virus (TSWV). Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources. Honolulu, Hawaii. ISSN 0271-9916. 10 p.

- Cho, J.J., Mitchell W.C., Mau R.F.L. and Sakimura K. (b). 1987. Epidemiology of *Tomato spotted wilt virus* disease on crisphead lettuce in hawaii. *Plant Disease*. 71: 505-508.
- Cloyd, R.A. 2010. Western Flower Thrips: Management on Greenhouse-Grown Crops. Kansas State University. www.ksre.ksu.edu (consulta, marzo del 2016).
- Colón-Ramos, D.A, Irusta P.M., Gan E.C., Olson M.R., Song J.W., Morimoto R.I., Elliott R.M., Lombard M., Hollingsworth R., Hardwick J.M., Smith G.K. and Kornbluth S. 2003. Inhibition of translation and induction of apoptosis by bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. *Molecular Biology of the Cell*. 14: 4162-4172.
- COFEPRIS, Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios. 2013. Listado de plaguicidas para el cultivo del Aguacate. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4099> (consulta, marzo del 2016).
- Csinos A.S. and Pappu H.R. 2001. Management of tomato spotted wilt virus in flue-cured tobacco with acibenzolar S-methyl. *Plant Disease* 85: 292-296.
- Csinos, A.S., Pappu H.R., McPherson R.M. and Stephenson M.G. 2001. Management of *Tomato spotted wilt virus* in flue-cured tobacco with acibenzolar-S-methyl and imidacloprid. *Plant Disease*. 85:292-296.
- Culbreath A.K., Todd J.W., Brown S.L. 2003. Epidemiology and management of tomato spotted wilt in peanut. *Annual Review of Phytopathology*. 41:53–75. doi: 10.1146/annurev.phyto. 41.052002.095522.
- Daughtrey, M.L., Jones R.K., Moyer J.W., Daub M.E. and Baker J.R. 1997. Tosspoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease*. 81:1220–1230.
- Daughtrey, M.L., Wick R.L. and Peterson J.L. 2000. Plagas y enfermedades de las plantas en maceta con flores. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 90 p.
- de Haan, P., Wagenmakers L., Peters D. and Goldbach R.W. 1989. Molecular cloning and terminal sequence determination of the S and M RNA of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*. 70: 3469–3473.
- de Haan, P., Kormelink , Resende R. de O., van Poelwijk F., Peters D. and Goldbach R. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. *Journal of General Virology*. 72: 2207–2216.
- De la Torre, A.R., Cervantes D.L., Téliz O.D., Hobbs H.A., Valverde R.A. 1995. Caracterización de la variación patogénica de aislamientos del virus de la marchitez manchada del tomate (TSWV) con especies y líneas de *Capsicum*. Memorias XXII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. Resumen 58.
- De la Torre-Almaráz, R., Cervantes-Díaz L., Houston H.A. y Valverde R. 2002. Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del Virus marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia*. 36: 211-221
- de Oliveira, R., de Haan P., van de Vossen E., de Ávila A.C., Goldbach R. and Peters D. 1992. Defective interfering L RNA segments of tomato spotted wilt virus retain both virus genome termini and have extensive internal deletions. *Journal of General Virology*. 73: 2509-2516.
- De Ronde, D., Butterbach P., Lohuis D., Hedil M., Van lent J.W.M. and Komerlink R. 2013. Tsw gene-based resistance intrigerred by a functional RNA silencing suppressor protein of the Tomato spotted wilt virus. *Molecular Plant Pathology*. 14: 405-415.
- Diaz-Puentes, L-N. 2011. Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 10: 257 – 267.

- Domínguez, M.M. y Crespo R.J.A. 2008. El *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), una seria amenaza para nuestro país. *Cuba Tabaco*. 9: 58-67.
- Dong, J.H., Yin Y.Y., Fang Q., Mcbeath J.H. and Zhang Z.K. 2013. A new tospovirus causing chlorotic ringspot on *Hippeastrum* sp. in China. *Virus Genes*. 46:567–570.
- Eifan, S., Schnettler E., Dietrich I., Kohl A. and Blomstrom A.-L. 2013. Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions. *Viruses*. 5: 2447-2468.
- EPPO, EPPO Data sheets on quarantine pests. 1999. *EPPO Bulletin*. 29: 465–472. doi: 10.1111/j.1365-2338.1999.tb01420.x
- Francki, R.I.B., Fanquet C.M., Knudson D.L. and Brown F. 1991. Classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology*. 2: 1 450.
- García, S., Billecocq A., Crance J.M., Prins M. and Garin D. 2006. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *Journal of General Virology*. 87:1985–1989.
- Ghotbi, T., Shahraeen N. and Winter S. 2005. Occurrence of tospoviruses in ornamental and weed species in Markazi and Tehran provinces in Iran. *Plant Disease*. 89:425-429
- Gill, S., Dutky E., Raupp M., Davidson J. and Nakahara S. 2012. Thrips Management in Greenhouses. University of Maryland. <https://extension.umd.edu/sites/default/files/docs/publications/FS762%202012%20Thrips%20Management%20in%20Greenhouses.pdf> (consulta, marzo del 2016).
- Gonsalves, D. and Trujillo E.E. 1986. Tomato spotted wilt virus in papaya and detection of the virus by ELISA. *Plant Disease*. 70: 501-506.
- González, P.B.E. 2014. Caracterización biológica y molecular del Tomato spotted wilt virus (TSWV) en aislamientos Mexicanos. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, México. 52 pp.
- Greenough, D.R., Black L.L. and Bond W.P. 1990. Aluminum-surfaced mulch—an approach to the control of *Tomato spotted wilt virus* in solanaceous crops. *Plant Disease*. 74:805–8.
- Greer, L. and Diver S. 2000. Greenhouse IPM: Sustainable thrips control. *Appropriate Technology Transfer for Rural Areas*. Pest management technical notes. 18 p.
- Gubba A., Gonsalves C., Stevens M.R., Tricoli D.M. and Gonsalves D. 2002. Combining transgenic and natural resistance to obtain broad resistance to tospovirus infection in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Molecular Breeding*. 9: 13–23. doi: 10.1023/A:1019222614365.
- Gutiérrez A., Zavaleta-Mejía E., Cervantes D.L. y Herrera G.A. 1996. Resultados preliminares sobre virus asociados con la *Alstroemeria* en Villa Guerrero Estado de México. *Memorias XXII Congreso Nacional de Fitopatología*. Guadalajara, Jal. Resumen 38.
- Hartman, J., Johnson M. and Bessin R. 2005. Control of Tomato Spotted Wilt and Impatiens Necrotic Spot Viruses and Their Vectors, Western Flower Thrips, in Greenhouse Crops. University of Kentucky. http://www2.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/ext_files/PPFShtml/PPFS-GH-2.pdf (consulta, marzo del 2016)
- Heinze, C., Letschert B., Hristova D., Yankulova M., Kauadjour O., Willingmann P., Atanassov A. and Adam G. 2001. Variability of the N-protein and the intergenic

- region of the S RNA of *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV). *The New Microbiologica*. 24: 175–187.
- Herrero, S., Culbreath A.K., Csinos A.S., Pappu H.R., Rufty R.C. and Daub M.E. 2000. Nucleocapsid gene-mediated transgenic resistance provides protection against tomato spotted wilt virus epidemics in the field. *Phytopathology*. 90: 139–147.
- Hu, Z.Z., Feng Z.K., Zhang Z.J., Liu Y.B. and Tao X.R. 2011. Complete genome sequence of a *Tomato spotted wilt virus* isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. *Archives of virology*. 156: 1905-1908.
- Hull, R. 2004. Mathew's Plant virology. 4^a ed. Elsevier Academic Press. New York. 1001 p.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> (consulta, marzo 2016).
- Holguín-Peña, R.J. and Rueda-Puente E.O. 2007. Detection of Tomato spotted wilt virus in Tomato in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*. 91:1682-1682.
- Hoddle, M. and Van Driesche R. 2013. Western Flower Thrips in Greenhouses: A Review of its Biological Control and Other Methods. Department of Entomology-University of California, Riverside. <http://biocontrol.ucr.edu/wft.html#Top%20of%20Page> (consulta, marzo del 2016).
- Jaramillo, Z.M.M., Álvarez J.A. y Marín M.M. 2012. Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en Colombia. *Revista Lasallista de Investigación*. 9: 115-127.
- Juliatti, F.C. and Maluf W.R. 1995. Controle genético da resistência do tomateiro a um isolado de tospovirus (TSVW): análise de plantas individuais. *Fitopatologia Brasileira*. 20:39-47.
- Kamberoglu, M.A. and Alan B. 2011. Occurrence of *Tomato spotted wilt virus* in lettuce in cukurova region of Turkey. *International Journal of Agricultural and Biological*. 13: 431–434
- Kaye, A.C., Moyer J.W., Parks E.J., Cargone I. and Cubeta M.A. 2011. Population genetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology*. 101:147-153.
- Kikkert, M., van Lent J., Storms M., Bodegom P., Kormelink R. and Goldbach R. 1999. Tomato spotted wilt virus particle morphogenesis in plant cells. *Journal of Virology*. 73: 2288-2297.
- Kikkert, M., Verschoor A., Kormelink R., Rottier P. and Goldbach R. 2001. Tomato spotted wilt virus glycoproteins exhibit trafficking and localization signals that are functional in mammalian cells. *Journal of Virology*. 75: 1004-1012.
- Kirk, W.D.J. and Terry I.L. 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*. 5: 301–310.
- Kormelink, R., de Haan P., Meurs C., Peters D. and Goldbach R. 1992. The nucleotide sequence of the M RNA segment of *Tomato spotted wilt virus*, a bunyavirus with two ambisense RNA segments. *Journal of General Virology*. 73: 2795–2804.
- Kormelink, R., Storms M., van Lent J., Peters D. and Goldbach R. 1994. Expression and subcellular location of the NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a putative viral movement protein. *Virology*. 200: 56-65.
- Kormelink, R., Garcia M.L., Goodin M., Sasaya T. and Haenni A. L. 2011. Negative-strand RNA viruses: the plant infecting counterparts. *Virus Researcher*. 162: 184–202.

- Kuismanen, E., Bang B., Hurme M. and Pettersson R. F. 1984. Uukuniemi virus maturation: immunofluorescence microscopy with monoclonal glycoprotein specific antibodies. *Journal of Virology*. 51: 137-146.
- Kushner, D.B., Lindenbach B.D., Grdzeliashvili V.Z., Noueiry A.O., Paul S.M. and Ahlquist P. 2003. Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *PNAS*. 100: 15764–15769. doi/10.1073/pnas.2536857100.
- Lacasa, A., Contreras J., Torres J., González A., Martínez M.C., García F. y Hernández A. 1994. Utilización de mallas en el control de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) y el virus del bronceado del tomate (TSWV) en el pimiento en invernadero. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. 20: 561-580.
- Law, M.D. and Moyer J.W. 1990. A Tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *Journal of General Virology*. 71: 933–938.
- Lewandowski, D.J. and Adkins S. 2005. The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology*. 342: 26-37.
- López, C., Aramburu J., Galipienso L., Soler S., Nuez F. and Rubio L. 2011. Evolutionary analysis of tomato *Sw-5* resistance-breaking isolates of *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of General Virology*. 92: 210-215.
- Maluf, W.R., Toma B.M. and Corte R.D. 1991. Progress in breeding tomatoes for resistance to tomato spotted wilt. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 509–525.
- Mandal, B., Mandal S., Csinos A.S., Martinez N., Culbreath A.K. and Pappu H.R. 2008. Biological and molecular analyses of the acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured Tobacco against *Tomato spotted wilt virus*. *Phytopathology*. 98:196-204.
- Margaria, P., Ciuffo M., Pacifico D. and Turina M. 2007. Evidence That the Nonstructural Protein of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the interaction with resistant Pepper Carrying the *Tsw* Gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 547-558.
- Margaria, P., Bosco L., Vallino M., Ciuffo M., Mautino G.C., Tavella L. and Turina M. 2014. The NSs protein of *Tomato spotted wilt virus* is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*. 88: 5788-5802.
- Margaria, P., Miozzi L., Ciuffo M., Pappu H.R. and Turina M. 2015. The first complete genome sequences of two distinct European tomato spotted wilt virus isolates. *Archives of Virology*. 160: 591-595.
- Martínez, R.T., Poojari S., Tolin S.A., Cayetano X. and Naidu R.A. 2014. First Report of *Tomato spotted wilt virus* in Peppers and Tomato in the Dominican Republic. *Plant Disease*. 98: 163-163.
- Marys, E., Mejías A., Rodríguez-Román E., Avilán D., Hurtado T., Fernández A., Zambrano K., Garrido M. and Brito M. 2014. The First Report of Tomato spotted wilt virus on Gerbera and Chrysanthemum in Venezuela. *Plant Disease*. 98: 1161-1161.
- Momol, M.T., Olson S.M., Funderburk J.E., Stavisky J. and Marois J.J. 2004. Integrated management of tomato spotted wilt on field-grown tomatoes. *Plant Disease*. 88:882-890.
- Morales-Díaz, Ma. V., Alcacio R.S. y De la Torre-Almaraz R. 2008. Tomato spotted wilt virus: agente causal de la marchitez del miguelito (*Zinnia elegans* Jaquin) en el estado de Morelos, México. *Agrociencia*. 42: 335-347.

- Matthews, R.E.F. 1981. Plant virology. 2^a ed. Academic Press. New York. 215 p.
- Milne, R.G. and Francki R.I.B. 1984. Should tomato spotted wilt virus be considered as a possible member of the family Bunyaviridae?. *Intervirology*. 22: 72-76.
- Moritz G., Kumm S. and Mound L. 2004. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research*. 100: 143–149.
- Mullis, S.W., Langston D.B. Jr, Gitaitis R.D., Sherwood J.L. and Csinos A.C. 2004. First report of *Vidalia* onion (*Allium cepa*) naturally infected with Tomato spotted wilt virus and Iris yellow spot virus (family Bunyaviridae, genus Tospovirus) in Georgia. *Plant Disease*. 88: 1285. doi: 10.1094/pdis.2004.88.11.1285b
- Mumford, R.A., Barker I. and Wood K.R. 1996. The Biology of the Tospoviruses. *Annals of Applied Biology*. 128: 159-183.
- Nagata, T., Inoue-Nagata A.K., Prins M., Goldbach R.W. and Peters D. 2000. Impeded thrips transmission of defective *Tomato spotted wilt virus* isolates. *Phytopathology*. 90:454-459.
- Naidu, R. A., Sherwood J. L. and Deom C. M. 2007. Characterization of a vector-nontransmissible isolate of Tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology*. 57: 190-200.
- NOM-007-FITO-1995. 1995. Diario Oficial de la Federación. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4879362&fecha=11/08/1995 (consulta, marzo del 2015).
- Negrete-Fernández, G., Rodríguez-Guzmán M.P., Peña-Martínez R. y Ochoa-Martínez D.L. Dinámica de virus fitopatógenos en jitomate (*Lycopersicon esculentum* MILL.), en Meztitlán, Hidalgo. IV Foro de investigadores por la conservación y II Simposio de áreas naturales protegidas del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo. Resumen 36.
- Ochoa, M.D.L., Zavaleta-Mejía E., Johansen N.R.M., Herrera G.A., Cárdenas S.E. 1996. Effect of using certified virus-free cuttings, mulching and floating row covers on *Chrysanthemum* production (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Polaris) and incidence of Tospovirus. *International Journal of Pest Management*. 42:161–4.
- Ohnishi, J., Katsuzaki H., Tsuda S., Sakurai T., Akutsu K. and Murai T. 2006. *Frankliniella cephalica*, a new vector for *Tomato spotted wilt virus*. *Plant Disease*. 90: 685.
- Osuna, C. F. J. y Ramírez R. S. 2012. Manual para la producción de jitomate en invernadero con sistemas hidropónicos abiertos y cerrados en el estado de Morelos. Folleto técnico No. 65. INIFAP-Campo experimental Zacatepec. Zacatepec, Morelos, México. 54 p.
- Palmer, J.M., Reddy D.V.R., Wightman J.A. and Ranga-Rao G.V. 1990. New information on the thrips vectors of *Tomato spotted wilt virus* in groundnut crops in India. *International Arachis Newsletter*. 7: 24–25.
- Pappua, H. R., Jones R. A. C. and Jain R. K. 2009. Global status of Tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*. 141:219–236.
- Parrella, G., Gognalons P., Gebre-Selassie K., Vovlas C. and Marchoux G. 2003. An update of the host range of Tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology*. 85: 227-264.
- Pérez, M.L. y Rico J.E. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. Primera edición. Universidad de Guanajuato. 143 p.
- Pittman, H.A. 1927. Spotted wilt of tomatoes: preliminary note concerning the transmission of the 'spotted wilt' of tomatoes by an insect vector (*Thrips tabaci* Lind.). *Journal of the Council of Science and Industrial Research*. 1: 74-77.

- Plantwise. 2016. TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) and *Frankliniella occidentalis*. Centre for Agriculture and Biosciences international. <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap.aspx#>. (consulta, marzo de 2016).
- PLH, EFSA Panel on Plant Health (a). 2012. Scientific Opinion on the pest categorization of the tospoviruses. EFSA Journal. 10:2772.
- PLH, EFSA Panel on Plant Health (b). 2012. Scientific Opinion on the risk to plant health posed by *Tomato spotted wilt virus* to the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. EFSA Journal. 10: 3029.
- Portela, A. and Digard P. 2002. The Influenza virus nucleoprotein: A multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. Journal of General Virology. 83: 723-734.
- Ramírez-Flores J., Ochoa-Martinez D.L., Rodríguez-Mendoza M.N. y Mora-Aguilera G. 2006. Efecto del ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. Revista Chapingo Serie Horticultura. 12: 239-243.
- Ramírez, R.S., Osuna C.F.J., Vázquez A.J.M.P., Bustamante O.J.D., Canul K. y Ocampo O.T. 2009. Plagas y enfermedades de jitomate cultivado en invernaderos y bioespacios del estado de Morelos. INIFAP-Campo Experimental Zacatepec. Folleto técnico No. 37. 79 p.
- Renukadevi, P., Nagendran K., Nakkeeran S., Karthikeyan G., Jawaharlal M., Alice D., Malathi V.G. and Pappu H.R. 2015. First Report of Tomato spotted wilt virus Infection of Chrysanthemum in India. Plant Disease. 99:1190-1190.
- Rosello, S., Diez M. and Nuez F. 1998. Genetics of *Tomato spotted wilt virus* resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. European Journal of Plant Pathology. 104:499–509.
- Rueda, A. y Shelton A.M. 1996. Trips de la Cebolla. Cornell University. <http://web.entomology.cornell.edu/shelton/veg-insects-global/spanish/thrips.html> (consulta, marzo del 2016)
- Rybicki, E.P. 2015. A Top Ten list for economically important plant Viruses. Archives of Virology. 160: 17–20.
- Salas, J. 2004. Evaluation of cultural practices to control *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) on green pepper. Entomotropica. 19:39-46.
- Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa. Lima, Peru. 226 p.
- Sakimura, K. 1963. *Frankliniella fusca*, an additional vector of *Tomato spotted wilt virus*, with notes on *Thrips tabaci*, another vector. Phytopathology. 53: 412–415.
- Samuel, G., Bald J.G. and Pittman H.A. 1930. Investigations on ‘spotted wilt’ of tomatoes. Australian Commw. Counc. Sci. Ind. Res. Bull. 44: 8–11.
- Santamaría, M. 2004. Control de la Población de Ácaros (*Tetranychus* sp.), utilizando tres extractos botánicos en el cultivo de rosas (*Rosa* sp.), var “Latín beauty”. Machachi - Pichincha. Rumipamba. 23: 59-60.
- Schnettler, E., Hemmes H., Huismann R., Goldbach R., Prins P. and Kormelink R. 2010. Diverging Affinity of Tospovirus RNA Silencing Suppressor Proteins, NSs, for Various RNA Duplex Molecules. Journal of Virology. 84: 11542–11554.
- Scholthof, K.-B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C. and Foster G.D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant Pathology. Molecular Plant Pathology. 12: 938–954.

- SENASICA y DGIAAP, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria y Dirección General de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera. 2011. Lista de plaguicidas de uso agrícola. <http://www.senasica.gob.mx/?id=3376> (consulta, marzo del 2016).
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2014. Cierre de la producción agrícola por estado. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> (consulta, marzo del 2016)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2015. Análisis del Producto Interno Bruto en el cuarto trimestre del 2015. <http://www.siap.gob.mx/pib-cuarto-trimestre-2015/> (consulta, marzo del 2016).
- Smith, K.M. 1931. Studies on potato virus diseases VIII. On a ringspot virus affecting solanaceous plants. *The Annals of Applied Biology*. 18: 1–15.
- Soellick, T.-R., Uhrig J. F., Bucher G. L., Kellman J.-W. and Schreier P.H. 2000. The movement protein NSm of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Plant Biology*. 97: 2373–2378.
- Spassova, M.I., Prins T.W., Folkertsma R.T., Klein-Lankhorst R.M., Hille J., Goldbach R.W. and Prins M. 2001. The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding*. 7: 151-161.
- Stanković, I., Bulajić A., Vučurović A., Ristić D., Jović J. and Krstić B. 2011. First Report of *Tomato spotted wilt virus* on *Gerbera hybrida* in Serbia. *Plant Disease*. 95: 226-226.
- Stanković, I., Bulajić A., Vučurović A., Ristić D., Milojević K., Nikolić D. and Krstić B. 2012. First Report of Tomato spotted wilt virus Infecting Onion and Garlic in Serbia. *Plant Disease*. 96: 918.
- Storms, M.M.H., Kormelink R., Peters D., van Lent J.W.M. and Goldbach R.W. 1995. The nonstructural NSm protein of *Tomato spotted wilt virus* induces tubular structures in plant and insect cells. *Virology*. 214: 485–493.
- Storms, M.M.H., van der Schoot C., Prins M., Kormelink R., van Lent J.W.M. and Goldbach R.W. 1998. A comparison of two methods of microinjection for assessing altered plasmodesmal gating in tissues expressing viral movement proteins. *The Plant Journal*. 13: 131–140.
- Storms, M.M.H., Nagata T., Kormelink R., Goldbach R.W. and van Lent J.W.M. 2002. Expression of the movement protein of *Tomato spotted wilt virus* in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. *Archives of Virology*. 147: 825–831.
- Sundaraj, S., Srinivasan R., Culbreath A.K., Riley D.G. and Pappu H.R. 2014. Host plant resistance against Tomato spotted wilt virus in peanut (*Arachis hypogaea*) and its impact on susceptibility to the virus, virus population genetics, and vector feeding behavior and survival. *Phytopathology*. 104: 202-21.
- Takeda, A., Sugiyama K., Nagano H., Mori M., Kaido M., Mise K., Tsuda S. and Okuno T. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of Tomato spotted wilt virus. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Lett*. 532:75-79.
- Ullman, D.E., Meideros R., Campbell L.R., Whitfield A.E., Sherwood J.L. and German T.L. 2002. Thrips as vectors of tospoviruses. *Advances in Botanical Research*. 36: 113-140. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)36061-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2296(02)36061-0).

- van Knippenberg, I., Goldbach R. and Kormelink R. 2004. Tomato spotted wilt virus transcription in vitro is independent of translation. *Journal of General Virology*. 85: 1335-1338.
- van Knippenberg, I., Goldbach R. and Kormelink R. 2005. Tomato spotted wilt virus S-segment mRNAs have overlapping 3'-ends containing a predicted stem-loop structure and conserved sequence motif. *Virus Researchers*. 110: 125–131.
- van Lent, J.W.M. and Schimtt-Keichinger C. 2006. Viral movement proteins induce tubule formation in plant and insect cells. *Cell-Cell channels*. Section V: 160-175.
- Velásquez, V.R., Mena C.J., Amador R.M.D. y Reveles H.M. 2009. El virus de la marchitez manchada del jitomate afectando Chile y jitomate en Zacatecas. INIFAP-Campo Experimental Zacatecas. Folleto técnico No. 20.
- Verdugo, G.F. 1989. Etiología de una nueva enfermedad del tomate en Sinaloa. *Memorias XVI Congreso Nacional de Fitopatología*. Montecillo, México. Resumen 14.
- Weber, F., Bridgen A., Fazakerley J.K., Streitenfeld H., Kessler N., Randall R.E. and Elliott R.M. 2001. The *Bunyamwera virus* nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology*. 281: 67–74.
- Wijkamp, I. and Peters D. 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology* 83: 986–991.
- Wijkamp, I., Van De Wetering F., Goldbach R. and Peters D. 1996. Transmission of *Tomato spotted wilt virus* by *Frankliniella occidentalis*: median acquisition and inoculation access period. *Annals of Applied Biology*. 129: 303–313.
- Whitfield, A.E., Ullman D.E., German T.L. 2005. Tospovirus-Thrips interactions. *Annual Review Phytopathology*. 43:459–89.
- Whitfield, A.E., Kumar N.K.K., Rotenberg D., Ullman D.E., Wyman E.A., Zietlow C., Willis D.K. and German TL. 2008. A soluble form of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) glycoprotein GN (GN-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology* 98:45-50.
- Wilson, C.R. 2001. Resistance to infection and translocation of *Tomato spotted wilt virus* in potatoes. *Plant Pathology*. 50: 402–410. doi: 10.1046/j.1365-3059.2001.00562.x
- Yeh, S.D., Lin Y.C., Cheng Y.H., Jih C.L., Chen M.J. and Chen C.C. 1992. Identification of *Tomato spotted wilt*-like virus on watermelon in Taiwan. *Plant Disease*. 76: 835–840.
- Zavaleta, M.E. 1999. Alternativas de manejo de enfermedades de las plantas. *Agrociencia*. 17: 47-55.
- Zhang, X.S., Holt J. and Colvin J. 2001. Synergism between plant viruses: a mathematical analysis of the epidemiological implications. *Plant Pathology*. 50: 732–746.
- Zindović, J., Bulajić A., Krstić B., Ciuffo M., Margaria P. and Turina M. 2011. First Report of *Tomato spotted wilt virus* on Pepper in Montenegro. *Plant Disease*. 95: 882-882.

CAPÍTULO 2. ASPECTOS FUNDAMENTALES DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO EN PLANTAS CONTRA VIRUS FITOPATÓGENOS

RESUMEN.

El silenciamiento génico es un mecanismo celular que controla e inhibe la expresión de genes. Tiene la capacidad de regular a nivel transcripcional o post-transcripcional. En plantas, participa en el desarrollo y diferenciación celular, regulación de genes, y defensa contra transposones y organismos patógenos, especialmente para combatir a los virus. En el silenciamiento génico están involucradas ciertas proteínas endógenas de la planta, las cuales son conocidas con el nombre de Dicers, Argonautas y ARNs polimerasas dependientes de ARN, que sin ellas no se podrían realizar las actividades de este proceso natural. Tal conjunto de proteínas, realiza funciones específicas para contrarrestar las infecciones virales. Sin embargo, los virus poseen estrategias moleculares para inactivar y suprimir el mecanismo del silenciamiento génico al propagarse e infectar a su hospedante. Siendo un reto el estudiar y comprender la naturaleza de estas interacciones con el propósito de desarrollar nuevas estrategias que contribuyan efectivamente a subyugar las pérdidas ocasionadas por virus en cultivos agrícolas con importancia económica. Por tal motivo, este escrito tiene como propósito presentar de manera clara y concisa el mecanismo del sistema de silenciamiento genético en plantas para su entendimiento a nivel molecular y su uso en el diseño de estrategias contra los virus.

Palabras claves: ARN pequeños, argonauta, dicer, RDR, virus, hospedante

ABSTRACT.

Gene silencing is a cellular mechanism that controls and inhibits gene expression. It has the ability to regulate transcriptional or post-transcriptional level. In plants, it is involved in the development, cellular differentiation, gene regulation, and defense against transposons and pathogens, especially to counteract viruses. Gene silencing involves certain endogenous protein of the plant, which are known as Dicers, Argonauts and RNA-dependent RNA polymerases, without them cannot develop the activities of this natural process. These proteins perform specific functions to counteract viral infections. However, viruses have molecular strategies to inactivate and suppress the mechanism of gene silencing to spread and infect the plant. Therefore, it is a challenge to study and understand the nature of these interactions to define and develop new strategies that effectively contribute to suppress the losses caused by the virus in crops of economic importance. For this reason, the purpose of this brief is to present in a clear and concise way, the mechanism of genetic silencing in plants for their understanding at the molecular level and their possible intervention in the design of strategies against viruses.

Key words: small RNA, argonaute, dicer, RDR, viruses, host

INTRODUCCIÓN

El silenciamiento génico es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariontes, el cual degrada o suprime un gen en particular. Tal mecanismo regula la expresión de genes endógenos y exógenos para el desarrollo y mantenimiento de la integridad del genoma de las plantas (Zhang *et al.*, 2016a; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009). Existen dos rutas de activación del silenciamiento génico: a nivel transcripcional (TGS) y a nivel post-transcripcional (PTGS) (Rajeevkumar *et al.*, 2015). El silenciamiento génico transcripcional se lleva a cabo a través de metilación del promotor, bloqueando de esta manera la síntesis de ARNs mensajeros (ARNm). En el PTGS se degrada el ARNm de genes endógenos o exógenos provocando que no se realice la síntesis de proteínas (Rajeevkumar *et al.*, 2015).

La maquinaria del silenciamiento génico en plantas está compuesto por las proteínas: Dicer (DCL), Argonautas (AGO), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp o RDR), las cuales actúan en diferentes etapas del mecanismo celular para generar ARNs pequeños y subsecuentemente degradarlos (Zhang *et al.*, 2015). En plantas, este mecanismo es conocido como silenciamiento génico inducido por ARN (Zhang *et al.*, 2015), que tiene la función de estabilidad y disponibilidad del ARNm en el proceso de la traducción, formación de la heterocromatina, metilación de ADN, control de los transposones para brindar estabilidad al genoma, en el crecimiento y desarrollo, y principalmente, en la defensa contra los virus, ya que estos patógenos tiene la capacidad de inducir el silenciamiento génico (Baulcombe, 2004; Rajeevkumar *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Por tal motivo, los virus para contrarrestar el sistema de defensa de la planta producen proteínas capaces de suprimir el silenciamiento génico con la finalidad de infectar y replicarse en el hospedante, con lo cual se corrobora la función de este fenómeno como mecanismo de defensa antiviral (Wieczorek y Obrępalska-Stepłowska, 2015). Debido a lo anterior, el silenciamiento génico ha tenido un auge como una herramienta biotecnológica para generar resistencia a virus en plantas, al introducir construcciones de genes que activan el mecanismo del silenciamiento génico contra los virus fitopatógenos (de Souza *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015).

Por tal motivo, el propósito de este escrito es presentar de manera clara y concisa el mecanismo del sistema de silenciamiento genético en plantas para su entendimiento a nivel molecular y su posible intervención en el diseño de estrategias contra los virus fitopatógenos.

Historia del silenciamiento génico

A finales de los años 80 y principios de los 90, un grupo de investigadores en biotecnología de plantas modificaron genéticamente el color de las flores de petunia (*Petunia hybrida*), al tratar de incrementar el color púrpura de la planta (Lindbo, 2012). Ellos diseñaron un clon con el promotor p35S y el gen de la chalcona sintasa-A (CHS-A). La enzima chalcona sintasa es un elemento importante en la biosíntesis de flavonoides, que es uno de los componentes principales de las antocianinas (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente, insertaron el clon diseñado en el genoma de la petunia, utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, ya que tenían planeado que con el promotor p35S se incrementaría la función del gen CHS-A para dar origen a flores de color púrpura más intenso (Lindbo, 2012; Napoli *et al.*, 1990). Sin embargo, inesperadamente, más del 40% de las plantas transgénicas tenían una apariencia de color blanco o variegado (Napoli *et al.*, 1990). Los investigadores se percataron que tanto el gen endógeno como el gen introducido habían disminuido su expresión, desconociendo la naturaleza del fenómeno, al cual nombraron como mecanismo de “cosupresión” (Napoli *et al.*, 1990).

Un fenómeno similar, fue descrito en 1992 con el hongo *Neurospora crassa* (*N. crassa*). Romano y Macino (1992), insertaron al genoma de *N. crassa* dos secuencias de genes involucrados en la producción de carotenos, el cual brinda el color naranja al hongo, con la finalidad de generar más pigmento. Los investigadores obtuvieron como resultado que los hongos transgénicos perdían el color naranja, siendo el 36% de color blanco, debido a la sobreexpresión de los genes insertados, llamando a este fenómeno “apagamiento” (Romano y Macino, 1992).

Un año después, un grupo de investigadores en virus en plantas, observaron un mecanismo parecido al de cosupresión y al de apagamiento. El equipo de investigación utilizó plantas transgénicas de tabaco que expresaban el gen de la cápside del *Virus del grabado de tabaco* (TEV) de forma completa e incompleta, originando una reducción en la multiplicación y propagación viral en la planta (Lindbo *et al.*, 1993). Los investigadores propusieron que tal mecanismo se debía por la degradación del ARN del transgen en el citoplasma, a nivel post-transcripcional, ocasionando la resistencia a la planta (Lindbo *et al.*, 1993).

Posteriormente, en otra investigación construyeron un vector de clonación que contenía el genoma parcial de la proteína de la cápside del *Virus del mosaico del tomate* (ToMV) y del *Virus mosaico del tabaco* (TMV), y una secuencia corta del gen fitoena desaturasa. El gen fitoena desaturasa es endógeno de las plantas y está involucrada en la síntesis de carotenoides. El vector fue insertado en la planta *Nicotiana benthamiana*. Después, los investigadores observaron que las plantas presentaban hojas de color blanco, concluyendo que el transcripto viral desactivaba la expresión del gen endógeno de fitoena desaturasa (Kumagai *et al.*, 1995).

Con los resultados de anteriores investigaciones, se propuso el término “Silenciamiento Génico Inducido por Virus” (VIGS) para describir el fenómeno de la recuperación de la planta a partir de la infección por un virus (van Kammen, 1997). Sin embargo, ahora es ampliamente utilizado para la aplicación de un vector viral para silenciar un gen de la planta (Hull, 2014), dichos fenómenos son explicados por el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.

En 1998, Andrew Fire y Craig Mello, encontraron una forma eficiente de silenciar genes como estrategia para estudiar su función en el desarrollo del nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Demostraron que al insertar ARN de doble cadena (ARNdc) en *C. elegans* se lograba inactivar el gen de la misma secuencia del ARNdc, originando en los nematodos defectos estructurales y espasmos por la señal sistémica entre los tejidos (Fire *et al.*, 1998). A tal acontecimiento lo nombraron ARN interferente, sugiriendo que es un mecanismo endógeno, que degrada el ARNm y es usado por la célula para controlar la expresión génica. Asimismo, los autores indicaban que dicho fenómeno explicaba el mecanismo de cosupresión, apagamiento y post-transcripcional (Fire *et al.*, 1998; Lindbo, 2012).

Mecanismo del silenciamiento génico en plantas inducido por virus

La utilización de la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS), consiste en usar vectores virales modificados con fragmentos de un gen de interés que se quiere silenciar en el hospedante (Cuin y Wang, 2016; Purkayastha y Dasgupta, 2009). Tal fenómeno se basa en silenciar el gen como parte del mecanismo de sistema de defensa de la planta contra la infección viral (Hull, 2014).

El mecanismo de silenciamiento génico inducido por virus a nivel post-transcripcional, actúa ante la presencia de ARNdc, el cual se deriva en la replicación por la intervención de la enzima ARN polimerasa ARN dependiente (RDR) (Lange *et al.*, 2013). Al generarse el ARNdc, es reconocido por una maquinaria celular y cortada en fragmentos de 21 a 24 nucleótidos, denominados ARN pequeños interferentes (siARN) (Lacomme, 2015; Purkayastha y Dasgupta, 2009). Esta reacción es catalizada por la enzima ribonucleasa ARNasa III conocida como DCL (Lacomme, 2015; Unver y Budak, 2009). Los ARN pequeños producidos por la enzima DCL, son reconocidos por las proteínas de la familia argonautas (AGO), quienes los incorporan dentro de un complejo ribonucleoprotéico nombrado como complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Lacomme, 2015). Las proteínas argonautas son el componente principal del complejo RISC y tienen la función de mediar la interacción DCL-RISC (Salomon *et al.*, 2010). A continuación, por la acción de una enzima helicasa se rompen los puentes de hidrógeno y se separan los ARNdc, y RISC se queda con la cadena antisentido para degradarla a partir de la actividad endonucleasa de su sistema (Dykxhoorn y Lieberman, 2005). Adicionalmente, la cadena sencilla de los ARNs pequeños sirven para sintetizar su cadena complementaria de ARN por la intervención de la enzima RDR (Willmann *et al.*, 2011)). Una vez generadas varias copias de ARNdc de los siARNs, se desencadena una amplificación de la respuesta del silenciamiento génico a nivel local y sistémico (Lange *et al.*, 2013; Willmann *et al.*, 2011).

Características de las proteínas implicadas en el mecanismo de silenciamiento génico: DCL, AGO y RDR

El silenciamiento génico en plantas se lleva a cabo por la participación de las proteínas DCL, AGO y RDR para contrarrestar organismos patógenos, principalmente, virus.

DCL. Es una ribonucleasa de la familia ARNsa III, la cual es la encargada de cortar a los ARNdc en fragmentos de 21 a 24 nucleótidos durante la intervención en el mecanismo del silenciamiento génico (Hammond, 2005). La proteína DCL contiene seis dominios conocidos como: ATPasa/ARN helicasa, DUF283, PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), ARNasa IIIa (RIIIa), ARNasa IIIb (RIIIb) y unión a ARNdc (dsRBD) (Macrae *et al.*, 2006a; Macrae *et al.*, 2006b). El dominio ATPasa/ARN helicasa es indispensable en el corte de ARNs pequeños, está involucrado en el reconocimiento y procesamiento de las horquillas de ARN para procesar miARNs y siARNs (Soifer *et al.*, 2008). La función del dominio DUF283 está

implicado en la selección de siARNs y miARNs a través del reconocimiento del ARNdc (Dlakic, 2006). El dominio PAZ posee una región amino-terminal, la cual tiene la función de reconocer y unir a los nucleótidos localizados en el extremo 3'; mientras que los dominios RIIIa y RIIIb son el centro activo de DCL cortando a los ARNdc para dar origen a ARNs pequeños de 21 a 24 nucleótidos debido a la distancia entre PAZ y los dominios RIII (Kurzynska-Kokorniak *et al.*, 2015). La hélice entre el dominio PAZ y los dominios RIII mide 65 Angstroms, lo cual corresponde a 2 vueltas de la hélice de ARNdc que es alrededor de 21 a 24 nucleótidos (Ma *et al.*, 2012; Macrae *et al.*, 2006a). El dominio dsRBD contiene una región carboxilo-terminal, y ayuda en la unión del sustrato y corte de los ARNdc (Ma *et al.*, 2012).

En la planta *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) se codifica cuatro enzimas DCL nombradas: DCL1, DCL2, DCL3 y DCL4, cada una con distintas funciones en la ruta del silenciamiento génico (Agius *et al.*, 2012) (Cuadro 7). DCL1 en la ruta de microARNs, está unido a la proteína HLY1 y SE para escindir a los pri-micro ARNs y generar a los pre-microARNs, y posteriormente cortarlos para producir miARNs maduros de doble cadena con un tamaño de 21 nucleótidos (Xie *et al.*, 2015; Lindbo, 2012). En la ruta de nat-siARNs, DCL1 está involucrado en generar nat-siARNs secundarios de doble cadena con una longitud de 21 nucleótidos que después van a ser transportados por la proteína AGO para su degradación (Borsani *et al.*, 2005; Lindbo, 2012). Además, DCL1 corta en bloques de 21 nucleótidos a los ARNdc de los transcritos del gen TAS, originando fragmentos de tas-siARNs de doble cadena (Wu *et al.*, 2012). DCL2 corta en tamaños de 24 nucleótidos los transcritos primarios de nat-siARN, generados por la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN III y está involucrado en el silenciamiento de los transgenes (Borsani *et al.*, 2005; Paren *et al.*, 2015). DCL3 corta los transcritos generados por la enzima RDR2 para formar ra-siARNs de doble cadena y está involucrada en la generación de nat-siARNs de 24 nucleótidos cuando la planta está bajo condiciones de estrés (Guleria *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2015). La enzima DCL4 unida a la proteína DRB4, corta los ARNdc transcritos por la proteína RDR6, en bloques de 21 nucleótidos, originando fragmentos de tas-siARNs de doble cadena y está involucrado en el silenciamiento de los transgenes (Eamens *et al.*, 2008; Guleria *et al.*, 2011; Paren *et al.*, 2015).

Ante infecciones virales en *A. thaliana*, DCL4 es esencial para inhibir la multiplicación viral a nivel local y DCL2 actúa para contrarrestar la infección sistémica del virus *Potato virus X* (PVX), generando siARNs virales de 22 y 21 nucleótidos, respectivamente (Andika *et al.*, 2015). Sin embargo, con el virus *Turnip mosaic virus* (TuMV), DCL2 y DCL4 actúan en conjunto para silenciar sistémicamente la infección viral, y además la actividad de DCL4 es suficiente para suprimir la propagación del virus en las hojas inoculadas (García-Ruiz *et al.*, 2010). DCL3 junto con la proteína DRB3 intervienen para contrarrestar las infecciones virales por *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) y *Beet curly top virus* (BCTV), generando siARNs con una longitud de 24 nucleótidos (Raja *et al.*, 2014).

Cuadro 7. Proteínas DCL involucradas en la ruta de silenciamiento génico en *A. thaliana*.

Proteína DCL	Tamaño de fragmentos generados (Nucleótidos) por DCL	Función	Referencia
DCL1	21	Generación de miARNs, nat-siARNs secundarios y ta-siARNs	Borsani <i>et al.</i> , 2005; Wu <i>et al.</i> , 2012; Xie <i>et al.</i> , 2015
DCL2	22 o 24	Generación de nat-siARNs primarios y en la defensa viral	Borsani <i>et al.</i> , 2005; Andika <i>et al.</i> , 2015
DCL3	24	Generación de nat-siARNs, ra-siARNs y en la defensa viral	Guleria <i>et al.</i> , 2011; Raja <i>et al.</i> , 2014; Yuan <i>et al.</i> , 2015
DCL4	21	Generación de ta-siARNs y en la defensa viral	Andika <i>et al.</i> , 2015; Guleria <i>et al.</i> , 2011

AGO. La proteína AGO es uno de los componentes esenciales del mecanismo de silenciamiento génico, tiene la función de unirse a los fragmentos cortados por las enzimas DCLs y llevarlos a RISC para su corte o inhibición (Baumberger y Baulcombe, 2005; Carbonell y Carrington, 2015). AGO presenta cuatro dominios en su estructura molecular,

los cuales son: PAZ, MID, PIWI y N-terminal (Hutvagner y Simard, 2008). El dominio PAZ reconoce el extremo 3' de los ARNs pequeños para dirigir el ARN a su degradación (Mallory y Vaucheret, 2010). Entre el dominio MID y PIWI, está el sitio que reconoce al extremo 5' de los ARNs pequeños, originando la unión de los ARNs pequeños a la proteína, siendo esta región altamente conservada (Parker y Barford, 2006). En el centro catalítico de RISC se localiza el dominio PIWI, el cual funciona como una ARNasa H para cortar a los ARNs pequeños. El motivo QF-V de PIWI está relacionado en el reconocimiento de las bases apareadas en el nucleótido 15 de los ARNs pequeños de doble cadena (Zhang *et al.*, 2014). El dominio N-terminal facilita la separación de los ARNs pequeños de doble cadena por su región amino-terminal (Mallory y Vaucheret, 2010).

A partir de estudios genéticos en la planta *A. thaliana*, se descubrió que codifica para diez genes de AGO conocidos como: AGO1, AGO2, AGO3, AGO4, AGO5, AGO6, AGO7, AGO8, AGO9 y AGO10 (Agius *et al.*, 2012). Estas proteínas se clasifican en tres grupos: AGO1/5/10, AGO2/3/7 y AGO4/6/9, en función a las similitudes en sus secuencias, a su redundancia funcional, y a sus características de unión con el ARN. Sin embargo, se encontró que AGO3 tiene mayor afinidad y redundancia con AGO4 (Zhang *et al.*, 2016b).

En la ruta de generación de ARNs pequeños para regular la expresión de genes en la planta, AGO1 es la principal proteína que se une y transporta a los miARNs (Xie *et al.*, 2015). No obstante, AGO7 y AGO10 se unen a los miR390 y miR165/166, respectivamente (Montgomery *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015). En la ruta de siARNs, AGO7 se une al miR390 y AGO1 a miR173 o miR828 para iniciar la biogénesis de ta-siARNs después de la transcripción de los genes TAS3, y TAS1/2 o TAS4, respectivamente (Allen y Howell, 2015; Montgomery *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2015). En la ruta de nat-siARNs, AGO2 transporta los nat-ARN de sentido positivo para iniciar su degradación (Oliver *et al.*, 2014). AGO4, se une a los ra-siARNs para desencadenar la metilación del ADN (Xie y Yu, 2015; Wierzbicki *et al.*, 2009).

Hasta el momento, en *A. thaliana* se ha demostrado que las proteínas AGO1, AGO2, AGO4, AGO5, AGO7 y AGO10 tienen actividad antiviral contra virus de ARN (Carbonell y Carrington, 2015; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009). Ante la infección por PVX, se induce la expresión de AGO5, y se restringen la infección sistémica por la acción

de AGO2 y AGO5 (Brosseau y Moffet, 2015). Mientras, el mecanismo de silenciamiento génico ante TuMV, activa AGO2 para limitar la infección viral en las hojas. Sin embargo, AGO1, AGO2 y AGO10 fomentan la actividad antiviral contra TuMV en varios órganos de la planta a nivel sistémico (García-Ruiz *et al.*, 2015). En otra investigación, se identificó que AGO1 y AGO7 transportan los siARNs virales de *Turnip crinckle virus* (TCV) al complejo RISC para su corte o inhibición (Qu *et al.*, 2008). Además, cuando *Tobacco rattle virus* (TRV) infecta a *A. thaliana*, las proteínas AGO2 y AGO4 tienen un papel importante en la restricción del virus al inicio de la enfermedad (Ma *et al.*, 2015).

No obstante, AGO4 también está involucrada en el silenciamiento génico de virus de ADN pertenecientes a la familia Geminivirus a través de la metilación del ADN viral (Raja *et al.*, 2014).

RDR. Es un componente esencial en el mecanismo del silenciamiento génico al usar el ARN de cadena sencilla para sintetizar ARN_{dc}, el cual sirve para iniciar o amplificar la señal de silenciamiento génico (Willmann *et al.*, 2011). La estructura de la proteína RDR contiene tres subdominios, conocidos como: dedos (fingers), palma (palm) y pulgar (thumb) (Hansen *et al.*, 1997). El subdominio de palma es el más conservado y se caracteriza por tener los motivos A, B y C, los cuales son esenciales en la actividad de la RDR. El motivo A (DxDGD) y el motivo C (GDD) están implicados en la unión de Mg²⁺ y/o Mn²⁺ (Gohara *et al.*, 2000; Makeyev y Bamford, 2002). El motivo B está involucrado en la selección de los ribonucleótidos trifosfatos para llevar a cabo la síntesis de ARN, ya que se libera dos fosfatos y se produce la energía necesaria para la adhesión de los nucleótidos (Gohara *et al.*, 2000).

En la planta de *A. thaliana*, se tiene conocimiento que codifica seis proteínas RDRs, nombradas: RDR1, RDR2, RDR3, RDR4, RDR5 y RDR6, las cuales algunas de ellas tienen diferentes funciones en la ruta del silenciamiento génico (Agius *et al.*, 2012) (Cuadro 8). RDR2, interviene en la biogénesis de ra-siARNs y nat-siARNs al generar cadenas de ARN_{dc}, las cuales serán posteriormente cortadas por la enzima DCL (Guleria *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2015). RDR6, es requerido en la ruta de nat-siARNs y ta-siARNs para sintetizar ARN_{dc}, el cual se une a la proteína SGS3 para estabilizarlos (Howell *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2015). En la defensa contra virus fitopatógenos, RDR1 y RDR6 son requeridos en *A. thaliana* para amplificar los siARNs virales de *Cucumber mosaic virus* (Wang *et al.*, 2010). En estudios

recientes, se ha encontrado que la interacción del supresor de silenciamiento génico de CMV, conocido como 2b, unido a la proteína AGO, interfiere con la actividad de RDR1 y RDR6 (Fang *et al.*, 2016). Además, se demostró que RDR1 y RDR6 actúan de forma conjunta para restringir la infección sistémica por TuMV (García-Ruiz *et al.*, 2010). Asimismo, se ha identificado que la actividad redundante de RDR1, RDR2 y RDR6 es importante para el silenciamiento antiviral y la biogénesis de siARNs provenientes del virus *Tobacco rattle virus* (TRV), debido a que el ARNdc viral sirve como sustrato para la producción de siARNs (Donaire *et al.*, 2008).

Cuadro 8. Proteínas RDRs que intervienen en el mecanismo de silenciamiento génico en plantas.

Proteína RDR	Función	Referencia
RDR1	En la defensa antiviral	García-Ruiz <i>et al.</i> , 2010; Wang <i>et al.</i> , 2010
RDR2	En la biogénesis de las rutas de ra-siARNs, nat-siARNs y en la defensa antiviral	Donaire <i>et al.</i> , 2008; Yuan <i>et al.</i> , 2015
RDR3	No se conoce su función	Willmann <i>et al.</i> , 2011
RDR4	No se conoce su función	
RDR5	No se conoce su función	
RDR6	En la biogénesis de la ruta de nat-siARNs y ta-siARNs, y en la defensa antiviral	García-Ruiz <i>et al.</i> , 2010; Howell <i>et al.</i> , 2007; Yuan <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2010

Formación de ARN pequeños involucrados en el mecanismo de silenciamiento génico en plantas: miARN y siARN

Hasta el momento, se conoce dos rutas de origen de ARN pequeños, ya sea a partir de miARNs o siARNs (Zhang *et al.*, 2015). El silenciamiento génico es parte de un sistema

complejo que utiliza a los microARNs y siARNs como molde y patrón de reconocimiento, para iniciar la degradación de la secuencia de ácidos nucleicos (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009).

miARN. Es un regulador de genes endógenos de la planta durante el desarrollo y diferenciación celular, en la regulación de los procesos de desarrollo y respuestas de estrés abiótico y biótico (Xie *et al.*, 2015). Los miARN son el 10% de los ARN pequeños presentes en la planta modelo de *A. thaliana*, mientras que los siARN son el 90% (Meyers *et al.*, 2008). En los últimos años, se han identificado 872 miARNs en 71 especies de plantas (Zhang *et al.*, 2006).

Los precursores de miARNs son transcritos que se originan a partir de genes celulares por la intervención de la ARN polimerasa II o III (Bartel, 2004; Guleria *et al.*, 2011). A esta primera molécula de ARN se le denomina microARN primario (pri-microARN), la cual está conformada por una longitud de varias kilobases, y contienen estructuras en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle (Bartel, 2004). Posteriormente, es procesada en el núcleo por la enzima DCL1 en asociación con la proteína nuclear con dominio de unión a RNAdc conocida como HYL1 y la proteína Serrate (SE) (Kurihara *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2015), para formar al precursor del microARN (pre-microARN) con forma de horquilla de una longitud de entre 70 y 100 nucleótidos que, además, posee dos nucleótidos colgantes en su extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5' (Guleria *et al.*, 2011). Los pre-microARN son procesados por la enzima DCL1 para formar miARNs maduros de doble cadena, los cuales son de un tamaño de 21 nucleótidos (Lindbo, 2012). Los miARNs maduros son metilados en sus extremos por la enzima metiltransferasa HEN1, se metila el grupo hidroxilo 2' de la pentosa que se encuentra en el extremo 3' de los miARNs maduros, para estabilizar la secuencia de ARN y evitar su degradación (Yu *et al.*, 2005). Posteriormente, los miARNs de doble cadena son exportados al citoplasma celular por una proteína de membrana conocida como HASTY (HST) (Park *et al.*, 2005). Los miARNs se separan en dos hebras por la acción de la enzima helicasa debido a que rompe los puentes de hidrogeno (Guleria *et al.*, 2011). Los miARNs de cadena sencilla que son menos estables en la región 5', se unen a las proteínas AGO1, AGO7 o AGO10, dirigiéndose al complejo RISC para interactuar con su ARN mensajero complementario y desencadenar la escisión o supresión de la traducción (Eamens *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2015).

siARN. Son los defensores de la integridad del genoma de la planta ante la presencia de ácidos nucleicos extraños o invasivos, tales como los virus, transposones, transgenes y a la adaptación al estrés (YingBo *et al.*, 2009). Los siARNs son de un tamaño de 21 a 24 nucleótidos y se originan a partir de precursores de doble y larga cadena de ARN (Guleria *et al.*, 2011). Existen varios tipos de siARNs, entre los que destacan son: siARNs asociados a la cromatina (ra-siARN), ARN naturales antisentido de tamaño pequeño (nat-siARN) y ARNs trans-activador de tamaño pequeño (ta-siARN) (YingBo *et al.*, 2009; Guleria *et al.*, 2011).

El proceso de formación de ra-siARNs se lleva a partir de regiones de la heterocromatina que son procesadas por la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN IV (ARN Pol IV) y posteriormente la enzima RDR2 usa los transcriptos para generar cadenas de ARNdc (Herr *et al.*, 2005; Xie y Yu, 2015). Los ARNdc son procesados por la enzima DCL3 para formar ra-siARNs de doble cadena con un tamaño de 24 nucleótidos (Lindbo, 2012; Xie *et al.*, 2004). Los ra-siARNs son metilados por la enzima HEN1 y son separados por la intervención de la enzima helicasa (Guleria *et al.*, 2011; Martínez de Alba *et al.*, 2013). Los ra-siARNs se unen a AGO4, y tal interacción recluta a los transcriptos de la ARN polimerasa dependiente de ADN V para catalizar la metilación del ADN (Xie y Yu, 2015; Wierzbicki *et al.*, 2009).

Los nat-siARN se originan a partir de genes naturales antisentido (nat), es decir de cadenas opuestas de genes de una misma región genómica, quienes con la ayuda de la ARN polimerasa dependiente de ADN III (ARN Pol III) forman los nat-ARNdc, los cuales tienen complementariedad en sus extremos 3' (Martínez de Alba *et al.*, 2013). Los nat-ARNdc son procesados por DCL2 o DCL3 (Borsani *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2015), para formar nat-siARNs de doble cadena con un tamaño de 24 nucleótidos, los cuales posteriormente son metilados por la enzima HEN1 y son separados por la intervención de la enzima helicasa (Borsani *et al.*, 2005; Guleria *et al.*, 2011; Martínez de Alba *et al.*, 2013). Después, la hebra de sentido negativo de nat-siARN se une a la proteína AGO2 para reconocer y cortar la hebra de sentido positivo del nat-ARNdc original que la complementa (Martínez de Alba *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2014). El ARN procesado se convierte en ARNdc por la actividad de la enzima RDR6 o RDR2 (Borsani *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2015), y por la proteína supresora

de silenciamiento génico 3 (SGS3) que está involucrada en estabilizar el ARN generado (Borsani *et al.*, 2005; Martínez de Alba *et al.*, 2013). El ARNdc formado es cortado por la enzima DCL1 o DCL3 para generar nat-siARNs de doble cadena con una longitud de 21 o 24 nucleótidos, respectivamente (Yuan *et al.*, 2015), los cuales son metilados por la enzima HEN1 y son separados por la intervención de la enzima helicasa (Guleria *et al.*, 2011; Martínez de Alba *et al.*, 2013). Los nat-siARNs se unen a la proteína AGO2 para ser transportadas a su secuencia complementaria del nat-ARN mensajero de sentido positivo para desencadenar su degradación (Martínez de Alba *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 2014).

Los ta-siARNs se originan a través de genes específicos conocidos como TAS que contienen sitios específicos de unión a miARN (Martínez de Alba *et al.*, 2013). Los ARNm del gen TAS se generan por la intervención de la enzima ARN Pol III (Martínez de Alba *et al.*, 2013). Posteriormente, la cadena negativa del miARN, el cual es específica a una región de TAS, se unen a la proteína AGO1 o AGO7, las cuales son requeridas en la regulación de la ruta de TAS1/2/4 o TAS3, respectivamente (Allen y Howell, 2010; Montgomery *et al.*, 2008). Después, la cadena negativa del miARN es transportado por AGO a su secuencia complementaria del ARNm de TAS para desencadenar la producción de ta-siARNs (Allen y Howell, 2010; Martínez de Alba *et al.*, 2013). Subsecuentemente, la proteína RDR6 sintetiza los ARNdc (Howell *et al.*, 2007). En seguida, la proteína SGS3 estabiliza los productos generados para evitar la degradación de los ta-siARNs (Martínez de Alba *et al.*, 2013). Más tarde, la enzima DCL4 o DCL1 junto con la proteína de unión de ARNdc 4 (DRB4), cortan los ARNdc en bloques de 21 nucleótidos, originando fragmentos de tas-siARNs de doble cadena (Eamens *et al.*, 2008; Howell *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2012). Los ta-siARNs de doble cadena son metilados por la enzima HEN1 y son separados por la intervención de la enzima helicasa (Li *et al.*, 2005b). Las cadenas de ta-siARNs de sentido negativo se unen a AGO1 o AGO4 para ser transportadas a su secuencia complementaria de ARNm de TAS para desencadenar su degradación o iniciar el proceso de metilación del ADN (Wu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015).

Supresores virales del silenciamiento génico en plantas

El silenciamiento génico en plantas es un sistema de defensa que impide la multiplicación y propagación de los virus (García y Pallas, 2015). Sin embargo, los virus, tanto de genoma de ARN o ADN, han desarrollado estrategias para contrarrestar el sistema

de defensa de la planta, al codificar proteínas capaces de evadir o suprimir en diferentes fases al mecanismo del silenciamiento génico de la planta (Cuadro 9) (Pumplin y Voinnet, 2013; Voinett *et al.*, 1999). Las proteínas supresoras de silenciamiento actúan de diferente forma con respecto al componente de la maquinaria del silenciamiento génico que se quiere afectar (Voinett *et al.*, 1999). Algunos modos de acción de las proteínas supresoras conocidos son: 1) inhibición de la producción de ARN pequeños, interfiriendo con el mecanismo de la biogénesis de ARN pequeños o con la unión a ARNdc virales, (2) unión y secuestro de ARN pequeños, previniendo de esta forma su incorporación al RISC, e (3) inactivación del RISC mediante la degradación de la proteína AGO o la inhibición de su actividad de escisión (Agius *et al.*, 2012). Debido a los diferentes modos de acción y a la naturaleza de los supresores de silenciamiento, estos han evolucionado por separado para adaptarse a la interacción virus-planta (Voinett *et al.*, 1999). En algunas investigaciones se ha demostrado que los virus están involucrados en la regulación de miARNs. Por ejemplo, el supresor de silenciamiento génico HC-Pro de *Turnip mosaic virus* (TuMV) reduce los niveles de miARNs al interferir con el miR171, ocasionando de esta manera que se no desencadene la señal del silenciamiento génico (Kasschau *et al.*, 2003). En el caso del virus *Tomato spotted wilt virus*, su supresor de silenciamiento génico, conocido como NSs, se une a la cadena larga de ARNdc, al pre-miARN, al miARN y siARN de doble cadena para evitar el corte de ARN viral por la enzima DCL y su degradación por RISC, logrando interferir en la actividad del mecanismo de silenciamiento génico de la planta (Schnettler *et al.*, 2010; Hedil *et al.*, 2015).

Por otra parte, la primera observación de que los virus codifican proteínas supresoras de silenciamiento, se debió a partir de los estudios con infecciones sinérgicas virales, ya que los síntomas eran más severos por la coinfección de un segundo virus y de esta forma se tuvo como evidencia la existencia de un mecanismo que contrarresta el sistema de defensa de la planta (González-Jara, 2004).

Cuadro 9. Proteínas supresoras de virus en plantas y sus funciones en el mecanismo de silenciamiento génico*.

Género de virus	Especie	Proteína supresora de silenciamiento	Función	Referencia
Virus de ARN de cadena positiva en plantas				
Ampelovirus	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)</i>	P19.7	Interfiere en la ruta de siARN y miARN	Gouveia y Nolasco, 2012; Gouveia <i>et al.</i> , 2012
Aureusvirus	<i>Pothos latent virus (PoLV)</i>	P14	Unión a ARNdc y siARNdc	Merai <i>et al.</i> , 2005
Benyvirus	<i>Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)</i>	P14	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Chiba <i>et al.</i> , 2013
Carlavirus	<i>Potato virus M (PVM)</i>	TGBp1	Movimiento célula-célula - Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Senshu <i>et al.</i> , 2011
Carmovirus	<i>Turnip Crinkle virus (TCV)</i>	P38	Proteína de la cápside - Unión a la proteína AGO1 y AGO2, unión a ARNdc, bloqueo de siARN, regulación de DCL1 para antagonizar a DCL3 y DCL4, regulación del AGO1 a través de mir168.	Azevedo <i>et al.</i> , 2010; Jin y Zhu, 2010; Várallyay y Havelda, 2013, Zhang <i>et al.</i> , 2012, Merai <i>et al.</i> , 2006
Cucumovirus	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>	2b	Movimiento célula-célula en el hospedante – unión al ARN de cadena sencilla,	Fang <i>et al.</i> , 2016; Nemes <i>et al.</i> , 2014; Diaz-

			secuestra siARN y ARNdc, unión a AGO4, regulación de RDR6, regulación de AGO1 a través de mir168, unión a AGO para interferir la actividad de RDR1/6	Pendon <i>et al.</i> , 2007; Duan <i>et al.</i> . 2012; Feng <i>et al.</i> , 2013; Gonzalez <i>et al.</i> , 2012; Hamera <i>et al.</i> , 2012; Varallyay y Havelda, 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2006
Closterovirus	<i>Beet yellows virus (BYV)</i>	P21	Polimerasa – unión a ARNdc, secuestra siARN de cadena doble y bloqueo de la metiltransferasa HEN1.	Merai <i>et al.</i> , 2006, Yu <i>et al.</i> , 2006, Reed <i>et al.</i> , 2003; Chapman <i>et al.</i> , 2004
Comovirus	<i>Cowpea mosaic virus (CPMV)</i>	CP (S)	Proteína de la cápside – Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Canizares <i>et al.</i> , 2004
Crinivirus	<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus (CYSDV)</i>	P25	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Kataya <i>et al.</i> , 2009
Citivirus	<i>Citrus leaf blotch virus (CLBV)</i>	MP	Movimiento célula-célula – probablemente interfiere en la vía de silenciamiento de ARNdc y en la generación de ARN pequeños.	Renovell <i>et al.</i> , 2012

Dianthovirus	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i> (RCNMV)	Proteínas de replicación (p27 y p88)	Interfiere en la ruta de miARN y siARN	Takeda <i>et al.</i> , 2005
Enamovirus	<i>Pea enation mosaic virus-1</i> (PEMV-1)	P0	Desestabiliza la proteína AGO1	Fusaro <i>et al.</i> , 2012
Furovirus	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i> (SBWMV)	19K	Determinante de patogenicidad - Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Te <i>et al.</i> , 2005
Hordeivirus	<i>Barley stripe mosaic virus</i> (BSMV)	γB	Polimerasa, movimiento célula-célula, transmisión por semilla, determinante de patogenicidad – unión a ARNdc	Merai <i>et al.</i> , 2006; Yelina <i>et al.</i> , 2002
Illarvirus	<i>Asparagus virus 2</i> (AV-2)	2b	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Shimura <i>et al.</i> , 2013
Ipomovirus	<i>Sweet potato mild mottle virus</i> (SPMMV)	P1	Unión a la proteína AGO	Szabo <i>et al.</i> , 2012
Nepovirus	<i>Tomato ringspot virus</i> (ToMV)	CP	Proteína de la cápside – interviene en la degradación de AGO1	Karran y Sanfacon, 2014
Poacevirus	<i>Triticum mosaic virus</i> (TriMV)	P1	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Tatineni <i>et al.</i> , 2012
Pecluvirus	<i>Peanut clump virus</i> (PCV)	P15	Movimiento célula-célula – unión al siARN, interferencia en miARNs	Merai <i>et al.</i> , 2006; Dunoyer <i>et al.</i> , 2002

Polerovirus	<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	P0	Determinante de patogenicidad – Desestabiliza las proteínas AGOs	Hendelman <i>et al.</i> , 2013
Potexvirus	<i>Potato virus X</i> (PVX)	P25	Movimiento célula-célula – degradación del AGO1, agregación con RDR6	Chiu <i>et al.</i> , 2010; Okano <i>et al.</i> , 2014
Potyvirus	<i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)	Hc-Pro	Movimiento célula-célula, determinante de patogenicidad, transmisión por áfidos – unión a siARNs, bloqueo del siARN primario por la interacción con el factor RAV2, interferencia con la ruta miARN	Sahana <i>et al.</i> , 2014; Endres <i>et al.</i> , 2010; Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2010; Garcia-Ruiz <i>et al.</i> , 2015; Yu <i>et al.</i> , 2006;
Rymovirus	<i>Agropyron mosaic virus</i> (AgMV)	Hc-Pro	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Young <i>et al.</i> , 2012
Sobemovirus	<i>Rice yellow mottle virus</i> (RYMV)	P1	Movimiento célula-célula, determinante de patogenicidad – reducción en la acumulación de 21 y 24 nt de siARNs, deslocalización de 21 nt siARN	Lacombe <i>et al.</i> , 2010; Gillet <i>et al.</i> , 2013; Weinheimer <i>et al.</i> , 2010
Tobravirus	<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	16K 29K	Movimiento célula-célula – interfiere en la ruta de formación de ARNdc Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento 29K.	Martinez-Priego <i>et al.</i> , 2008 Deng <i>et al.</i> , 2013

Tombusvirus	<i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	P19	Movimiento célula-célula, determinante de patogenicidad – unión a ARNdc, interfiere con la metilación 3' de ARN, regulación de mir168 mediada por la regulación de AGO1	Koukiekoloa <i>et al.</i> , 2007; Lakatos <i>et al.</i> , 2006; Omarov <i>et al.</i> , 2006; Havelda <i>et al.</i> , 2005; Lozsa <i>et al.</i> , 2008
Tobamovirus	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	P122	Polimerasa – unión a siARN y miARN, regulación de AGO1 a través de miR168	Csorba <i>et al.</i> , 2007 y Várallyay y Havelda, 2013
Trichovirus	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i> (ACLSV)	P50	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Yaegashi <i>et al.</i> , 2007; Yaegashi <i>et al.</i> , 2008
Tritimovirus	<i>Wheat streak mosaic virus</i> (WSMV)	P1	Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Young <i>et al.</i> , 2012
Tymovirus	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV)	P69	Movimiento célula-célula, determinante de patogenicidad – inhibición de la metilación de ADN, regulación de miARN y DCL1	Chen <i>et al.</i> , 2004
Vitivirus	<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	P10	Unión a siARN y miARN	Zhou <i>et al.</i> , 2006
Virus de ARN de cadena negativa en plantas				
Tospovirus	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	NSs	Determinante de patogenicidad – unión a siARN, miARNdc, ARNdc y secuestrador de siARN	García <i>et al.</i> , 2006; Schnettler <i>et al.</i> , 2010; Eifan <i>et al.</i> ,

				2013;Hedil <i>et al.</i> , 2015
Tenuivirus	<i>Rice hoja blanca virus</i> (RHBV)	NS3	Determinante de patogenicidad - unión a siARN, miARN y ARNdc	Hemmes <i>et al.</i> , 2007; Shen <i>et al.</i> , 2010
Nucleorhabdovirus	<i>Rice yellow stunt rhabdovirus</i> (RYSV)	P6	Bloquea RDR6 a través de la síntesis de siARN secundarios	Guo <i>et al.</i> , 2013
Virus de ARN de doble cadena en plantas				
Phytoreovirus	<i>Rice dwarf virus</i> (RDV)	PNS10	Transmisión por vector – unión a siARNs y regulación de RDR6	Ren <i>et al.</i> , 2010
Oryzavirus	<i>Rice ragged stunt virus</i> (RRSV)	PNS6	Movimiento célula-célula - Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento	Wu <i>et al.</i> , 2010
Virus de ADN de cadena positiva en plantas				
Begomovirus	<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	AC4	Unión a miARN	Chellappan <i>et al.</i> , 2005
Curtovirus	<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	L2	Interfiere en la metilación de la cromatina por la inhibición de la Adenosina kinasa (ADK)	Raja <i>et al.</i> , 2008
Mastrevirus	<i>Wheat dwarf virus</i> (WDV)	Rep RepA	Unión a siARN Aún no se conoce la función del supresor de silenciamiento RepA	Wang <i>et al.</i> , 2014 y Liu <i>et al.</i> , 2014

Virus de ADN de doble cadena en plantas				
Caulimovirus	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV)	P6 (TAV)	Forma cuerpos de inclusiones – suprime la ruta siARN	Rodriguez <i>et al.</i> , 2014; Shivaprasad <i>et al.</i> , 2008

*Tomado de Csorba *et al.*, 2015 y Voinnet, 2005.

Aplicaciones del silenciamiento génico

El silenciamiento génico ha tenido un crecimiento exponencial en la innovación de métodos biotecnológicos para ser aplicados en animales, plantas y en el campo de la medicina humana. En plantas, el mecanismo de silenciamiento génico, ha sido utilizado como herramienta para el estudio de un gen en particular, al eliminar o sobre expresar una función específica (de Souza *et al.*, 2007; Wang y Waterhouse, 2001). Tal mecanismo se ha usado para modificar cultivos, al hacerlos resistentes a virus o a otros patógenos, al mejorar su calidad y componentes nutricionales (Shah *et al.*, 2012). Algunas de estas modificaciones en plantas se han llevado a cabo al usar virus modificados que contienen secuencias de un gen de interés (Cuadro 10), a través de la aplicación del mecanismo VIGS (Shimura y Pantaleo, 2011; Waterhouse y Helliwell, 2003). Una de las desventajas de la utilización de este procedimiento es la posibilidad de que los síntomas causados por la infección viral enmascaren las características deseadas para la planta y confieran resistencia sólo para el virus de interés siendo ineficaz cuando hay sinergismo con otros virus (de Souza *et al.*, 2007; Purkayastha y Dasgupta, 2009).

Cuadro 10. Virus usados en el silenciamiento génico para inducir el mecanismo VIGS.

Virus	Hospedante silenciado	Gen silenciado	Referencias
<i>African cassava mosaic virus</i> (ACMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Manihot esculenta</i>	pds, su, cyp79d2	Purkayastha y Dasgupta, 2009; Unver y Budak, 2009
<i>Brome mosaic virus</i> (BMV)	<i>Hordeum vulgare</i> , <i>Oryza sativa</i> y <i>Zea mays</i>	pds, actina 1, rubisco activasa	
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	<i>Glycine max</i>	chs, sf30h1	
<i>Potato virus X</i> (PVX)	<i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	pds	
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	<i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i>	Pds	
<i>Tobacco rattle virus</i> (TRV)	<i>A. thaliana</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Aquilegia vulgaris</i>	Rar1, EDS1, NPR1/NIM1 pds, rbcS	
<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV)	<i>A. thaliana</i>	pds, lfy	

El objetivo al usar el silenciamiento génico contra los virus de plantas es generar cultivos transgénicos con construcciones que expresen ARNdc de la secuencia del virus de interés, tal es el caso de plantas resistentes al *Citrus tristeza virus* (CTV) que expresan la proteína de la cubierta, también se ha utilizado con genes de la proteína de la cubierta del *Plum pox virus* (PPV) en árboles de ciruelos que les confiere resistencia al virus (Domínguez *et al.*, 2000; Scorza *et al.*, 2001).

Para contrarrestar las infecciones causadas por hongos fitopatógenos, como es el caso de *Blumeria graminis*, se han generado construcciones de ARNdc y siARN del gen *Avr10*, el cual está implicado en la patogenicidad del hongo, y se administra a plantas de cebada y trigo, originando una supresión en el crecimiento del patógeno. Esto ocurre porque hay una

transferencia de ARNdc o siRNA a partir de las células del hospedante hacia el patógeno cuando interactúa el haustorio del hongo con la planta para llevar a cabo el intercambio de señales, absorción de nutrientes y el intercambio de proteínas (Nowara *et al.*, 2010).

En años recientes, se han generado investigaciones para el control de plagas donde se introducen ARNdc en *Bombyx mori* (Lepidóptera), *Drosophila melanogaster* (Díptera), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleóptera) y en nematodos como *C. elegans*, para suprimir la expresión de ciertos genes de interés que son esenciales para su desarrollo y crecimiento (Duan *et al.*, 2012a). La absorción de ARNdc o siARN se inicia al ingerir el material vegetal, seguido por la reabsorción en el sistema digestivo. Dichos organismos adquieren estos ARNdc o siARN mediante la alimentación a partir de cultivos transgénicos, los cuales portan las construcciones para generar el silenciamiento génico contra los genes de estas plagas (Duan *et al.*, 2012a).

En el área de medicina, el mecanismo de silenciamiento génico tiene un gran potencial para desarrollar estrategias terapéuticas contra infecciones causadas por virus, algunos ejemplos son la supresión de genes de la hepatitis A, hepatitis B, HIV-1, virus de la Polio, virus de la Influenza y virus del Papiloma Humano estudiados en células humanas y en ratones al insertar siARNs (Li *et al.*, 2005a; Milhavet *et al.*, 2003). Además, el silenciamiento génico ha sido utilizado para desarrollar tratamientos contra el cáncer de páncreas y leucemia, al suprimir la expresión de un gen en particular cuando se insertan siARNs o ARNdc para detener el crecimiento del tumor y células cancerígenas de forma *in vitro* (Milhavet *et al.*, 2003). Por otro lado, las investigaciones en los trastornos neurodegenerativos con la tecnología del silenciamiento génico se han aplicado en cultivos celulares, ratones transgénicos y ratas, los cuales están dirigidas en la utilización de miARNs o siARNs para suprimir la actividad de las proteínas sinápticas que están implicadas en el desarrollo de enfermedades como el Huntington, esclerosis múltiple, Parkinson y Alzheimer (Nielsen y Nielsen, 2013). Asimismo, el silenciamiento génico se ha usado en cultivos celulares para investigar la reducción de la aterosclerosis y el daño al corazón mediante la inhibición de la enzima cdk2, la cual desempeñan un papel importante en la síntesis de colesterol (Ukomadu y Dutta, 2003).

Recientemente, se han generado programas computacionales para identificar la relación y tipos de asociación de miARNs con las enfermedades humanas, el cual consiste en integrar un conjunto de datos biológicos y en predecir interacciones de miARNs con alguna enfermedad en particular, todo esto con la finalidad de entender las bases moleculares a nivel de miARN y detectar los biomarcadores de las enfermedades humanas (Chen *et al.*, 2015). Algunos de estos métodos computacionales son los modelos de RBMMMDA y WBSMDA, los cuales proporcionan resultados en un corto periodo de tiempo y con bajo costo, con un gran valor en el diagnóstico, tratamiento y prevención de las enfermedades humanas (Chen *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016) . Sin embargo, tienen algunos sesgos cuando se relacionan los miARNs con enfermedades conocidas y la predicción aún no es muy satisfactoria (Chen *et al.*, 2016).

Por el momento, aún no se ha desarrollado un método eficaz de administración de las moléculas que van a originar el silenciamiento génico en el lugar de acción. Sin embargo, utilizando nanopartículas, se liberaron ARNs pequeños de forma *in vitro* en células humanas e *in vivo* en animales, dando resultados esperanzadores con la aplicación de la nanotecnología (Howard *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El silenciamiento génico se aplica en el área de la biotecnología, y con su empleo se han obtenido resultados contra determinadas enfermedades pero existe la incertidumbre de ponerla en práctica. La aplicación del mecanismo de silenciamiento génico aún no está optimizada por completo y existen limitaciones técnicas. Es necesario realizar más investigaciones para resolver los problemas de estabilidad, especificidad e interferencia en otros procesos celulares de los ARNs pequeños.

Además, es indispensable que a través del marco jurídico se regule el manejo de la técnica de silenciamiento génico para establecer sus límites éticos, establecer estrategias para analizar los riesgos de su aplicación y evitar su uso indebido.

Asimismo, el mecanismo de silenciamiento génico podría ser optimizado, tener un mayor alcance y potencial, resolver sus limitaciones técnicas, y dar mejores resultados si se complementa con las nuevas herramientas biotecnológicas que están teniendo un gran auge en los recientes años, tal como el CRISPR/Cas. De esta forma se podría ampliar los conocimientos sobre las interacciones implicadas en tal mecanismo, y desarrollar nuevas alternativas en el manejo de las enfermedades en plantas, animales y humanos.

LITERATURA CITADA

- Agius, C., Eamens A. L., Millar A.A., Watson J.M. and Wang M-B. 2012. *In: Watson J.M. and Wang M-B. (eds.). Antiviral Resistance in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* vol. 894. DOI 10.1007/978-1-61779-882-5_2. Springer Science+Business Media.
- Ahlquist, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science.* 296: 1270-1273.
- Allen, E. and Howell M. D. 2010. miRNAs in the biogenesis of trans-acting siRNAs in higher plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 21: 798–804.
- Andika, I.B., Maruyama K., Sun L., Kondo H., Tamada T. and Suzuki N. 2015. Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against potato virus X in leaves and roots. *Plant J.* 81:781-93. <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12770>.
- Azevedo, J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S., Braun L., Bergdoll M., Hakimi M.A., Lagrange T. and Voinnet O. 2010. Argonaute quenching and global changes in dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* 24: 904–915.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116: 281–297.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature.* 431: 356–363.
- Baumberger, N. and Baulcombe D.C. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short 724 interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11928-11933.
- Borsani, O., Zhu J., Verslues P.E., Sunkar, R. and Zhu J.K. 2005. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123: 1279–1291.
- Brosseau, M. and Fosset P. 2015. Functional and Genetic Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing. *The Plant Cell.* 27: 1742–1754.
- Canizares, M.C., Taylor K.M. and Lomonosoff G.P. 2004. Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of Cowpea mosaic virus are required for suppression of silencing. *J.Gen.Virol.* 85: 3431–3435.
- Carbonell, A. and Carrington J.C. 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology.* 27:111–117.
- Chapman, E.J., Prokhnovsky A.I., Gopinath Dolja V.V. and Carrington J.C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway a tan intermediate step. *Genes Dev.* 18: 1179–1186.
- Chellappan, P., Vanitharani R. and Fauquet C.M. 2005. MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 10381–10386.
- Chen, J., Li W.X., Xie D., Peng J.R. and Ding S.W. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but up regulates the role of micro- RNA in host gene expression. *Plant Cell.* 16: 1302–1313.
- Chen, X., Yan C.C., Zhang X., Li Z., Deng L., Zhang Y. and Dai O. 2015. RBMMMDA: predicting multiple types of disease-microRNA associations. *Sci Rep.* 5: 13877. doi: 10.1038/srep13877.

- Chen, X., Yan C.C., Zhang X., You Z-H., Deng L., Liu Y., Zhang Y. and Da Q. 2016. WBSMDA: Within and Between Score for MiRNA-Disease Association prediction. *Sci Rep.* 6: 21106. doi: 10.1038/srep21106.
- Chiba, S., Hleibieh K., Delbianco A., Klein E., Ratti C., Ziegler-Graff V., Bouzoubaa S. and Gilmer D. 2013. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and No LS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol.Plant Microbe Interact.* 26:168–181.
- Chiu, M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C. and Tsai C.H. 2010. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol. Plant Pathol.* 11: 641–649.
- Cuin, H. and Wang A. 2016. An efficient viral vector for functional genomic studies of *Prunus* fruit trees and its induced resistance to *Plum pox virus* via silencing of a host factor gene. *Plant Biotechnol J.* doi: 10.1111/pbi.12629.
- Csorba, T., Bovi A., Dalmay T. and Burgyan J. 2007. The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA-and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* 81: 11768–11780.
- Csorba T., Kontra L. and Burgyán J. 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology.* 479-480. 85–103.
- Deng, X.G., Peng X.J., Zhu F., Chen Y.J., Zhu T., Qin S.B., Xi D.H. and Lin H.H. 2014. A critical domain of sweet potato chlorotic fleck virus nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Mol.Plant Pathol.* <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12186>.
- de Souza, A. J., Januzzi M. B.M. and Moura F. F. de A. A. 2007. Gene silencing concepts, applications, and perspectives in woody plants. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*. 64: 645-656.
- Diaz-Pendon, J.A., Li F., Li W.X. and Ding S.W. 2007. Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell.* 19: 2053–2063.
- Diederichs, S. and Haber D.A. 2007. Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell.* 131:1097–1108.
- Ding, S-W. and Voinnet O. 2007. Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell.* 130: 413-426.
- Dlackic, M. 2006. DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics: Discovery note.* 22: 2711–2714. doi:10.1093/bioinformatics/btl468.
- Donaire, L., Barajas D., Martínez-García B., Martínez-Priego L., Pagán I. and Llave C. 2008. Structural and Genetic Requirements for the Biogenesis of *Tobacco Rattle Virus*-Derived Small Interfering RNAs. *Journal of virology.* 11: 5167–5177. doi:10.1128/JVI.00272-08.
- Domínguez, A., De Mendoza A.H., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P. and Peña L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports.* 19: 427- 433.
- Duan, C-G, Wang C-H and Guo H-S. 2012a. Application of RNA silencing to plant disease resistance. *Silence: A journal of RNA regulation.* 3:5. DOI: 10.1186/1758-907X-3-5.
- Duan, C.G., Fang Y.Y., Zhou B.J., Zhao J.H., Hou W.N., Zhu H., Ding S.W. and Guo H.S. 2012b. Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-

- induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell*. 24: 259–274.
- Dunoyer, P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O. and Richards K.E. 2002. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 29: 555–567.
- Dykxhoorn, D.M. and Lieberman J. 2005. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med.* 56: 401-23.
- Eamens, A., Wang M-B., Smith N.A. and Waterhouse P.M. 2008. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant Physiology*. 147: 456–468.
- Eamens, A.L., Smith N.A., Curtin S.J., Wang M.B., Waterhouse P.M. 2009. The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* .15:2219–2235.
- Eifan, S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A and Blomstrom A-L. 2013. Non-Structural Proteins of Arthropod-Borne Bunyaviruses: Roles and Functions. *Viruses*. 5: 2447-2468.
- Endres, M.W., Gregory B.D., Gao Z., Foreman A.W., Mlotshwa S., Ge X., Pruss G.J., Ecker J.R., Bowman L.H. and Vance V. 2010. Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* 6(1):e1000729. 10.1371/journal.ppat.1000729 PMID: 20084269.
- Fang, Y.-Y., Zhao J.-Z., Liu S.-W., Wang S., Duan C.-G. and Guo H.-S. 2016. CMV2b-AGO Interaction Is Required for the Suppression of RDR Dependent Antiviral Silencing in *Arabidopsis*. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01329.
- Feng, L., Duan C.G. and Guo H.S. 2013. Inhibition of in vivo Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Mol. Plant Pathol.* 14: 617–622.
- Fire, A, Xu S, Montgomery M.K, Kostas S.A, Driver S.E. and Mello C.C.1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806–811.
- Fusaro, A.F., Correa R.L., Nakasugi K., Jackson C., Kawchuk L., Vaslin M.F. and Waterhouse P.M. 2012. The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology*. 426: 178–187.
- García, S, Billecoq A, Crance JM, Prins M and Garin D. 2006. Viral suppressors of RNA interference impair RNA silencing induced by a Semliki Forest virus replicon in tick cells. *Journal of General Virology*. 87:1985–1989.
- Garcia, J.A. and Pallas V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology*. 11:21–30.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda A., Chapman E. J., Sullivan C. M., Fahlgren N., Brempelis K. J. and Carrington J. C. 2010. *Arabidopsis* RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* Infection. *The plant cell*. 22: 481–496. Doi: 10.1105/tpc.109.073056.
- Garcia-Ruiz, H., Carbonell A., Hoyer J.S., Fahlgren N., Gilbert K.B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia Ruiz M.T., McGinn M.G., Lowery N., Martinez B.M.M.T. and Carrington J.C. 2015. Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog.* 11:e1004755. doi:10.1371/journal.ppat.1004755.

- Gillet, F.X., Cattoni D.I., Petiot-Bécard S., Delalande F., Poignavent V., Brizard J. P., Bessin Y., Dorsselaer A., Declerck N., Sanglier-Cianféron S., Brugidou C. and Vignols F. 2013. The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a zinc-binding protein with redox dependent flexibility. *J. Mol. Biol.* 425:2423–2435.
- Gohara, D.W., Crotty S., Arnold J.J., Yoder J.D., Andino R., Cameron C.E. 2000. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol): structural, biochemical, and biological analysis of conserved structural motifs A and B. *J. Biol. Chem.* 275: 25523–32. doi:10.1074/jbc.M002671200
- González-Jara, P., Tenllado F., Martínez-García B., Atencio F.A., Barajas D., Vargas M., Díaz-Ruiz J. and Díaz-Ruiz J.R. 2004. Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology.* 5: 29-35.
- Gonzalez, I., Rakitina D., Semashko M., Taliansky M., Praveen S., Palukaitis P., Carr J.P., Kalinina N. and Canto T. 2012. RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA.* 18: 771–782.
- Guo, H., Song X., Xie C., Huo Y., Zhang F., Chen X., Geng Y., and Fang R. 2013. Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol.Plant_Microbe Interact.* 26: 927–936.
- Gouveia, P. and Nolasco G. 2012. The p19.7 RNA silencing suppressor from grapevine leaf roll-associated virus 3 shows different level soft activity across phylogenetic groups. *Virus Genes.* 45: 333–339.
- Gouveia, P., Dandlen S., Costa A., Marques N. and Nolasco G. 2012. Identification of an RNA silencing suppressor encoded by grape vine leaf roll-associated virus 3. *Eur. J. PlantPathol.* 133: 237–245.
- Guleria, P., Mahajan M., Bhardwaj J. and Yadav S. K. 2011. Plant Small RNAs: Biogenesis, Mode of Action and Their Roles in Abiotic Stresses. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 9: 183-199. DOI: 10.1016/S1672-0229(11)60022-3.
- Gupta, B., Saha J., Sengupta A. and Gupta K. 2013. Recent Advances on Virus Induced Gene Silencing (VIGS): Plant Functional Genomics. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology.* 1:e116. doi: 10.4172/2329-9029.1000e116.
- Hamera, S., Song X., Su L., Chen X. and Fang R. 2012. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 69: 104–115.
- Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579: 5822–5829.
- Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters.* 579: 5822–5829.
- Hansen, J.L., Long A.M. and Schultz S.C. 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure.* 5: 1109–22. doi:10.1016/S0969-2126(97)00261-X. PMID 9309225.
- Havelda, Z., Hornyik C., Valoczi A. and Burgyan J. 2005. Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *J. Virol.* 79: 450–457.
- Hedil, M., Sterken M. G., de Ronde D., Lohuis D. and Komerlink R. 2015. Analysis of Tosopovirus NSs Proteins in Suppression of Systemic Silencing. *PLoS ONE.* 10: e0134517. doi:10.1371/journal.pone.0134517

- Hemmes, H., Lakatos L., Goldbach R., Burgyan J. and Prins M. 2007. The NS3 protein of rice hoja blanca Tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA*. 13: 1079–1089.
- Hendelman, A., Kravchik M., Stav R., Zik M., Lugassi N. and Arazi T. 2013. The developmental out comes of P0-mediated ARGONAUTE destabilization in tomato. *Planta*. 237: 363–377.
- Herr, A.J., Jensen M.B., Dalmay T. and Baulcombe D.C. 2005. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science*. 308:118–120. doi: 10.1126/science.1106910.
- Howard, K.A., Rahbek U.L., Liu X., Damgaard C.K., Glud Z. S., Andersen M.O., Hovgaard M.B., Schmitz A., Nyengaard J.R., Besenbacher F. and Kjems J. 2006. RNA Interference *in Vitro* and *in Vivo* Using a Chitosan/siRNA Nanoparticle System. *Molecular Therapy*. 14: 476–484. doi: 10.1016/j.yymthe.2006.04.010.
- Howell, M.D., Fahlgren N., Chapman E.J., Cumbie J.S., Sullivan C.M., Givan S.A., Kasschau K.D. and Carrington J.C. 2007. Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and ta-siRNA-directed targeting. *Plant Cell*. 19: 926–942.
- Huang, J., Yang M. and Zhang X. 2016. The function of small RNAs in plant biotic stress response. *J Integr Plant Biol*. 58: 312–327. doi: 10.1111/jipb.12463.
- Hull, R. 2014. Plant Viruses and Technology. Chapter 15. In: *Plant Virology*. Fifth Edition. Academic Press. Pp. 902. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00015-7>.
- Hutvagner, G. and Simard M. J. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9: 22–32. doi:10.1038/nrm2321.
- Jin, H. and Zhu J.K. 2010. A viral suppressor protein inhibit shost RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes Dev*. 24: 853–856.
- Karran, R.A. and Sanfacon H. 2014. Tomato ring spot virus coat protein binds to ARGONAUTE1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol. Plant_Microbe Interact*. 27: 933–943.
- Kasschau, K.D., Xie Z., Allen E., Llave C., Chapman E.J., Krizan K.A. and Carrington J.C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev. Cell*. 4: 205– 217.
- Kataya, A.R., Suliman M.N., Kalantidis K. and Livieratos I.C. 2009. Cucurbit yellow stunting disorder virus p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Res*.145:48–53.
- Kolev, N. G., Tschudi, C., and Ullu, E. 2011. RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. *Eukaryotic Cell*. 10: 1156–1163. <http://doi.org/10.1128/EC.05114-11>.
- Koukiekoloa, R., Sagana S.M. and Pezacki J.P. 2007. Effects of pH and salt concentration on the siRNA binding activity of the RNA silencing suppress or protein p19. *FEBS Lett*. 581: 3051–3056.
- Kumagai, M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K. and Grill L. K. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 1679–1683.
- Kurihara, Y., Takashi Y. and Watanabe Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*. 12:206–212

- Kurzynska-Kokorniak, A., Koralewska N., Pokornowska M., Urbanowicz A., Tworak A., Mickiewicz A. and Figlerowicz M. 2015. The many faces of Dicer: the complexity of the mechanisms regulating Dicer gene expression and enzyme activities. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkv328.
- Lacombe, S., Bangratz M., Vignols F. and Brugidou C. 2010. The rice yellow mottle virus P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 61: 371–382.
- Lacomme, C. 2015. Strategies for Altering Plant Traits Using Virus-Induced Gene Silencing Technologies. *In: Kirankumar S. Mysore and Muthappa Senthil-Kumar (eds.). Plant Gene Silencing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* DOI 10.1007/978-1-4939-2453-0_2.
- Lakatos, L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E.J., Carrington J.C., Liu Y.P., Dolja V. V., Calvino L.F., Lopez-Moya J.J. and Burgyan J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25: 2768–2780.
- Lange, M., Yellina A.L., Orashakova S. and Becker A. 2013. Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) in Plants: An Overview of Target Species and the Virus-Derived Vector System. *In: Annette Becker (ed.). Virus-Induced Gene Silencing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* DOI 10.1007/978-1-62703-278-0_1.
- Li, Y., Kong L., Cheng B. and Li K. 2005a. Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus. *Avian Dis.* 49: 562-73. doi:10.1637/7365-041205R2.1
- Li, J., Yang Z., Yu B., Liu J. and Chen X. 2005b. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15: 1501–1507.
- Lindbo, J.A. 2012. A Historical Overview of RNAi in Plants. *In: Watson, J.M. and Wang M-B. (eds.). Antiviral Resistance in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* vol. 894. DOI 10.1007/978-1-61779-882-5_1. Springer Science+Business Media.
- Lindbo, J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M. and Dougherty W.G. 1993. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell.* 5:1749-1759.
- Liu, Y., Jin W., Wang L. and Wang X. 2014. Replication-associated protein seconded by wheat dwarf virus actas RNA silencing suppressors. *Virus Res.* 190: 34–39.
- Lozsa, R., Csorba T., Lakatos L. and Burgyan J. 2008. Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppress or proteins. *Nucleic Acids Res.* 36: 4099–4107.
- Ma, E., Zhou K., Kidwell M.A. and Doudna J.A. 2012. Coordinated activities of human dicer domains in regulatory RNA processing. *J. Mol. Biol.* 422:466–476.
- Ma, X., Nicole M.-C., Meteignier L.-V., Hong N., Wang G. and Moffet P. 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of Experimental Botany.* 3: 919–932.
- Macrae, I.J., Li F., Zhou K., Cande W.Z. and Doudna J.A. 2006a. Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 73–80.
- Macrae, I.J., Zhou K., Li F., Repic A., Brooks A.N., Cande W.Z., Adams P.D. and Doudna J.A. 2006b. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*, 311, 195–198.

- Mallory, A. C., Ely L., Smith T.H., Marathe R., Anandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L. and Vance V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell* 13: 571–583.
- Mallory, A. and Vaucheret H. 2010. Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*. 22: 3879–3889.
- Makeyev, E.V. and Bamford D.H. Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes. *Mol Cell*. 2002;10:1417–1427.
- Martinez de Alba, A.E., Elvira-Matelot E. and Vaucheret H. 2013. Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1829: 1300–1308.
- Martínez-Priego, L., Donaire L., Barajas D. and Llave C. 2008. Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology*. 376: 346–356.
- Merai, Z., Kerenyi Z., Molnar A., Barta E., Valoczi A., Bisztray G., Havelda Z., Burgyan J. and Silhavy D. 2005. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol*. 79: 7217–7226.
- Merai, Z., Kerenyi Z., Kertesz S., Magna M., Lakatos L. and Silhavy D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol*. 80: 5747–5756.
- Meyers, B.C., Green P.J. and Lu C. 2008. miRNAs in the plant genome: all things great and small. *Genome Dyn* 4:108–118.
- Milhavet, O., Gary D.S. and Mattson M.P. 2003. RNA Interference in Biology and Medicine. *Pharmacol Rev*. 55:629–648.
- Montgomery, T.A., Howell M.D., Cuperus J.T., Li D., Hansen J.E., Alexander A.L., Chapman E.J., Fahlgren N., Allen E., Carrington J.C. 2008. Specificity of argonaute7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell*. 133:128–141.
- Napoli, C., Lemieux C. and Jorgensen R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279-289.
- Nemes, K., Gellert A., Balazs E. and Salanki K. 2014. Alanine scanning of cucumber mosaic virus (CMV) 2b protein identifies different positions for cell-to-cell movement and gene silencing suppressor activity. *PLoS One*. 9: e11209.
- Ng, K. K.-S., Arnold J. J. and Cameron C. E. 2008. Structure-Function Relationships Among RNA-Dependent RNA Polymerases. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 320: 137–156.
- Nielsen, T.T. and Nielsen J.E. 2013. Antisense Gene Silencing: Therapy for Neurodegenerative Disorders?. *Genes*. 4: 457-484. doi:10.3390/genes4030457.
- Nowara, D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D., Hensel G., Kumlehn J. and Schweizer P. 2010. HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell*. 22:3130–3141.
- Oliver, C., Santos J.L. and Pradillo M. 2014. On the role of some ARGONAUTE proteins in meiosis and DNA repair in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00177.

- Okano, Y., Senshu H., Hashimoto M., Neriya Y., Netsu O., Minato N., Yoshida T., Maejima, K., Oshima K., Komatsu K., Yamaji Y. and Namba S. 2014. In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell*. 26: 2168–2183.
- Omarov, R., Sparks K., Smith L., Zindovic J. and Scholthof H.B. 2006. Biological relevance of as table biochemical interaction between the Tombusvirus- encoded P19 and short interfering RNAs. *J. Virol*. 80: 3000–3008.
- Parent- J-S., Bouteiller N., Elmayan E. and Vaucheret H. 2015. Respective contributions of *Arabidopsis* DCL2 and DCL4 to RNA silencing. *The Plant Journal*. 81: 223–232. doi: 10.1111/tpj.12720.
- Park, M.Y., Wu G., Gonzalez-Sulser A., Vaucheret H., Poethig R.S. 2005. Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:3691–3696
- Parker J.S. and Barford D. 2006. Argonaute: a Scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci*. 31:622–630.
- Pumplin, N. and Voinnet O. 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 745–760. doi:10.1038/nrmicro3120.
- Purkayastha, A. and Dasgupta I. 2009. Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47: 967–976.
- Qu, F., Ye X. and Morris T.J. 2005. *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *PNAS*. 38: 14732–14737.
- Raja, P., Sanville B.C., Buchmann R.C. and Bisaro D.M. 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J. Virol*. 82: 8997–9007.
- Raja, P., Jackel J.N., Li S., Heard I.M. and Bisaro D.M. 2014. *Arabidopsis* double- stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J. Virol*. 88: 2611–2622.
- Rajeevkumar, S, Anunanthini P. and Sathishkumar R. 2015. Epigenetic silencing in transgenic plants. *Front. Plant Sci*. 6:693. doi: 10.3389/fpls.2015.00693.
- Reed, J.C., Kasschau K.D., Prokhnovsky A.I., Gopinath K., Pogue G.P., Carrington J. C. and Dolja V.V. 2003. Suppressor of RNA silencing encoded by beet yellows virus. *Virology*. 15: 203–209.
- Ren G., Chen X. and Yu B. 2012. Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR 1 in *Arabidopsis*. *Current Biology*. 22:695-700.
- Renovell, A., Vives M.C., Ruiz-Ruiz S., Navarro L., Moreno P. and Guerri J. 2012. The citrus leaf blotch virus movement protein acts as silencing suppressor. *Virus Genes*. 44: 131–140.
- Rodriguez, A., Angel C.A., Lutz L., Leisner S.M., Nelson R.S., Schoelz J.E. 2014. Association of the P6 protein of cauliflower mosaic virus with plasmodesmata and plasmodesmal proteins. *Plant Physiol*. 166:1345–1358.
- Romano, N. and Macino G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*. 6: 3343-3353.
- Ruiz-Ferrer, V. and Voinnet O. 2009. Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *Annual Review of Plant Biology*. 60:485–510.

- Sahana, N., Kaur H., Jain R.K., Palukaitis P., Canto T. and Praveen S. 2014. The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *J. Gen.Virol.* 95: 1167–117.
- Salomon, W., Bullock K., Lapierre J., Pavco P., Woolf T. and Kamens J. 2010. Modified dsRNAs that are not processed by Dicer maintain potency and are incorporated into the RISC. *Nucleic Acids Res.* 38: 3771-3779.
- Schnettler, E, Hemmes H, Huismann R, Goldbach R, Prins P and Kormelink R. 2010. Diverging Affinity of Tospovirus RNA Silencing Suppressor Proteins, NSs, for Various RNA Duplex Molecules. *Journal of Virology.* 84: 11542–11554.
- Scorza, R., Callahn A., Levy L., Damsteegt V., Webb K. and Ravelonandro M. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Research.* 10: 201-209.
- Senshu, H., Yamaji Y., Minato N., Shiraishi T., Maejima K., Hashimoto M., Miura C., Neriya Y. and Namba S. 2011. A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potatovirus. *M. J. Virol.* 85: 10269–10278.
- Shah, S.M., Saini N., Ashraf S. and Kumar G.R. 2012. Gene Silencing, Mechanism and Applications. *DHR International Journal Of Biomedical and Life Sciences.* 3: 2278-8301.
- Shen, M., Xu Y., Jia R., Zhou X. and Ye K. 2010. Size-independent and non cooperative recognition of dsRNA by the rice tripe virus RNA silencing suppressor NS3. *J. Mol. Biol.* 404: 665–679.
- Shimura, H. and Pantaleo V. 2011. Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1809: 601–612.
- Shivaprasad, P.V., Rajeswaran R., Blevins T., Schoelz J., Meins F., Hohn T. and Pooggin M.M. 2008. The CaMV trans activator/viroplasm interferes with RDR6-dependent trans-acting and secondary siRNA pathways in Arabidopsis. *Nucleic acid Res.* 36:5896–5909.
- Soifer, H.S., Sano M., Sakurai S., Chomchan K., Saetrom P., Sherman M.A., Collingwood M.A., Behlke M.A. and Rossi J.J. 2008. A role for the Dicer helicase domain in the processing of thermodynamically unstable hairpin RNAs. *Nucleic Acids Research.* 36, No. 20 6511–6522.
- Szabo, E.Z., Manczinger M., Goblos A., Kemeny L. and Lakatos L. 2012. Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to aviral protein. *J. Virol.* 86: 8324–8327.
- Takeda, A., Tsukuda M., Mizumoto H., Okamoto K., Kaido M., Mise K. and Okuno T. 2005. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO.* 24: 3147–3157.
- Tatineni, S., Qu F., Li R., Morris T.J. and French R. 2012. Triticum mosaic poacevirus enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology.* 433: 104–115.
- Te, J., Melcher U., Howard A. and Verchot-Lubicz J. 2005. Soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virol. J.* 2:18.
- Ukomadu, C. and Dutta A. 2003. Inhibition of cdk2 activating phosphorylation by mevastatin. *J Biol Chem.* 278:4840–4846.
- Unver, T. and Budak H. 2009. Virus-Induced Gene Silencing, a Post Transcriptional Gene Silencing Method. *International Journal of Plant Genomics.* doi:10.1155/2009/198680.

- van Kammen, A. 1997. Virus-induced gene silencing in infected and transgenic plants. *Trends in Plant Science*. 2: 409–411.
- Várallyay, E. and Havelda Z. 2013. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol. Plant Pathol.* 14: 567–575.
- Vaucheret, H. and Fagard M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *TRENDS in genetics*. 17: 29-35.
- Voinnet, O., Pinto Y.M. and Baulcombe D.C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:14147–14152.
- Voinnet, O. 2005. Induction and Suppression of RNA Silencing: Insights from viral infections. *Nature*. 6: 206-221.
- Waterhouse, P.M. and Helliwell C.A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews Genetics*. 4: 29-38.
- Wang, X-B., Wu Q., Ito T., Cillo F., Li W.-X., Chen X., Yu J.-L. and Ding S.-W. 2010. RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*. 107: 484-489. doi/10.1073/pnas.0904086107.
- Wang, Y., Dang M., Hou H., Mei Y., Qian Y. and Zhou X. 2014. Identification of an RNA silencing suppressor encoded by a mastrevirus. *J.Gen.Virol.* 95: 2082–2088.
- Weinheimer, I., Boonrod K., Moser M., Zwiebel M., Füllgrabe M., Krczal G. and Wassenegger M. 2010. Analysis of an auto proteolytic activity of rice yellow mottle virus silencing suppressor P1. *Biol.Chem.* 391: 271–281.
- Wierzbicki, A.T., Ream T., Haag J. R. and Pikaard C.S. 2009. RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat Genet.* 41: 630–634. doi:10.1038/ng.365.
- Wieczorek, P. and Obrępańska-Stepłowska A. 2015. Suppress to Survive—Implication of Plant Viruses in PTGS. *Plant Mol Biol Rep.* 33:335–346. DOI 10.1007/s11105-014-0755-8.
- Willmann, M.R., Endres M. W., Cook R.T. and Gregory B. D. 2011. The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0146.
- Wu, J., Du Z., Wang C., Cai L., Hu M., Lin Q., Wu Z., Li Y. and Xie L. 2010. Identification of Pns6, a putative movement protein of RRSV, as a silencing suppressor. *Virology*. 7: 335.
- Wu, L., Mao L. and Qi Y. 2012. Roles of DICER-LIKE and ARGONAUTE Proteins in TAS-Derived Small Interfering RNA-Triggered DNA Methylation. *Plant Physiology*. 160: 990–999.
- Yaegashi, H., Takahashi T., Isogai M., Kobori T., Ohki S. and Yoshikawa N. 2007. Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J.Gen.Virol.* 88: 316–324.
- Yaegashi, H., Tamura A., Isogai M. and Yoshikawa N. 2008. Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by apple chlorotic leaf spot virus 50kDa movement protein. *Virology*. 382:199–206.
- Yelina, N.E., Savenkov E.I., Solovyev A.G., Morozov S.Y. and Valkonen J.P.T. 2002. Long-distance movement, virulence, and ARN silencing suppression controlled by a single protein in Hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *J. Virol.* 76: 12981–12991.

- YingBo, M., Xue X. and Chen C. 2009. Are small RNAs a big help to plants?. *Sci China Ser C-Life Sci.* 52: 212-223.
- Yuan, C., Wang J., Harrison A.P., Meng X., Chen D. and Cheng M. 2015. Genome-wide view of natural antisense transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research.* 22:233–243. doi: 10.1093/dnares/dsv008.
- Young, B.A., Stenger D.C., Qu F., Morris T.J., Tatineni S. and French R. 2012. Tritimovirus P1 functions as a suppressor of RNA silencing and an enhancer of disease symptoms. *Virus Res.* 163: 672–677.
- Yu, B., Yang Z., Li J., Minakhina S., Yang M., Padgett R.W., Steward R. and Chen X. 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science.* 307: 932–935.
- Yu, B., Chapman E.J., Yang Z., Carrington J.C. and Chen X. 2006. Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with micro RNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 580: 3117–3120.
- Yu, L., Meng Y., Shao C. and Kahrizi D. 2015. Are ta-siRNAs only originated from the cleavage site of miRNA on its target RNAs and phased in 21-nt increments?. *Gene.* 569: 127–135.
- Xie Z., Johansen L.K., Gustafson A.M., Kasschau K.D., Lellis A.D., Zilberman D., Jacobsen S.E. and Carrington J.C. 2004. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol.* 2:E104. doi: 10.1371/journal.pbio.0020104.
- Xie, M. and Yu B. 2015. siRNA-directed DNA Methylation in Plants. *Current Genomics.* 16: 23-31.
- Xie, M., Zhang S. and Yu B. 2015. microRNA biogenesis, degradation and activity in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:87–99. DOI 10.1007/s00018-014-1728-7
- Zhang, B., Pan X., Cobb G.P. and Anderson T. A. 2006. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental Biology.* 289: 3 – 16.
- Zhang, C., Zujian W., Li Y. and Jinguo W. 2015. Biogenesis, Function, and Applications of Virus-Derived Small RNAs in Plants. *Frontiers in Microbiology.* doi: 10.3389/fmicb.2015.01237.
- Zhang, X., Zhang X., Singh J., Li D. and Qu F. 2012. Temperature-dependent survival of turnip crinkle virus-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing- based defense that requires dcl2, AGO2, and HEN1. *J. Virol.* 86:6847–6854.
- Zhang, X., Niu D., Carbonell A., Wang A., Lee A., Tun V., Wang Z., Carrington J. C., Chang C.-en A. and Jin H. 2014. ARGONAUTE PIWI domain and microRNA duplex structure regulate small RNA sorting in *Arabidopsis*. *Nature communications.* 5:5468. DOI: 10.1038/ncomms6468.
- Zhang, X., Zhu Y., Wu H. and Guo H. 2016a. Post-transcriptional gene silencing in plants: a double-edged sword. *Sci China Life Sci.* 59: 271–276. doi: 10.1007/s11427-015-4972-7.
- Zhang, Z., Liu X., Wang X.J. and Zhang X. 2016b. *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nat Plants.* 2:16049. doi: 10.1038/nplants.2016.49.
- Zhou, Y., Honda M., Zhu H., Zhang Z., Guo X., Li T., Li Z., Peng X., Nakajima K., Duan L. and Zhang Z. 2015. Spatiotemporal Sequestration of miR165/166 by *Arabidopsis* Argonaute10 Promotes Shoot Apical Meristem Maintenance. *Cell Reports.* 10: 1819–1827.

Zhou, Z., Dell'Orco M., Saldarelli P., Turturo C., Minafra A. and Martelli. G.P. 2006. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. *J.Gen.Virol.* 87: 2387–2395.

CHAPTER 3. ANTIVIRAL RNA SILENCING SUPPRESSION ACTIVITY OF *Tomato spotted wilt virus* NSS PROTEIN

T. Ocampo Ocampo^{1,2*}, S.M. Gabriel Peralta^{1*}, N. Bacheller¹, S. Uiterwaal¹, A. Knapp¹, A. Hennen^{1,3}, D.L. Ochoa-Martinez² and H. Garcia-Ruiz¹

¹Department of Plant Pathology and Nebraska Center for Virology,
University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA

²Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

³Iowa State University, Ames, IA, USA

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: H. Garcia-Ruiz

E-mail: hgarciaaruiz2@unl.edu

Genet. Mol. Res. 15 (2): gmr.15028625

Received March 21, 2016

Accepted April 25, 2016

Published June 17, 2016

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15028625>

ABSTRACT.

In addition to regulating gene expression, RNA silencing is an essential antiviral defense system in plants. Triggered by double-stranded RNA, silencing results in degradation or translational repression of target transcripts. Viruses are inducers and targets of RNA silencing. To condition susceptibility, most plant viruses encode silencing suppressors that interfere with this process, such as the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) NSs protein. The mechanism by which NSs suppresses RNA silencing and its role in viral infection and movement remain to be determined. We cloned NSs from the Hawaii isolate of TSWV and using two independent assays show for the first time that this protein restored pathogenicity and supported the formation of local infection foci by suppressor-deficient *Turnip mosaic virus* and *Turnip crinkle virus*. Demonstrating the suppression of RNA silencing directed against heterologous viruses establishes the foundation to determine the means used by NSs to block this antiviral process.

Key words: TSWV; NSs protein; Antiviral RNA silencing

INTRODUCTION

Tomato spotted wilt virus (TSWV) has a worldwide distribution and a host range that includes more than 1300 plant species (Parrella *et al.*, 2003). In 2011, TSWV was ranked the second most important virus in molecular plant pathology (Scholthof *et al.*, 2011). TSWV infection in plants causes a reduction in both yield and quality of fruit and vegetables, and induces developmental defects in ornamental species (Pappu *et al.*,

2009). Among the most economically important plants susceptible to this virus are tomato (*Solanum lycopersicum*), lettuce (*Lactuca sativa*), pepper (*Capsicum annuum*), potato (*S. tuberosum*), onion (*Allium cepa*), peanut (*Arachis hypogaea*), tomatillo (*Physalis ixocarpa* Brot.), and chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) (de la Torre-Almaráz *et al.*, 2002; Parrella *et al.*, 2003; Scholthof *et al.*, 2011).

TSWV belongs to the genus *Tospovirus* in the family *Bunyaviridae* (Parrella *et al.*, 2003). TSWV virions are 80-120 nm in diameter, contain several copies of RNA-dependent RNA polymerase, and are surrounded by an envelope formed of host-derived lipids and viral glycoproteins (Parrella *et al.*, 2003). The TSWV genome consists of three negative-sense, single-strand RNAs designated large (L), medium (M), and small (S); Figure 1A; (Parrella *et al.*, 2003; Margaria and Rosa, 2015). RNA L (8.8 kb) encodes the RNA-dependent RNA polymerase (331.5 kDa) responsible for TSWV RNA replication and transcription (Margaria and Rosa, 2015). RNA M (4.8 kb) harbors the open reading frame of membrane glycoprotein Gc/Gn (127.4 kDa), which is cleaved by a host protease to form the Gc and Gn proteins that make up part of the virion envelope (Parrella *et al.*, 2003). In addition, RNA M is the template for a sub-genomic RNA encoding protein NSm (33.6 kDa), involved in virus cell- to-cell movement (Parrella *et al.*, 2003). RNA S (2.9 kb) encodes the nucleocapsid protein N (29 kDa), which associates with genomic RNAs to form ribonucleoprotein complexes that are packaged into virions (Parrella *et al.*, 2003). RNA S also serves as a template for a further sub- genomic RNA responsible for the production of the multifunctional protein NSs (52.4 kDa) (Parrella *et al.*, 2003).

RNA silencing regulates gene expression in eukaryotes, including plants and insects (Ding and Voinnet, 2007), in which also functions as an inducible, potent, highly specific, and adaptable antiviral defense system (Ding and Voinnet, 2007; García and Pallás, 2015). Most plant and insect viruses encode silencing suppressor proteins that inactivate RNA silencing to condition susceptibility and favor virus replication and spread (Powers *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010). In tospoviruses, protein NSs is an RNA silencing suppressor (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Hedil *et al.*, 2015) necessary for the establishment and maintenance of systemic infection in plants (Margaria *et al.*, 2014) and for persistent infection and transmission by flower thrips

(*Frankliniella occidentalis*) (Whitfield *et al.*, 2005; Margaria *et al.*, 2014). TSWV NSs is also an avirulence determinant that triggers a hypersensitive response in resistant plants (de Ronde *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014).

Variation in pathogenicity of this virus has been observed in pepper, tomatillo, and chrysanthemum (de la Torre-Almaráz *et al.*, 2002), and in the former, such differences have been found to be due to NSs mutations (de Ronde *et al.*, 2013). The mechanism by which tospoviral NSs inhibits RNA silencing, and its role in virus infection remain to be determined. In this paper, we show for the first time that TSWV NSs suppresses antiviral RNA silencing and restores the pathogenicity of two heterologous viruses: suppressor-deficient *Turnip mosaic virus* (TuMV) and *Turnip crinkle virus* (TCV).

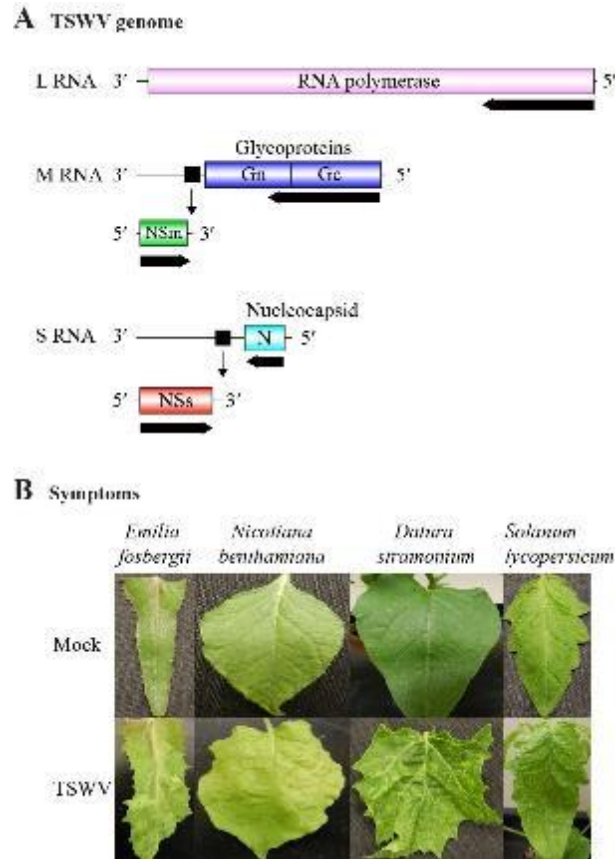


Figure 1. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome organization and systemic symptoms. **A.** Schematic representation of the TSWV genome. Colored cylinders indicate open reading frames. Lines indicate 3' and 5' untranslated regions and intergenic regions. Black squares indicate transcription termination hairpins. Black arrows indicate directions of translation.

Sub-genomic transcripts are transcribed from M and S RNAs. **B.** Representative TSWV-induced systemic symptoms in selected hosts at 21 days post inoculation.

MATERIAL AND METHODS

TSWV mechanical inoculation

The Hawaii isolate of TSWV was transmitted by thrips (*F. occidentalis*) to *Emilia fosbergii* for maintenance and mechanically to other hosts for experiments. Using a mortar and pestle, inoculum was prepared by grinding 1 g systemically infected fresh leaves in 10 mL TSWV inoculation buffer (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0) (Mandal *et al.*, 2008), into which 10 mM sodium sulfite, 10 mM β -mercaptoethanol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) had been added before use. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 10 min at 4°C, and the supernatant transferred to a new tube and kept on ice. *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamiana*, and *S. lycopersicum* leaves were dusted with carborundum and rub-inoculated with 50 μ L inoculum per leaf. Eighteen plants of each species were inoculated when they were 25-30 days old. In parallel, control plants were mock-inoculated with buffer. Plants were kept in a growth chamber at 22°C under a 16:8 h light: dark cycle. Systemically infected *N. benthamiana*, *D. stramonium*, and *S. lycopersicum* leaves (Figure 1B) were collected at 15, 20, and 25 days post inoculation (dpi), respectively. Leaf samples were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

TSWV virion purification and RNA extraction

Two protocols (Lane, 1986; de Avila *et al.*, 1990) were combined to purify TSWV virions. Frozen leaves (20 g) were ground with an electric blender in 100 mL cold TSWV inoculation buffer containing 10 mM sodium sulfite, 10 mM β -mercaptoethanol, and 1 mM PMSF. Extracts were filtered through four layers of cheese cloth and debris removed by spinning at 7700 g for 10 min. Aliquots of 50 and 800 μ L were collected for total protein and total RNA extraction, respectively. The solution obtained was centrifuged at 50,000 g for 30 min and the supernatant discarded. The resulting pellet was re-suspended in 22.5 mL cold 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.5, before adding Triton X-100 to a final concentration of 2%, and mixing with a stir bar for 10 min at 4°C. After low-speed

centrifugation (7700 *g* for 10 min), the supernatant was transferred to a new tube. Virions were then concentrated by centrifugation (35,000 rpm for 2 h in an L7-55 ultracentrifuge with a 50.2 Ti rotor, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) through a 5-mL cushion of 20% sucrose in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5.5. The supernatant was discarded and virions were recovered by re-suspending the pellet in 800 μ L suspension buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM ethylene diamine tetra acetic acid, and 100 mM NaCl). Fifty microliters were taken for protein extraction, while the rest was used for virion RNA isolation. Total and virion protein samples were mixed with 50 μ L 2X protein dissociation buffer containing bromophenol blue, and incubated at 100°C for 3 min, before being stored at -80°C until used for immunoblotting. Virion purification efficiency was determined by a dilution curve of total and virion proteins, and protein N abundance was estimated with respect to a two-fold dilution of the total protein sample.

Total and virion RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and concentration was measured with a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Samples containing 1 mg RNA were run on a 1% agarose gel.

Western blotting

Protein samples were analyzed by western blotting. A Bradford assay revealed protein concentrations of 0.1-0.8 and 1.5-2 μ g/ μ L for the total and virion extracts, respectively. Equal sample volumes (5 μ L) were loaded on a 12% polyacrylamide gel and proteins were separated by electrophoresis at 150 V for 60 min. After being transferred to a membrane, proteins were stained with Ponceau S solution (Sigma, St. Louis, MO, USA). Protein N was detected using a primary antibody (1:64,000; Law and Moyer, 1990), and a goat anti-rabbit immunoglobulin G secondary antibody (1:10,000; NA934-1; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Chemiluminescence was detected with Clarity Western ECL Substrate and a ChemiDoc MP Imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

TSWV NSs cloning

Virion RNA from *N. benthamiana* was used to clone two versions of NSs, containing or lacking the 5' untranslated region (UTR). Using Geneious 8.1.5 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), oligonucleotides were designed based on the consensus sequence

of all S segments available on GenBank. First-strand complementary DNA (cDNA) was generated with SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Virion RNA (4 µg) was treated with 2 U DNase (Ambion TURBO DNA-*free*; AM1907; Thermo Fisher Scientific), and reverse transcription (RT) was carried out at 50°C for 50 min using tospovirus universal primer TOS-R15 (5'-GGGAGAGCAATYGWGKYR-3') (Uga and Tsuda, 2005). Polymerase chain reaction (PCR) using TSWV-S14 (5'-CACCATGGAGAGCAATTGTGTC-3' or TSWV_NSs (5'-CACCATGGATGTCTTCAAGTGTTTATG-3' amplified first-strand cDNA as the forward primer and Stop_TSWV_NSs (5'-ggccgctctAGATCATTTTGATCCTG-3') as the reverse primer. TSWV-S14 and TSWV_NSs, which add a topoisomerase recognition site, were used to generate a NSs clone that included or lacked the 5' UTR, respectively. For cloning purposes, an NcoI site was formed by adding four base pairs (ATGG). Primer Stop_TSWV_NSs adds an *Xba*I site (lower case) after the stop codon in the NSs sequence.

The 50-µL PCR mix contained 2 µL cDNA, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoxynucleotides, 0.5 µM primers, 1X reaction buffer, and 1 µL PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (600672; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Thermocycler conditions were as follows: initial denaturing at 95°C for 2 min, followed by 32 amplification cycles of denaturing at 95°C for 20 s, annealing at 53°C for 20 s, and extension at 72°C for 2 min, before a final extension at 72°C for 5 min.

Using a TOPO cloning kit (45-0218; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), RT-PCR products were inserted into pENTR plasmids, and clones were identified by *Eco*RI/*Pvu*I double digestion. One pENTR-NSs clone and one pENTR-5' UTR-NSs clone were then transferred to pMDC32 vectors using Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (11791-020; Life Technologies). pMDC32 clones were identified by *Eco*RI digestion. For each of the two NSs constructs, four independent clones were sequenced and their consensus sequence aligned to that of all 61 TSWV segment S sequences available on GenBank.

***Agrobacterium* transformation and agroinfiltration**

By electroporation, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 was transformed with plasmids encoding NSs (pMDC32-5' UTR-NSs or pMDC32-NSs), tombusviral P19

(pCB302-P19), beta-glucuronidase (pMDC32-GUS) (Johansen and Carrington, 2001; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010), or a single-stranded green fluorescent protein (ssGFP) reporter (pPZP-35S-GFP; Tatineni *et al.*,⁶⁰⁰ 2012). Cells were cultured on Luria broth (LB) plates containing rifampicin and kanamycin (for pCB and pMDC32 plasmids) or spectinomycin (for the pPZP plasmid) at 28°C for 48 h. Cells from a single colony were used to inoculate 1 mL LB medium containing the corresponding antibiotic(s), which was then incubated for 20 h at 28°C with shaking.

Using 10 or 20 mL *vir* induction medium, consisting of 1X LB, 100 mg/mL rifampicin, 125 mg/mL² kanamycin or spectinomycin, 10 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid hydrate (MES), pH 5.2, and 100 µM acetosyringone, cultures were diluted to an optical density at 600nm (OD₆₀₀) of 0.0025 and incubated for 16 h at 28°C with shaking. Cells were pelleted by centrifugation at 6000 rpm for 10 min, re-suspended in an equal volume of infiltration solution, comprising 10 mM MgCl, 10 mM MES, pH 5.2, and 150 µM acetosyringone, and incubated in the dark at room temperature for 2 h before being used to infiltrate *N. benthamiana* leaves. Plants were at the five-to-six-leaf stage, and leaves three and four were infiltrated. Plants were kept in a growth chamber at 27°C under a 16:8-h light: dark cycle. Experiments were repeated two or three times.

Using the same protocol, *Agrobacterium tumefaciens* cells were transformed with infectious clones of suppressor-deficient *Turnip mosaic virus* tagged with GFP (TuMV-AS9-GFP) (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010) or GFP-labeled *Turnip crinkle virus* (TCV-GFP) (Powers *et al.*, 2008).

TuMV-AS9-GFP virion enrichment

TuMV-AS9-GFP was propagated by co-infiltrating *N. benthamiana* leaves with plasmids carrying TuMV-AS9-GFP (OD₆₀₀= 0.25) and P19 (OD₆₀₀= 0.5), as previously described (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Five days later, virions were enriched from 200 g infiltrated leaves by polyethylene glycol precipitation (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Enriched virions were stored at -20°C in 40% glycerol and titrated in *Arabidopsis thaliana dcl2-1 dcl3-1 dcl4-2* triple-mutant plants (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010).

Transgene silencing

A standard assay based on the *N. benthamiana* 16c line, which expresses a GFP transgene (Johansen and Carrington, 2001), was used to measure transgene silencing suppression by NSs. Virus-induced gene silencing (Benedito *et al.*, 2004) results when a fragment of viral RNA, in this case a GFP tag, exhibits sequence homology with a host gene, such as that encoding GFP in *N. benthamiana* 16c plants. *Agrobacterium tumefaciens* cells carrying an ssGFP construct (OD₆₀₀= 0.125) were infiltrated alone or in combination with NSs (OD₆₀₀= 0.5), while GUS and P19 were used as negative and positive controls, respectively. Eight plants were infiltrated per treatment, and the experiment was repeated twice. Induction of local and systemic transgene silencing was measured using photographs of infiltrated and non-infiltrated leaves taken under ultraviolet (UV) light.

GFP fluorescence and silencing index

GFP fluorescence intensity was determined from photographs taken under UV light using the green channel in ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of health, USA). Systemic silencing in transgenic *N. benthamiana* 16c plants was measured as the ratio of red to green light using the corresponding ImageJ channels. Green and red background levels were estimated using leaves from wild-type plants and those of untreated 16c plants, respectively. The former leaves were also used to estimate a wild-type red intensity value. The green signal from wild-type plants was divided by that from 16c plants, and the resulting value subtracted from 1. To estimate the change from GFP to red fluorescence (silenced) in 16c plants, a silencing index was estimated by subtracting the green from the red value dividing the result by the wild-type red intensity.

Antiviral RNA silencing assays

Suppressor-deficient TCV-GFP (Powers *et al.*, 2008) and TuMV-AS9-GFP (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010) do not infect *N. benthamiana* and were used to measure antiviral RNA silencing by two complementary approaches: co-infiltration and infiltration followed by mechanical inoculation (Powers *et al.*, 2008). TCV-GFP lacks the coat protein, which is a silencing suppressor (Powers *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008), while TuMV-AS9-GFP harbors

an inactivating mutation in the silencing suppressor HC-Pro (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Six plants were infiltrated per treatment, and experiments were repeated twice.

In co-infiltration assays, TCV-GFP or TuMV-AS9-GFP was infiltrated ($OD_{600}=0.0005$) alone or in combination with NSs ($OD_{600}=0.5$). GUS and P19 were used as negative and positive controls, respectively. Six days after infiltration, suppression of antiviral RNA silencing was measured by counting the number of local infection foci per leaf under UV light. TuMV-AS9-GFP coat protein levels in infiltrated leaves were measured by immunoblotting. To assess the accumulation of TuMV-derived small RNAs (sRNAs), the OD_{600} of the TuMV-AS9-GFP-carrying *Agrobacterium* suspension was increased to 0.125 and infiltrated leaves were collected for protein and RNA extraction. In a complementary assay, NSs and controls were infiltrated at an OD_{600} of 1.0. Twenty-four hours later, infiltrated leaves were mechanically inoculated with TuMV-AS9-GFP virions. Six days after infiltration, suppression of antiviral RNA silencing was scored by counting the number of local infection foci per leaf.

To measure virus-induced RNA silencing, transgenic *N. benthamiana* 16c leaves were mechanically inoculated with TuMV-AS9-GFP virions 1 day after infiltration of NSs or controls. Silencing of the GFP transgene in non-inoculated leaves was measured at 10, 15, and 20 days after infiltration.

High molecular weight RNA and sRNA northern blotting

Small RNA accumulation was measured as previously described (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). Using duplicate gels, TuMV-AS9-GFP-derived sRNAs were detected using probes to target the GFP tag or the cylindrical inclusion helicase (CI). Probes against GFP or CI consisted of PRC products labeled with digoxigenin (DIG)-labeled (11 175 033 910; Roche). Blots were hybridized for 16 h at 38°C and washed at 42°C. Chemiluminescence was detected using CDP-Star (12 041 677 001; Roche, Basel, Switzerland).

NSs transcript was detected by high molecular weight RNA northern blotting using 4 µg total RNA, a 1% agarose gel containing 1.1% formaldehyde, and 1X 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid running buffer. After capillary transfer to a nylon membrane (11417 240 001; Roche), NSs RNA and ribosomal 18S RNA were detected with DIG-labeled

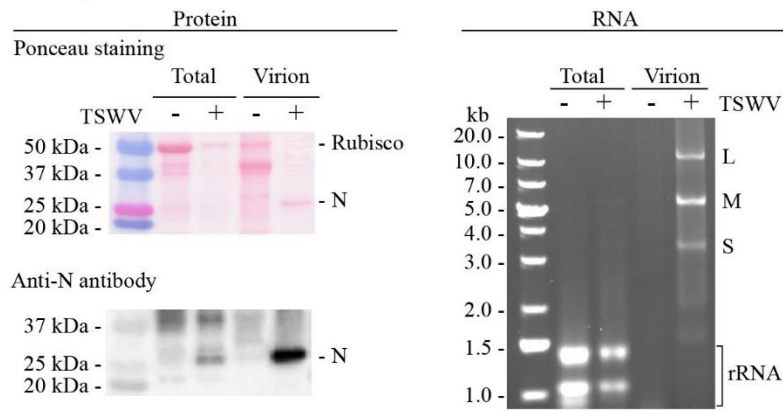
PCR products amplified from pENTR-NSs and *Arabidopsis thaliana* genomic DNA, respectively. For the latter, the oligonucleotides 18S_rRNA_F (5'-CACCTCCCTTAACGAGGATCCATTGG-3') and 18S_rRNA_R (5'-AGAGCGTAGGCTTGCTTTGAGCACTC-3') were used and the PCR product was cloned into pENTR (pENTR-18SAttrDNA). Blots were hybridized for 16 h at 55°C and washed at 60°C.

RESULTS

TSWV virion purification

TSWV virions were purified from three plant species with similar results. Compared to the initial extracts, staining and immunoblots showed protein N enrichment and depletion of the large subunit of rubisco in samples purified for virions (Figure 2A). A dilution curve revealed a 16-fold enrichment of protein N after virion purification from *N. benthamiana* (Figure 2B). Using *D. stramonium* and *S. lycopersicum*, this protein was enriched by 8 and 2-fold, respectively (S1 Figure), suggesting that enrichment efficiency relates to TSWV abundance.

A Virion purification



B Purification efficiency

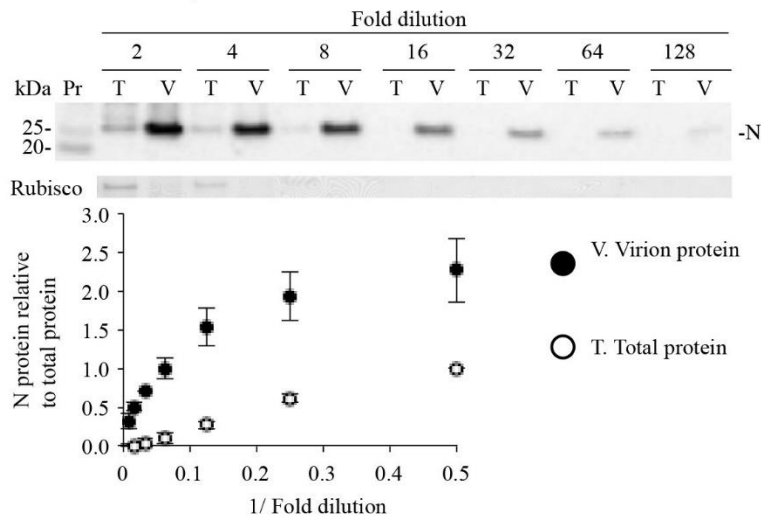


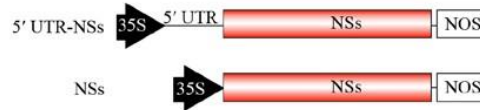
Figure 2. *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) virion purification and genomic RNA extraction. Total and virion protein and RNA extracted from 20 g mock-inoculated (-) or TSWV-infected (+) *Nicotiana benthamiana* plants at 21 days post inoculation. **A.** Virion purification. Left panel: representative blot stained with Ponceau S solution and an immunoblot showing nucleocapsid protein (N). Precision Plus Dual Color (161-0374; Bio-Rad) was used as a size marker. Right panel: 1% agarose gel electrophoresis analysis of total and virion RNA. GeneRuler 1-kb Plus DNA ladder (SM1333; Thermo Fisher Scientific) was used as a marker. Positions of the large (L), medium (M), and small (S) TSWV genomic RNAs and ribosomal RNA (rRNA) are indicated. **B.** Virion purification efficiency evaluated by a dilution curve. The chart shows signal intensities of the N protein bands measured with ImageJ. Values are reported as averages \pm standard errors of four biological replicates expressed relative to the two-fold dilution of the total protein sample.

In *N. benthamiana*, total RNA samples contained ribosomal RNA but TSWV genomic RNAs were not detected (Figure 2A). In contrast, a marked reduction in ribosomal RNA and an increase in TSWV genomic RNA was observed after virion purification (Figure 2A). Similar results were obtained for *D. stramonium* and *S. lycopersicum* (S1 Figure). In infected plants, RNA L is generally less abundant than the M and S transcripts (Hedil *et al.*, 2014), as obtained in the virion RNA isolated from *D. stramonium* and *S. lycopersicum* (S1 Figure). However, in *N. benthamiana* samples, RNA L was as abundant as RNA S (Figure 2A). RNA-dependent RNA polymerase (RDR1) is a critical component of antiviral RNA silencing in plants (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010), and *N. benthamiana* harbors a mutation in the gene by which it is encoded (*NbRdRP1m*) (Yang *et al.*, 2004). Thus, the higher levels of RNA L observed in *N. benthamiana* suggest that this RNA is preferentially targeted by RDR1-dependent silencing, as shown by sRNA sequencing in the absence of functional NSs (Margaria *et al.*, 2015b).

NSs clones

Two NSs clones including or lacking the 5' UTR were generated (Figure 3A). NSs cDNA was cloned into pENTR and inserted into pMDC32 for functional analysis (S2 Figure) (Curtis and Grossniklaus, 2003). Nucleotide sequences of the NSs open reading frame were used to predict the corresponding amino acid sequence. The consensus sequence for all 61 TSWV segment S records available in GenBank was used as a reference. Compared to this reference sequence, the NSs clones described here exhibited 10 amino acid changes (Figure 3B) outside of conserved motifs, and hence not within the predicted essential RNA binding domains (de Ronde *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2014; Hedil *et al.*, 2015).

A NSs clones



B NSs amino acid sequence

	WG motif	RNA binding domain 1	
Reference	MSSSVYESIIQTRASVWGSTASGKAVVDSYWIHELGTGSQLVQTQLYSDSRKSSFGYTA	60	
Clone	MSSSVYESIIQTRASVWGSTASGKAVVDSYWIHELGTGSQLVQTQLYSDSRKSSFGYTA	60	

Reference	KVGNLPCEEEEILSQHVYIPIFDDIDFSINIDDSVLALSVCSNTVNANGVKHQGHLKVLVS	120	
Clone	KVGNLPCEEEEILSQHVYIPIFDDIDFSINIDDSVLALSVCSNTVNANGVKHQGHLKVLVS	120	
	;**		
Reference	PAQLHSIGSIMNRSDITDRFQLQBKDIIPNDRYIEAANKGSLSCVKEHTYKIEMCYNQAL	180	
Clone	PAQLHSIGSIMNRSDITDRFQLQBKDIIPNDRYIEAANKGSLSCVKEHTYKIEMCYNQAL	180	

	GKV motif	RNA binding domain 2	
Reference	GKVNVLSPNRRNVHEWLYSFKPNFNQVESNNRTVNSLAVKSLLSAENNIMPNSQAFVKAS	240	
Clone	GKVNVLSPNRRNVHEWLYSFKPNFNQVESNNRTVNSLAVKSLLSAENNIMPNSQAFVKAS	240	
	*****;*****		
Reference	TDSHFKLSLWLRVPKVLKQISIQKLFKVAGDETNKTFYLSIACIPNHNSVETALNITVIC	300	
Clone	TDSHFKLSLWLRVPKVLKQISIQKLFKVAGDETNKTFYLSIACIPNHNSVETALNINVIC	300	

Reference	KHQLPIRKCKAPFELSMMFSDLKEPYNIVHDPSYPQRIVHALLEHTSFAQVLCNNLQED	360	
Clone	KHQLPIRKCKAPFELSMMFSDLKEPYNIVHDPSYPQRIVHALLEHTSFAQVLCNNLQED	360	

		YL motif	
Reference	VIIYTLNNHELTPGKLDLGERTLNYSedaykrkyfLSKtleclpsntQTMSYLDsIQIPs	420	
Clone	VIIYTLNNHELTPGKLDLGERTLNYSedaykrkyfLSKtleclptntQTMSYLDsIQIPs	420	

		RNA binding domain 3	
Reference	WKIDFARGEIKISPOQSVSAKSLKLDLSGIKKESKIKEAYASGSK	467	
Clone	WKIDFARGEIKISPOQSVSAKSLKLDLSGIKKESKVNEAYASGSK	467	
	*****;*****		

Figure 3. NSs clones and amino acid sequence. **A.** Representation of NSs clones in pMDC32, one containing and one lacking the 5' untranslated region (UTR), placed between the 35S promoter and the nopaline synthase (NOS) terminator. **B.** Amino acid sequence of the NSs clone aligned to the consensus NSs sequence derived from all 61 *Tomato spotted wilt virus* segment S records in GenBank (Reference). Conserved WG, GKV, and YL motifs are indicated in blue. Three predicted RNA binding domains are indicated in red.

Local transgene silencing suppression

ssGFP was expressed alone or in the presence of NSs in *N. benthamiana* 16c plants. NSs prevented GFP silencing in the infiltrated zones (Figure 4). GFP fluorescence was 44 and 34% of that observed for P19 using the 5' UTR-NSs and NSs clones, respectively. This level of local transgene silencing suppression agrees with previous results (Takeda *et al.*, 2002).

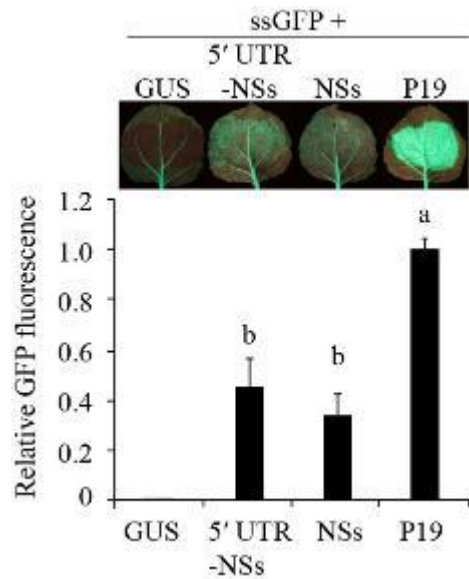


Figure 4. Suppression of transgene silencing by NSs. Single-stranded green fluorescent protein (ssGFP) was infiltrated alone or in combination with NSs in *Nicotiana benthamiana* 16c leaves. Beta-glucuronidase (GUS) and P19 were used as negative and positive controls, respectively. Five days after infiltration, GFP fluorescence was visualized under ultraviolet light. The histogram shows average GFP fluorescence \pm standard error relative to leaves infiltrated with P19, based on 16 leaves from two independent experiments. Bars with the same letter do not significantly differ (Tukey's test with $\alpha = 0.05$). UTR = untranslated region.

Antiviral RNA silencing suppression

Tospoviral NSs clones have been characterized previously using transgene silencing and *in vitro* assays (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; Schnettler *et al.*, 2010; de Ronde *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014; Hedil *et al.*, 2015). However, transgene silencing and antiviral RNA silencing differ in key genetic requirements (Ding and Voinnet, 2007). Moreover, the effect of NSs clones on the latter has not been demonstrated experimentally. We tested NSs antiviral RNA silencing activity using two complementary approaches and two silencing suppressor-deficient viruses unable to infect *N. benthamiana*. In co-infiltration assays, both 5' UTR-NSs and NSs complemented suppressor-deficient TCV-GFP and TuMV-AS9-GFP, resulting in the formation of visible local infection foci (Figure 5). The number of infection foci per leaf for both viruses in the presence of NSs was between 40 and 60% of that observed using P19. Interestingly, the TCV-GFP infection foci formed after infiltration of the two NSs constructs were smaller (0.3 ± 0.1 mm in diameter) and dimmer

than those seen following P19 treatment (1.0 ± 0.07 mm in diameter; Figure 5A). TuMV-AS9-GFP NSs and 5' UTR-NSs infection foci were similar in size to those observed with P19, but of lower intensity (Figure 5B). Virus accumulation was measured by immunoblotting. With NSs, TuMV-AS9-GFP coat protein expression was 20% of the level observed using P19 (Figure 5B).

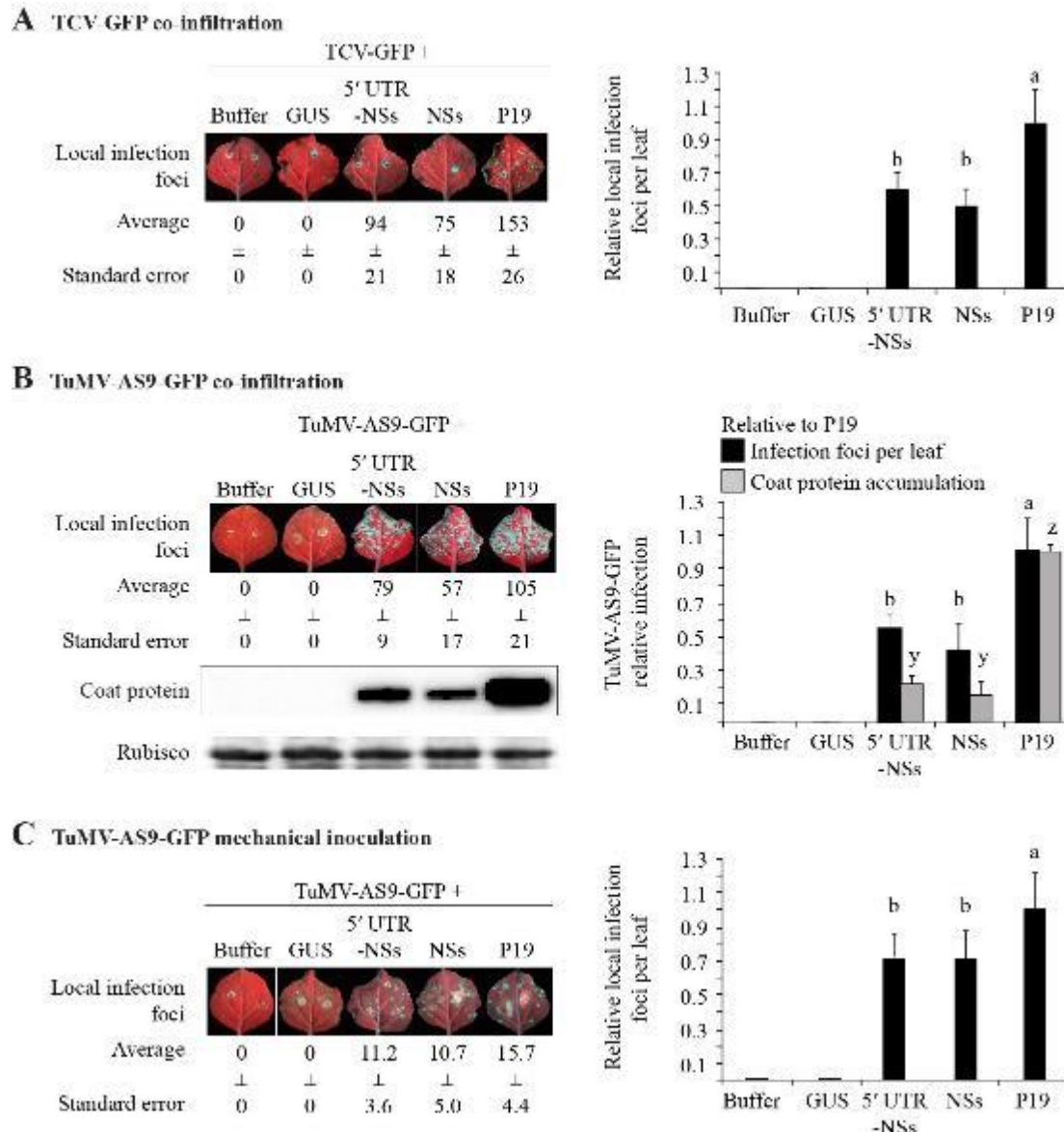


Figure 5. Complementation of suppressor-deficient *Turnip crinkle virus*-green fluorescent protein (TCV-GFP) and *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-GFP by NSs in *Nicotiana benthamiana*. Twelve leaves were infiltrated per treatment and visualized under ultraviolet light 6 days later. Green spots are local infection foci. Average numbers of visible local infection foci per leaf are given below pictures. The histogram shows average

number of local infection foci \pm standard error, relative to that observed on leaves infiltrated with P19. Bars with the same letter are not statistically different (Tukey's test with $\alpha = 0.05$). GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region. **A.** Co-infiltration of TCV-GFP with NSs or controls. **B.** Co-infiltration of TuMV-AS9-GFP with NSs or controls. The blot shows TuMV coat protein accumulation in the same leaves. The histogram shows average (\pm standard error) coat protein accumulation (four biological replicates) and local infection (12 leaves) foci number relative to that observed in leaves infiltrated with P19. **C.** Complementation of TuMV-AS9-GFP by NSs after mechanical inoculation. Leaves (12 per treatment) were infiltrated with NSs (at an optical density at 600 nm of 1.0) or controls, and mechanically inoculated with virions 1 day later. Data were collected and processed as in B.

Initiation of virus infection by agroinfiltration of binary vectors is sensitive to both transgene and antiviral RNA silencing (Powers *et al.*, 2008). To exclude the possible effects of the former, we measured antiviral RNA silencing by first infiltrating NSs into *N. benthamiana* leaves and 1 day later, mechanically inoculating them with TuMV-AS9-GFP virions. Formation of local infection foci by TuMV-AS9-GFP confirmed NSs suppression of antiviral RNA silencing. The number of infection foci per leaf in the presence of NSs was 70% of that observed using P19 (Figure 5C).

Together, these results show that NSs is a suppressor of antiviral RNA silencing directed against two heterologous viruses: TCV-GFP and TuMV-AS9-GFP. However, NSs is less suppressive than P19. Inclusion of the 5' UTR did not significantly affect NSs activity (Figures 4 and 5). In infiltrated leaves, RNA of both NSs clones accumulated to similar levels (Figure 6B), showing that the 5' UTR did not significantly alter transcription or downstream events.

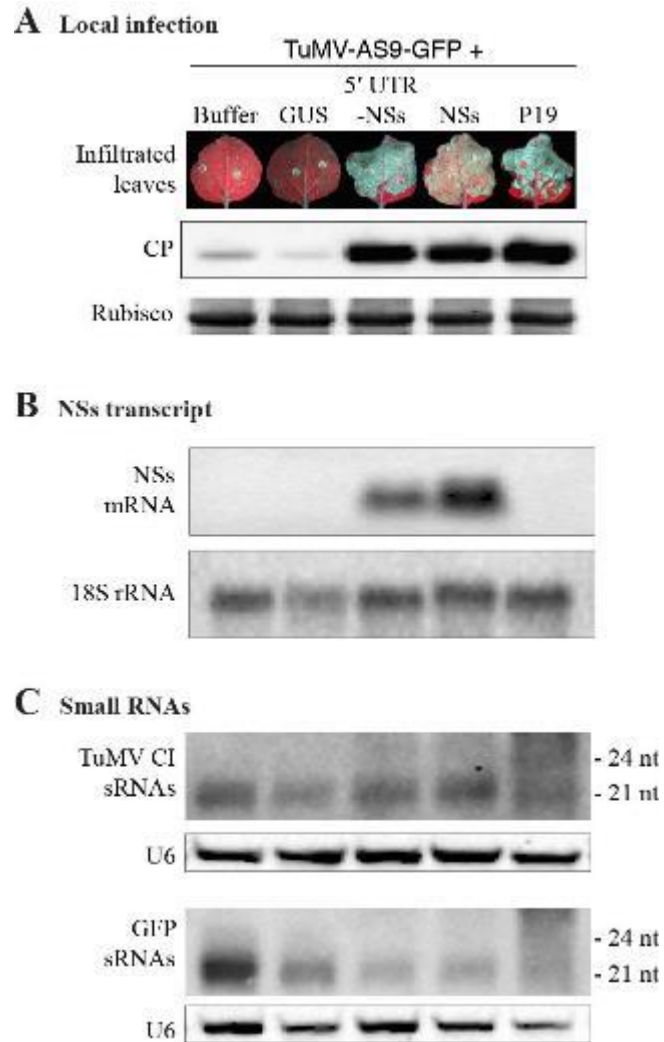


Figure 6. Virus and virus-derived small RNA (sRNA) accumulation. *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-greenfluorescent protein (GFP) was co-infiltrated at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.125 with NSs ($OD_{600}= 0.5$) or controls in *Nicotiana benthamiana*. Four days after infiltration, photographs were taken and samples collected for protein and RNA extraction. Accumulation of TuMV-AS9-GFP coat protein (CP), NSs transcript, and TuMV-AS9-GFP-derived small interfering RNA (siRNA) was determined in four biological replicates. GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region. **A.** Representative leaves showing local infection, and TuMV-AS9-GFP CP accumulation determined by immunoblotting. **B.** Accumulation of TuMV-AS9-GFP-derived sRNAs detected with probes against cylindrical inclusion helicase (CI) or GFP. U6 was used as a loading control. **C.** NSs transcript accumulation; 18S ribosomal RNA (rRNA) was used as a loading control.

Virus-derived sRNA accumulation

Viruses are inducers, targets, and suppressors of RNA silencing (Ding and Voinnet, 2007). Induction results in the formation of sRNAs of 21 to 24 nucleotides (nt) derived from viral RNA by Dicer-like proteins. Targeting is mediated by Argonaute proteins associated with virus-derived small interfering RNAs (sRNAs) and causes the degradation of viral RNA after slicing or translational repression (Ding and Voinnet, 2007; Carbonell *et al.*, 2012; Carbonell and Carrington, 2015; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015). To gain insight into the mechanistic activity of NSs, we co-infiltrated it with TuMV-AS9-GFP and measured the accumulation of virus-derived sRNAs (Figure 6). sRNAs derived from the two areas of the TuMV-AS9-GFP genome examined (CI and GFP) were predominantly 21-nt long (Figure 6C). Despite greater viral presence (Figure 6A), and as observed for P19, NSs caused a reduction in the levels of virus-derived sRNA with respect to GUS treatment or leaves infiltrated with virus alone (Figure 6C).

Virus-induced GFP silencing

Accumulation of GFP-derived sRNAs in the presence of NSs (Figure 6C) offered an opportunity to measure the effect of this suppressor on the activity and movement of the silencing signal. Even in the presence of NSs, mechanical inoculation with TuMV-AS9-GFP induced systemic silencing of the *N. benthamiana* 16c GFP transgene (Figure 7), suggesting movement of the antiviral RNA silencing signal, TuMV-AS9-GFP, or both. Despite clear differences in local infection (Figure 7A), plants infiltrated with TuMV-AS9-GFP alone or with GUS displayed systemic GFP silencing at the same time point as those treated with NSs (Figure 7B). TuMV-AS9-GFP does not form local infection foci in the absence of a silencing suppressor (Figures 7A and 5C). Thus, induction of GFP silencing in non-inoculated leaves suggests systemic movement of the silencing signal.

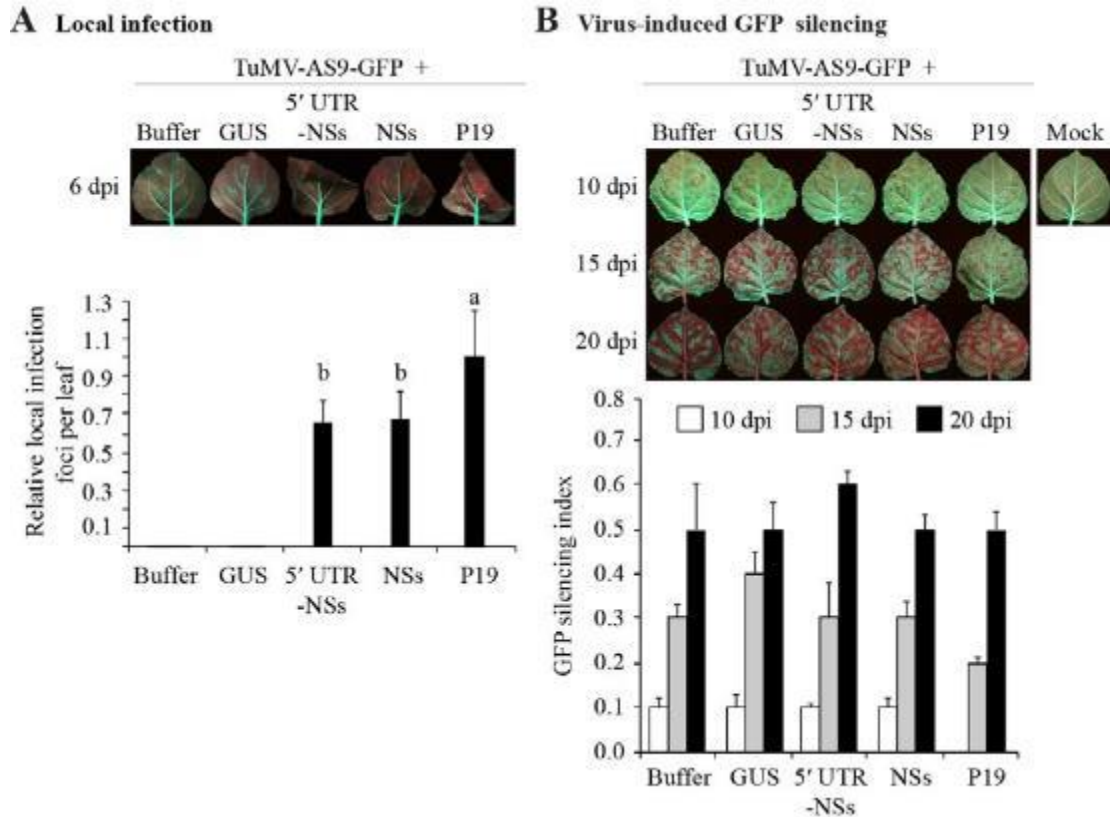


Figure 7. Virus-induced green fluorescent protein (GFP) silencing after mechanical inoculation of *Turnip mosaic virus* (TuMV)-AS9-GFP 1 day after infiltration of NSs or controls in *Nicotiana benthamiana* 16c plants. Photographs were taken and infection efficiency is expressed as in Figure 5. GUS = beta-glucuronidase; UTR = untranslated region. **A.** Local infection. Green spots are TuMV-AS9-GFP local infection foci. The histogram shows average number of local infection foci per leaf \pm standard error, relative to P19 (14 ± 3.5). **B.** Virus-induced silencing of the GFP transgene in 16c plants. Photographs were taken under ultraviolet light at 10, 15, and 20 days post inoculation (dpi). Red areas indicate silencing of the GFP transgene. The histogram shows average GFP silencing index values \pm standard error from eight plants.

Plants infiltrated with P19 showed a delay in the onset of systemic GFP silencing, which correlated with a reduction in the accumulation of GFP-derived sRNAs (Figure 6C). P19 is a strong silencing suppressor that binds sRNAs (Omarov *et al.*, 2007). The delay observed suggests systemic movement of TuMV-AS9-GFP, followed by silencing of both viral RNA and the GFP transgene.

DISCUSSION

In plant-virus interactions, silencing suppressors are pathogenicity determinants involved in symptom development (Ding and Voinnet, 2007; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; García and Pallás, 2015), while avirulence factors trigger a hypersensitive response (de Ronde *et al.*, 2014). TSWV NSs is both a silencing suppressor and an avirulence factor (de Ronde *et al.*, 2014). Consistent with these models, variations in symptom development, differences in virus accumulation and clearance, and the emergence of TSWV isolates capable of overcoming resistance in pepper plants have been attributed to NSs mutations (de Ronde *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014). Furthermore, NSs silencing suppression is necessary for persistent infection and transmission of TSWV by *F. occidentalis* (Whitfield *et al.*, 2005; Margaria *et al.*, 2014). Collectively, these observations imply that pathogenic differences in TSWV isolates, and possibly other tospoviruses, are likely caused by NSs genetic variation. The assays described here constitute valuable experimental tools for the characterization of NSs variants.

Consistent with previous descriptions of this protein from several tospoviruses (Takeda *et al.*, 2002; Bucher *et al.*, 2003; de Ronde *et al.*, 2014; Margaria *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2014; Hedil *et al.*, 2015), NSs prevented local transgene silencing in the present study (Figure 4). However, the suppression of antiviral RNA silencing by NSs had not been demonstrated before. Using two independent assays, we showed that NSs rescued the pathogenicity of suppressor-deficient TCV-GFP and TuMV-AS9-GFP, resulting in the establishment of local infection (Figure 5). Accordingly, NSs suppresses antiviral RNA silencing directed against these viruses.

Transgene and antiviral silencing suppression assays showed NSs activity to be 30 to 70% of that of P19 (Figures 4 and 5). TCV-GFP and TuMV-AS9-GFP local infection foci were less abundant with NSs than P19 (Figure 5). In addition, TCV-GFP infection foci were smaller following co-infiltration with NSs than those formed in the presence of P19 (Figure 5A), and lower levels of TuMV-AS9-GFP accumulated in plants treated with NSs constructs than in those in which P19 was expressed (Figure 5B). Several models might explain this difference in the magnitude of silencing suppression. For instance, NSs may be less stable and accumulate to lower levels than P19, or could require viral or cellular co-

factors not present in transient expression assays. A combination of such factors could also be responsible. An epitope-tagged NSs is currently being used to test these possibilities.

Antiviral RNA silencing is characterized by the production of virus-derived sRNAs that mediate targeting of viral transcripts (Ding and Voinnet, 2007; Carbonell *et al.*, 2012; Carbonell and Carrington, 2015; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015). Leaves co-infiltrated with TuMV-AS9-GFP and NSs accumulated virus-derived sRNAs (Figure 6C), showing that this silencing suppressor does not prevent their formation. However, relative to the amount of virus present, NSs caused a reduction in the accumulation of TuMV-derived sRNAs. These observations suggest that NSs interferes with the amplification of the antiviral silencing response. TuMV-AS9-GFP did not form local infection foci in the absence of a silencing suppressor (Figure 7A), but did induce systemic GFP transgene silencing in *N. benthamiana* 16c plants at the same rate in the presence or absence of NSs (Figure 7B). This suggests that NSs did not interfere with the systemic movement of the virus-induced GFP silencing signal. However, we cannot exclude the possibility that TuMV-AS9-GFP moved out of inoculated leaves in the presence of NSs or P19.

Several models have been proposed to explain RNA silencing suppression based on biochemical analyses and domain predictions of tospoviral NSs proteins. The presence of a WG motif (Figure 3B) (de Ronde *et al.*, 2014) suggests that NSs interacts with Argonaute proteins to trigger their degradation or inhibit their activity (Schnettler *et al.*, 2010; Eifan *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014). The *Tomato ringspot virus* coat protein contains a GW/ WG motif that mediates interaction with and triggers degradation of ARGONAUTE1 (AGO1) (Karran and Sanfaçon, 2014). TCV capsid protein P38 also harbors two GW/WG motifs that facilitate association with AGO1, preventing loading of endogenous and virus-derived sRNAs (Azevedo *et al.*, 2010). The existence of three RNA binding domains (Figure 3B) (de Ronde *et al.*, 2014) and the results of *in vitro* assays suggest that NSs binds long cellular and viral double-stranded RNAs (dsRNAs), such as microRNA (miRNA) precursors and viral replication intermediates (Schnettler *et al.*, 2010; Eifan *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014). These same domains may be involved in binding cellular miRNAs and virus-derived sRNAs (Schnettler *et al.*, 2010; Eifan *et al.*, 2013; de Ronde *et al.*, 2014). Experimental evidence to support NSs-mediated degradation or

inhibition of Argonaute proteins, binding of virus-derived sRNAs, association with miRNAs or their precursors, or interaction with viral dsRNA *in vivo* has not yet been produced. Similarly, the role of NSs silencing suppression in virus infection and movement has not been determined. An infectious TSWV clone is not available, limiting the experimental approaches by which these processes might be examined.

The NSs clones and assays described here establish a foundation to determine the mechanistic activity of NSs. TCV (Qu *et al.*, 2008) and TuMV (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010) replicate in *Arabidopsis thaliana*, mutants of which lacking key RNA silencing components have been characterized (Qu *et al.*, 2008; Garcia-Ruiz *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Garcia-Ruiz *et al.*, 2015). A genetically tractable system based on chimeric TuMV and *Arabidopsis thaliana* is being developed by our group to determine the mechanism by which NSs suppresses antiviral RNA silencing. The genetic features of this system will allow us to ascertain the contribution of NSs antiviral silencing suppression to the establishment of virus infection and movement and the development of symptoms. Similarly, it will be possible to identify plant genes that repress TSWV infection.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas L. German for providing TSWV and the seed of several hosts, Feng Qu for donating TCV-GFP, and S. Tatineni for contributing pPZP-35s-GFP. This research was supported by the University of Nebraska-Lincoln Office of Research and Economic Development, the Institute for Agriculture and Natural Resources, and a First Award from the Nebraska-EPSCoR. Stella Uiterwaal and Aaron Knapp were supported by the Undergraduate Creative Activities Research Experience program. Tania Ocampo Ocampo was the recipient of a graduate student fellowship from CONACYT (#2014-MZ02015). We thank Stacie Skaff, Dalton Hegeholz, and Gwennan Plouzek for technical assistance.

REFERENCES

- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, et al. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* 24: 904-915. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1908710>
- Benedito VA, Visser PB, Angenent GC and Krens FA (2004). The potential of virus-induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes. *Genet. Mol. Res.* 3: 323-341.
- Bucher E, Sijen T, De Haan P, Goldbach R, et al. (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J. Virol.* 77: 1329-1336. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.77.2.1329-1336.2003>
- Carbonell A and Carrington JC (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27: 111-117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.013>
- Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Gilbert KB, et al. (2012). Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 24: 3613-3629. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.099945>
- Curtis MD and Grossniklaus U (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133: 462-469. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.027979>
- de Avila AC, Huguenot C, Resende RdeO, Kitajima EW, et al. (1990). Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. *J. Gen. Virol.* 71: 2801-2807. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-71-12-2801>
- de la Torre-Almaráz R, Cervantes-Díaz L, Houston HA and Valverde R (2002). Variación fenotípica de algunos aislamientos mexicanos del virus marchitez manchada del tomate (TSWV). *Agrociencia* 36: 211-221.
- de Ronde D, Butterbach P, Lohuis D, Hedil M, et al. (2013). *Tsw* gene-based resistance is triggered by a functional RNA silencing suppressor protein of the *Tomato spotted wilt virus*. *Mol. Plant Pathol.* 14: 405-415. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12016>
- de Ronde D, Pasquier A, Ying S, Butterbach P, et al. (2014). Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA silencing suppression. *Mol. Plant Pathol.* 15: 185-195. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12082>
- Ding SW and Voinnet O (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039>

- Eifan S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A, et al. (2013). Non-structural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses* 5: 2447-2468. <http://dx.doi.org/10.3390/v5102447>
- García JA and Pallás V (2015). Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 11: 21-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.001>
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, et al. (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. *Plant Cell* 22: 481-496. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.109.073056>
- Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, et al. (2015). Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS Pathog.* 11: e1004755. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004755>
- Hedil M, Hassani-Mehraban A, Lohuis D and Kormelink R (2014). Analysis of the A-U rich hairpin from the intergenic region of tospovirus S RNA as target and inducer of RNA silencing. *PLoS One* 9: e106027. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106027>
- Hedil M, Sterken MG, de Ronde D, Lohuis D, et al. (2015). Analysis of tospovirus NSs proteins in suppression of systemic silencing. *PLoS One* 10: e0134517. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134517>
- Johansen LK and Carrington JC (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the *Agrobacterium*-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126: 930-938. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.126.3.930>
- Karran RA and Sanfaçon H (2014). *Tomato ringspot virus* coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27: 933-943. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0099-R>
- Lane LC (1986). Propagation and purification of RNA plant viruses. *Methods Enzymol.* 118: 687-696. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18109-2](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(86)18109-2)
- Law MD and Moyer JW (1990). A tomato spotted wilt-like virus with a serologically distinct N protein. *J. Gen. Virol.* 71:933-938. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-71-4-933>
- Mandal B, Csinos AS, Martinez-Ochoa N and Pappu HR (2008). A rapid and efficient inoculation method for *Tomato spotted wilt tospovirus*. *J. Virol. Methods* 149: 195-198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.12.007>
- Margaria P and Rosa C (2015). First complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from the United States and its relationship to other TSWV isolates of different geographic origin. *Arch. Virol.* 160: 2915-2920. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2589-6>

- Margaria P, Bosco L, Vallino M, Ciuffo M, et al. (2014). The NSs protein of tomato spotted wilt virus is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *J. Virol.* 88: 5788-5802. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00079-14>
- Margaria P, Ciuffo M, Rosa C and Turina M (2015a). Evidence of a tomato spotted wilt virus resistance-breaking strain originated through natural reassortment between two evolutionary-distinct isolates. *Virus Res.* 196: 157-161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.012>
- Margaria P, Miozzi L, Rosa C, Axtell MJ, et al. (2015b). Small RNA profiles of wild-type and silencing suppressor-deficient tomato spotted wilt virus infected *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res.* 208: 30-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.05.021>
- Omarov RT, Ciomperlik JJ and Scholthof HB (2007). RNAi-associated ssRNA-specific ribonucleases in *Tombusvirus* P19 mutant-infected plants and evidence for a discrete siRNA-containing effector complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1714-1719. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0608117104>
- Pappu HR, Jones RA and Jain RK (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Res.* 141: 219-236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009>
- Parrella G, Gognalons P, Gebre-Selassie K, Vovlas C, et al. (2003). An update of the host range of *Tomato spotted wilt virus*. *J. Plant Pathol.* 85: 227-264.
- Powers JG, Sit TL, Qu F, Morris TJ, et al. (2008). A versatile assay for the identification of RNA silencing suppressors based on complementation of viral movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 879-890. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-21-7-0879>
- Qu F, Ye X and Morris TJ (2008). *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14732-14737. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0805760105>
- Schnettler E, Hemmes H, Huisman R, Goldbach R, et al. (2010). Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *J. Virol.* 84: 11542-11554. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00595-10>
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, et al. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938-954. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Takeda A, Sugiyama K, Nagano H, Mori M, et al. (2002). Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. *FEBS Lett.* 532: 75-79. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03632-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03632-3)

- Tatineni S, Qu F, Li R, Morris TJ, et al. (2012). *Triticum mosaic poacevirus* enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology* 433: 104-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.07.016>
- Uga H and Tsuda S (2005). A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology* 95: 166-171. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-0166>
- Wang XB, Wu Q, Ito T, Cillo F, et al. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 484-489. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0904086107>
- Whitfield AE, Ullman DE and German TL (2005). Tospovirus-thrips interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 459-489. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017>
- Yang SJ, Carter SA, Cole AB, Cheng NH, et al. (2004). A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6297-6302. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0304346101>
- Zhai Y, Bag S, Mitter N, Turina M, et al. (2014). Mutational analysis of two highly conserved motifs in the silencing suppressor encoded by tomato spotted wilt virus (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Arch. Virol.* 159: 1499-1504. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-013-1928-8>

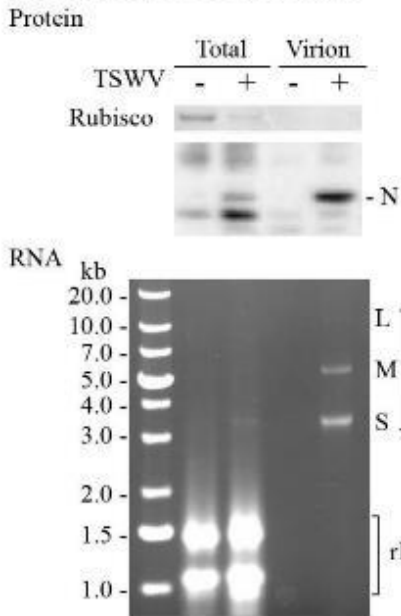
Supplemental material

S1 Figure. *Tomato spotted wilt virus* virion purification from *Datura stramonium* and *Solanum lycopersicum*.

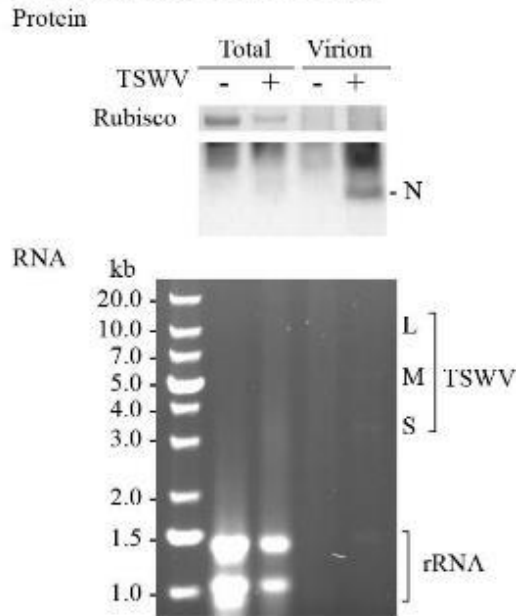
S2 Figure. *Tomato spotted wilt virus* NSs cloning strategy.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

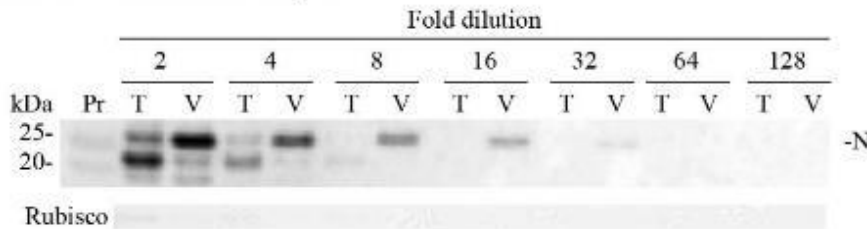
A Purification from *D. stramonium*



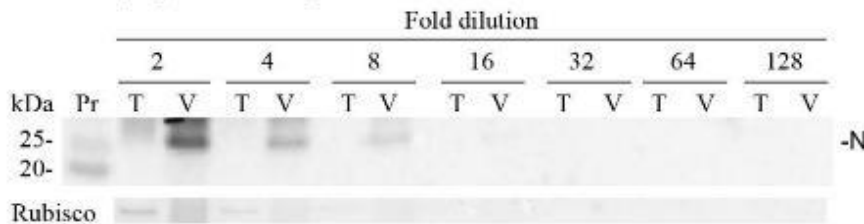
B Purification from *S. lycopersicum*



C Dilution of *D. stramonium* samples



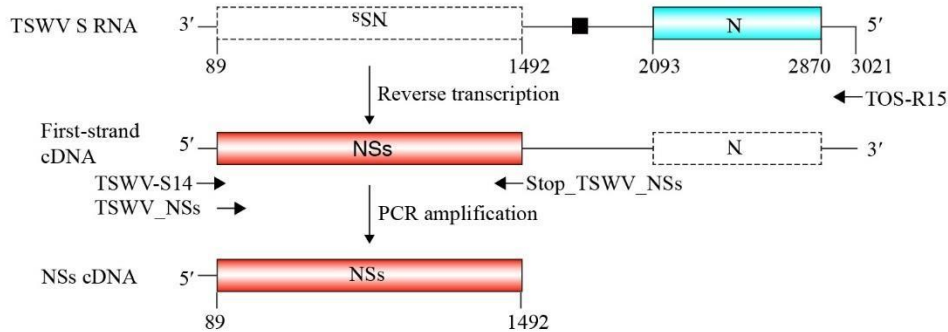
D Dilution of *S. lycopersicum* samples



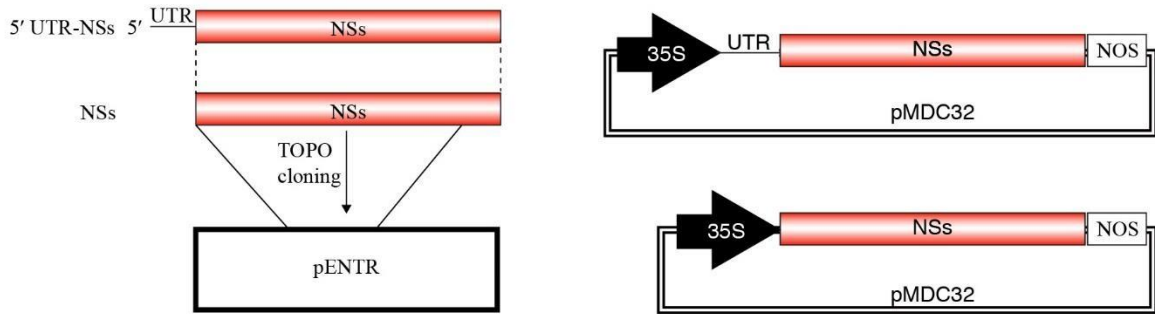
S1 Figure 1. Tomato spotted wilt virus (TSWV) virion purification. A. *Datura stramonium*. B. *Solanum lycopersicum*. The top panel shows a representative protein N immunoblot from total (T) and virion (V) protein samples, as in Figure 2. The bottom panel shows total and virion RNA, as in Figure 2. L, M, and S = large, medium, and small TSWV RNA,

respectively; rRNA = ribosomal RNA. **C.** Efficiency of virion purification from *D. stramonium*. **D.** Efficiency of virion purification from *S. lycopersicum*.

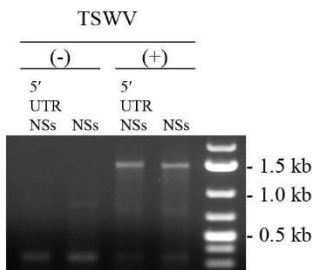
A NSs cloning



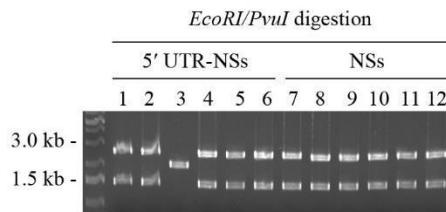
B NSs constructs



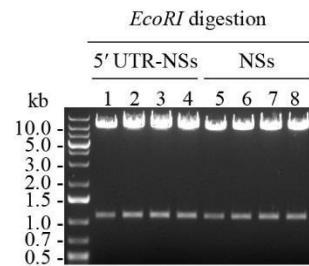
C RT-PCR product



D NSs clones in pENTR



E NSs clones in pMDC32



S2 Figure 1. NSs cloning strategy. Two versions were cloned, one containing and one lacking the 5' untranslated region (UTR). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) products were ligated into pENTR and subsequently inserted in pMDC32. **A.** Diagram representing *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genomic RNA S and the NSs cloning strategy. Coordinates indicate 3' and 5' UTRs and open reading frames. Horizontal arrows represent primers used for RT-PCR. cDNA = complementary DNA. **B.** Representation of the NSs clones in pENTR and pMDC32. 35S = 35S promoter; NOS = nopaline synthase terminator. **C.** Agarose (1%) gel showing the RT-PCR products obtained from virion RNA extracted from mock-inoculated or TSWV-infected *Nicotiana benthamiana*. GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder was used as a marker. **D.** Identification of NSs clones

in pENTR by *EcoRI/PvuI* double digestion of plasmid DNA minipreparations. **E.** Identification of NSs clones in pMDC32 by *EcoRI* digestion of plasmid DNA minipreparations.

NOTA. El presente artículo científico estuvo bajo la dirección y guía del Dr. Hernan Garcia-Ruiz. Asimismo, los experimentos para dicho artículo fueron realizados y apoyados por la University of Nebraska-Lincoln Office of Research and Economic Development, the Institute for Agriculture and Natural Resources, y por Nebraska-EPSCoR.