

**Análisis de la dinámica de replicación de un virus
de RNA de plantas y del uso de microRNAs
artificiales como estrategia antiviral**

FERNANDO MARTÍNEZ GARCÍA

**EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

Colección Tesis Doctorales

© Fernando Martínez García

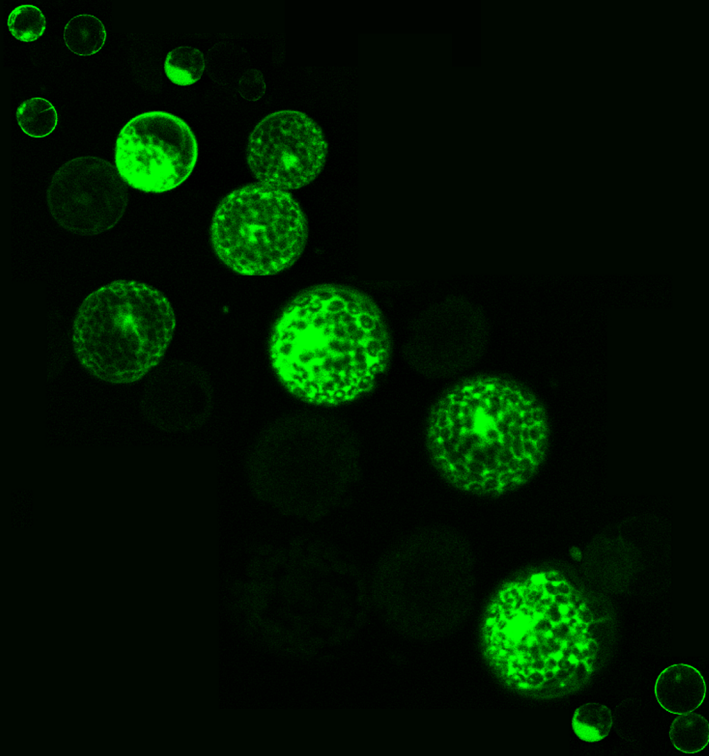
© 2014, de la presente edición: Editorial Universitat Politècnica de València
Telf.: 963 877 012 / www.lalibreria.upv.es

ISBN: 978-84-9048-269-8 (version impresa)

Queda prohibida la reproducción, distribución, comercialización, transformación, y en general, cualquier otra forma de explotación, por cualquier procedimiento, de todo o parte de los contenidos de esta obra sin autorización expresa y por escrito de sus autores.

**Análisis de la dinámica de replicación de un virus de RNA de plantas
y
del uso de microRNAs artificiales como estrategia antiviral**

Fernando Martínez García



Directores

Dr. José Antonio Darós Arnau

Prof. Santiago F. Elena Fito



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

Enero 2014



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

**“Análisis de la dinámica de replicación de un
virus de RNA de plantas y del uso de microRNAs
artificiales como estrategia antiviral”**

MEMORIA DE TESIS PRESENTADA POR

Fernando Martínez García

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DIRECTORES

Dr. José Antonio Darós Arnau

Prof. Santiago F. Elena Fito

Valencia, enero 2014



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



IBMCP

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

El **Dr. José Antonio Darós Arnau**, Científico Titular del CSIC, y el **Dr. Santiago F. Elena Fito**, Profesor de Investigación del CSIC, ambos pertenecientes al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia) de Valencia.

CERTIFICAN:

que el Licenciado en Biología **Fernando Martínez García** ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título "Análisis de la dinámica de replicación de un virus de RNA de plantas y del uso de microRNAs artificiales como estrategia antiviral", y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Valencia, a 16 de diciembre de 2013.

Dr. José Antonio Darós Arnau

Dr. Santiago F. Elena Fito

A Javi, Cris, Edu y Montse.

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
RESUM.....	12
SUMMARY.....	15
ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Los virus.....	25
1.1. Definición y clasificación de los virus.....	25
1.2. Ciclo infeccioso de los virus de plantas.....	29
1.3. Género <i>Potyvirus</i>	33
2. Características evolutivas de los virus.....	37
2.1. Particularidades evolutivas de los virus de RNA.....	37
2.2. Eficacia biológica viral.....	38
2.3. Tamaño del genoma.....	39
2.4. Tasa de mutación.....	40
2.5. Umbral de error.....	42
2.6. Robustez en los virus de RNA.....	43
2.7. Modo de replicación viral.....	45
3. Silenciamiento por RNA en plantas.....	48
3.1. Silenciamiento por RNA: aspectos generales.....	48
3.2. Los virus como inductores y dianas del silenciamiento por RNA.....	49
3.3. Supresión viral del silenciamiento por RNA.....	51
3.4. Ruta de silenciamiento por miRNAs.....	52

4. Estrategias para generar resistencia antiviral en plantas transgénicas.....	55
4.1. Resistencia mediada por silenciamiento del RNA.	55
4.2. Resistencia mediada por amiRNAs.	56
5. Durabilidad de la resistencia mediada por amiRNAs.....	58
OBJETIVOS.....	63
CAPÍTULO I.....	67
CAPÍTULO II	97
CAPÍTULO III	129
DISCUSIÓN GENERAL	157
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA.....	175

RESUMEN

Los virus de RNA de cadena positiva (+) conforman el grupo más numeroso y diverso de los patógenos virales de las plantas. Replican su genoma mediante la síntesis de intermediarios replicativos de polaridad complementaria (-) que sirven de molde para la producción de los RNAs genómicos virales. Dos modelos teóricos contrapuestos que explican la replicación de un virus de RNA son el de amplificación geométrica, donde tanto las cadenas de RNA + como - sirven de molde para la síntesis simétrica de cadenas complementarias con la misma eficiencia, y el de *stamping machine*, donde las cadenas de la polaridad - son preferentemente utilizadas de forma reiterada como molde para la síntesis de múltiples copias del RNA genómico +. La amplificación geométrica permite una expansión más rápida del virus que el mecanismo de *stamping machine* pero con la contrapartida de una mayor frecuencia de mutaciones genéticas en la progenie viral. Para distinguir entre los dos modelos de amplificación genómica en el caso de un típico virus de RNA se plantas, se cuantificó la acumulación de las cadenas + y - del virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV; género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) durante un ciclo de infección intracelular en protoplastos de *Nicotiana benthamiana*. El análisis de la dinámica de acumulación de ambas cadenas permitió determinar que el TuMV utiliza una estrategia de replicación mixta en la que la amplificación geométrica contribuye en un 7% y el *stamping machine* en un 93%. Muy probablemente, esta combinación ha evolucionado para, manteniendo cierta rapidez en la replicación del virus, modular la frecuencia de mutaciones en su progenie.

Recientemente se ha desarrollado una estrategia prometedora para generar plantas resistentes a virus, basada en la expresión de microRNAs artificiales (amiRNAs) dirigidos contra secuencias virales específicas. Sin embargo, las poblaciones virales se adaptan a la presencia de los amiRNAs mediante mutaciones en las secuencias diana, consiguiendo así romper la resistencia. Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* (línea transgénica 12-4) que expresan eficientemente un amiRNA

(amiR159-HC-Pro) contra una secuencia en el cistron que codifica la proteína HC-Pro del TuMV resultan resistentes a la infección por un determinado clon de este virus. Sin embargo, la línea transgénica 10-4, que expresa cantidades subinhibitorias del amiRNA, sólo es parcialmente resistente. Para entender cómo los virus de plantas rompen la resistencia impuesta por los amiRNAs, se han caracterizado mediante ultrasecuenciación de la región diana reconocida por el amiR159-HC-Pro, poblaciones virales evolucionadas tanto en plantas de *A. thaliana* silvestres como en la línea parcialmente resistente 10-4 que son finalmente capaces de romper la resistencia en la línea altamente resistente 12-4. De esta manera, se ha determinado que la población viral que evoluciona en plantas silvestres contiene alelos mutantes potencialmente capaces de romper la resistencia desde el primer pase evolutivo, aunque a frecuencias muy bajas. También, que la población viral contiene haplotipos con mutaciones en todas las posiciones de los 21 nucleótidos que son diana del amiRNA. Finalmente, que con los sucesivos pases evolutivos de planta a planta no se produce un aumento en la frecuencia de los alelos mutantes. Aparentemente, la población viral se encuentra en un equilibrio entre mutación y deriva genética. El proceso de rotura de la resistencia en la plantas 12-4 parece ser el resultado de una elección al azar de uno o más haplotipos mutantes no reconocidos por el amiRNA, de entre los muchos alelos presentes en la población viral. Sin embargo, cuando la población viral evoluciona mediante pases seriados en plantas de la línea 10-4, la frecuencia de alelos potencialmente capaces de romper la resistencia inducida por el amiR159-HC-Pro es mucho mayor, lo que explica que la rotura ocurra más rápidamente. En este caso, la población viral se encuentra en un equilibrio entre mutación, deriva genética y selección.

Las infecciones mixtas en las que dos o más virus pertenecientes a especies distintas coinfectan una misma planta huésped son muy frecuentes en la naturaleza. Además, en este tipo de infecciones suelen ocurrir efectos sinérgicos entre los virus, por lo que se planteó la pregunta de si las infecciones mixtas pudieran facilitar la rotura de la resistencia mediada por amiRNAs. Para responder esta pregunta el TuMV se coinoculó en plantas de *A. thaliana* resistentes de la línea 12-4 con una serie de virus

pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos. Las plantas también se preinfectaron con los diferentes virus y, a continuación, se inocularon con el TuMV. El análisis de las plantas inoculadas mostró que, efectivamente, las infecciones mixtas pueden ser otra causa de rotura de la resistencia mediada por amiRNAs, aunque este efecto depende del virus acompañante. El virus del cascabeleo del tabaco, el virus del mosaico de la coliflor y, notablemente, el virus del mosaico del pepino ayudan al TuMV a vencer la resistencia impuesta por el amiRNA, aunque solo cuando se encuentran infectando la planta que es inoculada con el TuMV.

RESUM

Els virus d'RNA de cadena (+) conformen el grup més nombrós i divers del patògens virals de les plantes. Repliquen el seu genoma mitjançant la síntesi d'intermediaris replicatius de polaritat complementaria (-) que serveixen de motlle per a la producció dels RNAs genòmics virals. Dos models teòrics oposats que expliquen la replicació d'un virus d'RNA són el de amplificació geomètrica, on tant les cadenes de RNA + com - serveixen de motlle per a la síntesi simètrica de cadenes complementaries amb la mateixa eficiència, i el de *stamping machine*, on les cadenes de polaritat - són preferentment utilitzades de forma reiterada com a motlle per a la síntesi de múltiples còpies de l'RNA genòmic +. La amplificació geomètrica permet una expansió més ràpida del virus que el mecanisme de *stamping machine* però amb la contrapartida de una major freqüència de mutacions genètiques en la progènie viral. Per a distingir entre els dos models d'amplificació genòmica en el cas d'un típic virus d'RNA de plants, es va quantificar l'acumulació de les cadenes + i - del virus del mosaic del nap (*Turnip mosaic virus*, TuMV; gènere *Potyvirus*, família *Potyviridae*) durant un cicle d'infecció intracel·lular en protoplasts de *Nicotiana benthamiana*. L'anàlisi de la dinàmica d'acumulació d'ambdues cadenes va permetre determinar que el TuMV utilitza una estratègia de replicació mixta en la que l'amplificació geomètrica contribueix amb un 7% i el *stamping machine* en un 93%. Molt probablement, esta combinació ha evolucionat per a, mantenint certa rapidesa en la replicació del virus, modular la freqüència de mutacions en la seua progènie.

Recentment se ha desenvolupat una estratègia prometedora per a generar plantes resistents a virus, basada en la expressió de microRNAs artificials (amiRNAs) dirigits contra seqüències virals específiques. Tanmateix, les poblacions virals s'adapten a la presència dels amiRNAs mitjançant mutacions en les seqüències diana, aconseguint així trencar la resistència. Plantes transgèniques de *Arabidopsis thaliana* (línia transgènica 12-4) que expressen eficientment un amiRNA (amiR159-HC-Pro) contra una seqüència en el cistró que codifica la proteïna HC-Pro del

TuMV resulten resistents a la infecció per un determinat clon d'este virus. Tanmateix, la línia transgènica 10-4, que expressa quantitats subinhibitòries de l'amiRNA, sols es parcialment resistent. Per a entendre com els virus de plantes trenquen la resistència imposada per els amiRNAs, se ha caracteritzat mitjançant ultrseqüenciació de la regió diana reconeguda per l'amiR159-HC-Pro, poblacions virals evolucionades tant en plantes d'*A. thaliana* silvestres como en la línia parcialment resistent 10-4 que son finalment capaces de trencar la resistència en la línia altament resistent 12-4. D'esta manera, se ha determinat que la població viral que evoluciona en plantes silvestres conte al·lells mutants potencialment capaços de trencar la resistència fins el primer pas evolutiu, encara que a freqüències molt baixes. També, que la població viral conté haplotips amb mutacions en totes las posicions dels 21 nucleòtids que son diana de l'amiRNA. Finalment, que amb els successius passes evolutius de planta a planta no es produeix un augment en la freqüència dels al·lells mutants. Aparentment, la població viral es troba en un equilibri entre mutació i deriva genètica. El procés de trencament de la resistència en les plantes 12-4 pareix ser el resultat d'una elecció l'atzar d'un o mes haplotips mutants no reconeguts per l'amiRNA, d'entre els molts al·lells presents en la població viral. Tanmateix, quan la població viral evoluciona mitjançant passes seriats en plantes de la línia 10-4, la freqüència de al·lells potencialment capaços de trencar la resistència induïda per l'amiR159-HC-Pro es molt major, el que explica que el trencament ocorrega mes ràpidament. En este cas, la població viral s'encontra en un equilibri entre mutació, deriva genètica y selecció.

Les infeccions mixtes en las que dos o mes virus pertanyents a especies distintes coinfecten una mateixa planta hoste son molt freqüents en la natura. A més a més, en este tipus d'infeccions solen ocórrer efectes sinèrgics entre els virus, per el que se va plantejar la pregunta de si les infeccions mixtes pogueren facilitar el trencament de la resistència mediata per amiRNAs. Per a respondre esta pregunta el TuMV es va coinocular en plantes d'*A. thaliana* resistents de la línia 12-4 amb una sèrie de virus pertanyents a diferents grups taxonòmics. Les plantes també es preinfectaren amb diferents virus i, a continuació, s'inocularen amb el TuMV.

L'anàlisi de les plantes inoculades va mostrar que, efectivament, les infeccions mixtes poden ser un altra causa de trencament de la resistència mediata per amiRNAs, encara que este efecte depèn del virus acompanyant. El virus del cascavell del tabac, el virus del mosaic de la florícola i, notablement, el virus del mosaic del cogombre ajuden al TuMV a vèncer la resistència imposada per l'amiRNA, encara que sols quan s'entren infectant la planta que es inoculada amb el TuMV.

SUMMARY

Positive (+) strand RNA viruses comprise the most numerous and diverse group of plant viral pathogens. They replicate its genome by synthesizing replicative intermediates of complementary polarity (–) that serve as a template for the production of viral genomic RNAs. Two opposed theoretical models that explain replication of an RNA virus are geometric amplification, where both + and – RNA strands serve as a template for the symmetric synthesis of complementary strands with the same efficiency, and stamping machine, where the – polarity strands are preferably used in a reiterative way as a template for the synthesis of multiple copies of the genomic + RNA. The geometric amplification allows a more rapid expansion of the virus than the stamping machine mechanism but with the drawback of a higher frequency of genetic mutations in the viral progeny. To distinguish between the two models of genomic amplification in case of a typical plant RNA virus, we quantified the accumulation of + and – of strands of *Turnip mosaic virus* (TuMV; genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*) during a cycle of intracellular infection in *Nicotiana benthamiana* protoplasts. The analysis of the accumulation dynamics of both strands allowed determining that TuMV uses a mixed replication strategy in which geometric amplification contributes by 7% and stamping machine by 93%. Most likely, this combination has evolved to –maintaining certain speed in the replication of the virus– modulate the mutation frequency in its progeny.

A promising strategy has been recently developed to generate virus resistant plants, based on the expression of artificial microRNAs (amiRNAs) directed against specific viral sequences. However, viral populations adapt to the presence of amiRNAs by mutations in the target sequences, managing to break the resistance. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants (transgenic line 12-4) efficiently expressing an amiRNA (amiR159-HC-Pro) targeting a sequence in the cistron coding for TuMV HC-Pro are resistant to infection by a particular clone of this virus. However, the transgenic line 10-4, which expresses sub-inhibitory amounts of the amiRNA, is only partially resistant. To understand how plant viruses break the resistance imposed by the amiRNAs, viral populations evolved in wild type *A. thaliana* plants

as well as in the partially resistant 10-4 plants, which are finally able of breaking the resistance in the highly resistant 12-4 line, have been characterized by ultra-deep sequencing of the amiR159-HC-Pro target region. Thus, it has been determined that the viral population evolved in wild type plants contains mutant alleles potentially able to break the resistance from the first evolutionary passage, although at very low frequencies. Also, the viral population contains haplotypes with mutations in all positions of the amiRNA 21 nucleotide target. Finally, along the serial evolutionary passages from plant to plant, no increase in the frequency of the mutant alleles occurs. Apparently, the viral population is at equilibrium between mutation and genetic drift. The resistance breaking process in the 12-4 plants seems the result from a random selection of one or more mutant haplotypes not recognized by the amiRNA, among many alleles present in the viral population. However, when the viral population evolves through serial passages in plants of line 10-4, the frequency of alleles potentially able of breaking the resistance induced by the amiR159-HC-Pro is much higher, which explains that resistance breakdown occurs more quickly. In this case, the viral population is in equilibrium between mutation, genetic drift and selection.

Mixed infections in which two or more viruses belonging to different species co-infect the same host plant are very common in nature. Furthermore, these infections usually produce synergistic effects between viruses, so the question arises whether mixed infections could facilitate breaking the resistance mediated by the amiRNA. To answer this question, TuMV was co-inoculated in *A. thaliana* resistant plants from line 12-4 with a series of viruses belonging to different taxonomic groups. Plants were also pre-infected with the different viruses and, next, inoculated with TuMV. The analysis of the inoculated plants showed that mixed infections can be another cause of breaking the resistance mediated by amiRNAs, although this effect depends on the companion virus. *Tobacco rattle virus*, *Cauliflower mosaic virus* and, notably, *Cucumber mosaic virus* help TuMV to overcome the resistance imposed by the amiRNA, but only when they are infecting the plant that is inoculated with TuMV.

ABREVIATURAS

AGO: *argonaute (family protein)*, familia de las proteínas Argonauta.

amiRNA: *artificial micro RNA*, micro RNA artificial.

CaMV: *Cauliflower mosaic virus*, virus del mosaico de la coliflor.

CI: *cylindrical inclusion bodies*, cuerpos cilíndricos de inclusión.

CMV: *Cucumber mosaic virus*, virus del mosaico del pepino.

CP: *coat protein*, proteína de cubierta o de la cápside.

DCL: *dicer-like RNase III*, RNAsa de tipo III dicer-like.

DdDp: *DNA-dependent DNA polymerase*, DNA polimerasa dependiente de DNA.

DdRp: *DNA-dependent RNA dependent*, RNA polimerasa dependiente de DNA.

DNA: *deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico.

dpi: *days post-inoculation*, días post-inoculación.

dsDNA: *double stranded DNA*, DNA de doble cadena.

dsRNA: *double stranded RNA*, RNA de doble cadena.

HC-Pro: *viral helper-component protease*, componente ayudante proteasa viral.

kb: kilobase.

LMV: *Lettuce mosaic virus*, virus del mosaico de la lechuga.

miRNA: *micro RNA*, micro RNA.

MP: *movement protein*, proteína de movimiento.

mRNA: *messenger RNA*, RNA mensajero.

NIa: *nuclear inclusion body a*, cuerpo de inclusión nuclear a.

NIaPro: *nuclear inclusion body a protease*, proteasa del cuerpo de inclusión nuclear a.

NIb: *nuclear inclusion body b*, cuerpo de inclusión nuclear b.

nt: nucleótido.

PIPO: *Pretty Interesting Potyviridae ORF*.

PPV: *Plum pox virus*, virus de la sharka de los frutales de hueso.

PVA: *Potato virus A*, virus A de la patata.

PVX: *Potato virus X*, virus X de la patata.

PVY: *Potato virus Y*, virus Y de la patata.

PTGS: *post-transcriptional gene silencing*, silenciamiento génico postranscripcional.

RdDp: *RNA-dependent DNA polymerase*, DNA polimerasa RNA dependiente de RNA.

RDR: *cellular RNA-dependent RNA polymerase (family protein)*, familia de proteínas RNA polimerasa dependiente de RNA celular.

RdRp: *RNA-dependent RNA polymerase*, RNA polimerasa dependiente de RNA.

RISC: *RNA-induced silencing complex*, complejo de silenciamiento inducido por RNA.

RNA: *ribonucleic acid*, ácido ribonucleico.

siRNA: *small interfering RNA*, pequeño RNA interferente.

SMV: *Soybean mosaic virus*, virus del mosaico de la soja.

sRNA: *small RNA*, RNA pequeño.

ssDNA: *simple-stranded DNA*, DNA de simple cadena.

ssRNA: *single stranded RNA*, RNA de simple cadena.

ssRNA+: *positive sense single stranded RNA*, RNA de simple cadena de polaridad positiva.

ssRNA-: negative sense *single stranded RNA*, RNA de simple cadena de polaridad negativa.

TEV: *Tobacco etch virus*, virus del grabado del tabaco.

TMV: *Tobacco mosaic virus*, virus del mosaico del tabaco.

TRV: *Tobacco rattle virus*, virus del cascabeleo del tabaco.

TuMV: *Turnip mosaic virus*, virus del mosaico del nabo.

TVMV: *Tobacco vein mottling virus*, virus del moteado de las venas del tabaco.

TYMV: *Turnip yellow mosaic virus*, virus del mosaico amarillo del nabo.

vsRNA: viral small interfering RNA, pequeño RNA interferente viral.

VSR: viral suppressor of RNA silencing protein, proteínas virales supresoras del silenciamiento por RNA.

VPg: *virus protein genome-linked*, proteína de unión al genoma viral.

ZYMV: *Zucchini yellow mosaic virus*, virus del mosaico amarillo del calabacín.

INTRODUCCIÓN





1. Los virus.

1.1. Definición y clasificación de los virus.

Los virus se consideran patógenos intracelulares, organismos biológicos únicos, que pueden definirse como el conjunto de una o más moléculas de ácidos nucleicos, normalmente encapsidadas dentro de una cubierta o cubiertas de protección de proteínas o lipoproteínas, capaces de replicarse únicamente en el interior de la célula huésped. Esta partícula viral infecciosa o virión, a veces define al virus pero no son más que los elementos constitutivos individuales virales portadores de la información genética. Los virus son un “biosistema” que se caracteriza por adquirir diversas formas durante su ciclo infeccioso. En las células huésped generan factorías virales, subvierten la maquinaria metabólica en su propio beneficio y el virus pasa a adquirir una apariencia de “célula”, aquí tiene lugar la replicación de sus genomas y “enciende” la expresión de sus genes, contrataca los sistemas defensivos e incluso “apaga” la expresión génica de célula huésped (Forterre, 2010). Los genomas virales han evolucionado como una combinación de genes que codifican proteínas virales con una serie limitada de actividades catalíticas pero con la capacidad de interactuar con ciertos factores celulares para llevar a cabo el ciclo viral. Constan de dos módulos, uno que incluye los genes esenciales para la replicación y expresión génica, conservados entre los diferentes tipos de virus, y el módulo de interacción, compuesto por genes implicados en la interacción con el huésped, que difieren entre virus de eucariotas animales, plantas, arqueas o bacterias. Los virus se caracterizan por no codificar sus propios ribosomas por lo que se les considera parásitos de la maquinaria de traducción del huésped para llevar a cabo la expresión de sus genomas. Los virus son los organismos más abundantes y diversos del planeta (Edwards y Rohwer, 2005), capaces de infectar organismos de los tres dominios de la vida. En términos de diversidad genética, el pangenoma viral es probablemente más complejo que el de organismos celulares (Kristensen *et al.*, 2010). Los virus según la naturaleza de su material genético se agrupan en: virus de RNA, virus de DNA y retrovirus. Los virus de RNA presentan genomas, un ciclo replicativo y de expresión génica basados en RNA, los virus de DNA poseen genomas de DNA y su

expresión génica ocurre a través de un RNA mensajero (mRNA) transcrito similar a los organismos celulares. Los retrovirus poseen fases de DNA y RNA en sus ciclos replicativos. Los virus muestran una gran diversidad en tamaño y forma (Fauquet *et al.*, 2005). Atendiendo a la naturaleza de sus genomas se clasifican en virus de:

- 1.- RNA de simple cadena y polaridad positiva (ssRNA+)
- 2.- RNA de simple cadena y polaridad negativa (ssRNA-)
- 3.- RNA de doble cadena (dsRNA)
- 4.- DNA de simple cadena (ssDNA)
- 5.- DNA de doble cadena (dsDNA)

Dependiendo del tipo de ácido nucleico que compone su genoma, los virus seguirán distintos pasos para su replicación. En los virus de ssRNA+ el genoma es directamente el mRNA empleado en la traducción de las proteínas virales que se encargarán de replicar el RNA viral. A su vez, sirve de molde para la síntesis de la hebra complementaria de polaridad negativa, un proceso catalizado por la propia RNA polimerasa RNA dependiente viral (*RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp). A partir de las hebras complementarias se generarán nuevas hebras positivas, que forman la progenie viral. En los virus de ssRNA- se sintetiza previamente la hebra de polaridad positiva como intermediario que sirve, por un lado, como mRNA para la traducción de proteínas virales y por otro como molde para la producción de nuevas moléculas de RNA con polaridad negativa que constituyen el genoma de la progenie. Para sintetizar el RNA de polaridad positiva se utiliza la RdRp viral que está contenida en el propio virión. En los virus de dsRNA el virión también contiene la RdRp encargada de la síntesis de RNAs genómicos de doble cadena, así como los mRNAs. En los virus de ssDNA, una DNA polimerasa DNA dependiente (*DNA-dependent DNA polymerase*, DdDp) de la célula huésped se encarga de sintetizar el DNA viral de cadena simple a doble cadena. También una RNA polimerasa DNA dependiente (*DNA-dependent RNA polymerase*, DdRp) del huésped genera los mRNAs virales, y a su vez, los dsDNAs sirven como molde para la síntesis de

nuevas moléculas de ssDNA que constituyen el genoma de la progenie. Por último, en el caso de los virus de dsDNA se han de sintetizar los mRNAs, normalmente mediante una DdRp de la célula huésped, que se dirigen para la traducción de proteínas virales. La replicación de los virus de dsDNA es catalizada habitualmente por una DpDd del huésped, aunque existen casos en que la maquinaria de replicación es codificada enteramente por el virus. En el caso de virus de plantas, algunos de los mRNAs virales actúan como intermediarios replicativos, sirviendo para la síntesis de nuevas moléculas de dsDNA, un proceso de retrotranscripción asistido por una DNA polimerasa RNA dependiente (*RNA-dependent DNA polymerase*, RdDp) codificada por el propio virus. Entre la diversidad de genomas virales, también se han descritos virus de RNA que presentan en alguno de sus genomas RNAs con ambas polaridades o ambisentido, como es el caso de los virus del género *Tospovirus*.

Debido a la gran diversidad de virus es obvia la necesidad de contar con un sistema universal de clasificación. En la actualidad el Comité Internacional para la Taxonomía Viral o ICTV reconoce más de 1000 especies de virus de plantas (751 definitivas y 286 provisionales), agrupadas en 17 familias y 80 géneros (Fig. 1). La mayoría de ellos, hasta un 80%, presentan genomas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva (Hull 2002). Los virus ssRNA⁺ se pueden clasificar en tres superfamilias dependiendo de la similitud que muestran sus correspondientes RdRps: supergrupo I (tipo picornavirus), supergrupo II (tipo carmovirus) y supergrupo III (tipo alfavirus) (Koonin y Dolja, 1993). El estudio realizado en la presente Tesis se enfoca en particular en el virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) del género *Potyvirus* de la familia *Potyviridae*, superfamilia picornavirus.

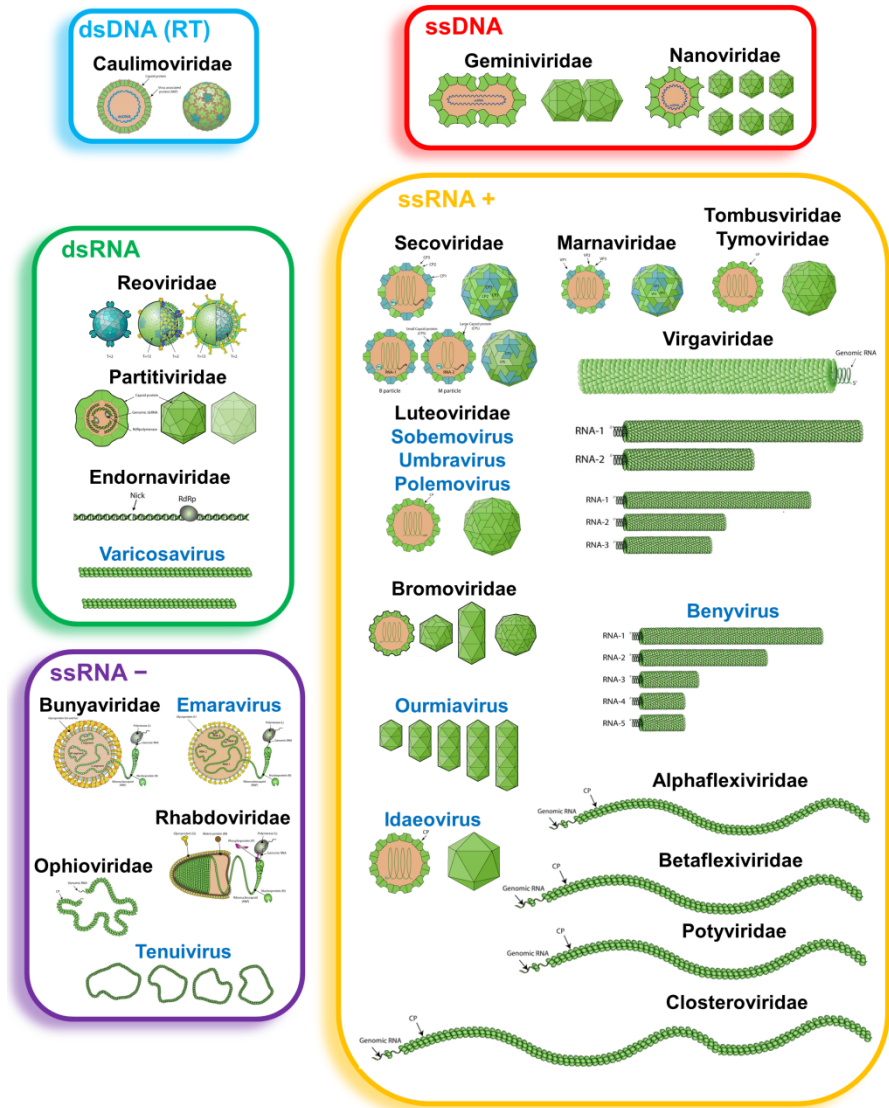


Figura 1. Esquema representativo de la clasificación en familias y géneros de los virus de plantas. Ilustraciones extraídas de Viralzone, ExpASY Bioinformatics Resource Portal. van Regenmortel *et al.*, (2000).

1.2. Ciclo infeccioso de los virus de plantas.

La gran variabilidad de tipos de virus de plantas propicia diferentes mecanismos durante su ciclo de vida, pero a grandes rasgos su ciclo infeccioso consta de los siguientes pasos (Fig. 2):

- 1) Entrada a la célula huésped. Dado que los virus vegetales son parásitos biotróficos obligados, su ciclo vital comienza con la penetración en el interior de la célula. Como no poseen mecanismos propios que les permitan atravesar la pared y la epidermis vegetal, precisan de heridas causadas por daños físicos, por acción de vectores como insectos, ácaros, nematodos y ciertos hongos presentes en el suelo.
- 2) Desencapsidación, el primer paso consiste en que el genoma viral quede descubierto de la cápside o cubierta viral.
- 3) Traducción de las proteínas virales. La mayoría de virus de RNA encuentran en el citoplasma su “hábitat” para replicar sus genomas y utilizar la maquinaria proteica del huésped para la traducción de sus RNAs virales, en las distintas proteínas virales, entre ellas la replicasa. En el caso de los virus de DNA, éstos alcanzan el núcleo para generar mRNA virales a través de las RNA polimerasas del huésped.
- 4) Replicación, que permite obtener gran cantidad de copias del genoma viral. En los virus de RNA normalmente transcurre en el citoplasma. En el caso de los de ssDNA tiene lugar en el núcleo, catalizada por una DdDp. Los virus de dsDNA poseen una fase nuclear y otra citoplasmática en la que se generan nuevos genomas dsDNA a partir del mRNA viral mediante una retrotranscripción mediada, por una RdDp viral.
- 5) Ensamblaje y encapsidación de la progenie viral, donde las proteínas de cubierta (*coat proteins*, CP) reconocen el genoma viral y se ensamblan nuevas partículas virales. Las cubiertas proteicas de los virus vegetales se ensamblan siguiendo uno de dos tipos fundamentales de simetría. El primer tipo de virión es helicoidal o casi elongado. Hay dos variantes de virus elongados: los bastones rígidos y los

filamentos flexuosos. El segundo tipo de partícula viral es icosaédrica o casi esférica; las variantes de esta forma básica incluyen a los viriones baciliformes y los viriones gemelos compuestos por la unión de dos icosaedros incompletos.

6) Movimiento viral, a corta distancia comprende el movimiento intracelular dentro de la célula infectada desde los complejos de replicación hasta la periferia de la célula. Este movimiento está finamente regulado por estructuras como redes del citoesqueleto y sistemas de endomembranas (Ueki y Citovsky, 2011). Se propaga dentro de la planta moviéndose célula a célula a través de los plasmodesmos, complejos microcanales que atraviesan la pared celular estableciendo un continuo de citoplasma y endomembranas (Lucas *et al.*, 2009). Este movimiento está mediado por factores codificados por el propio virus, llamadas proteínas de movimiento (*movement proteins*, MP) que modifican estos canales de transporte intercelular. Los mecanismos de movimiento a larga distancia menos conocidos, el virus suele ingresar en el tejido vascular a través de los tubos cribosos del floema alcanzando zonas distales. Se conocen pocos virus capaces de moverse a largas distancias por el xilema, únicamente algunas especies del género *Sobemovirus* (Opalka *et al.*, 1998; Verchot *et al.*, 2001). La infección sistémica de la planta ocurre cuando el virus es capaz de moverse desde focos de infección primarios para invadir regiones distales del huésped (Lucas y Gilbertson, 1994; Carrington *et al.*, 1996).

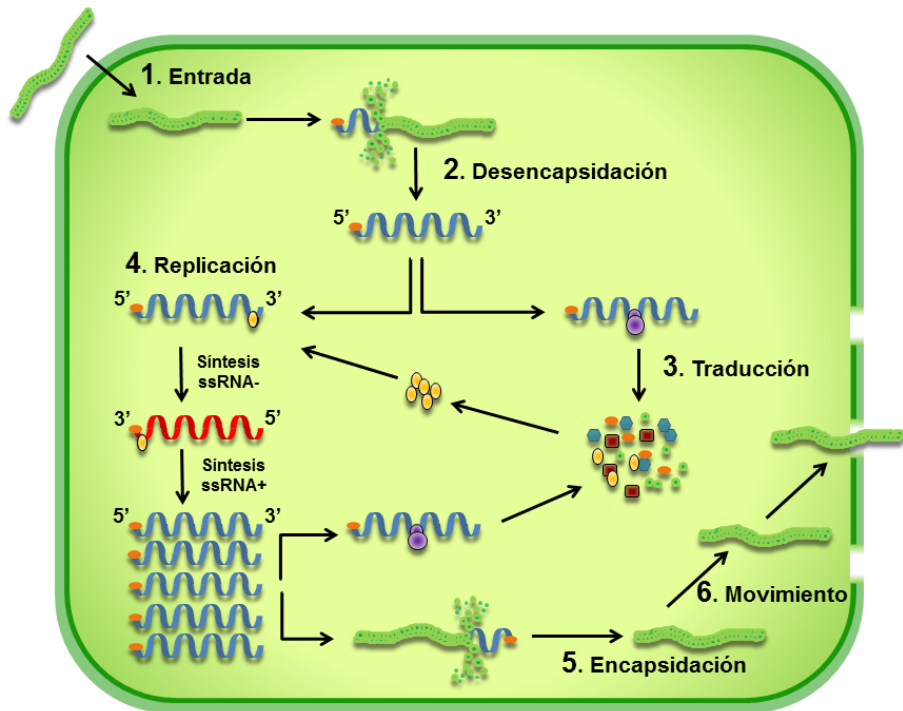


Figura 2. Representación esquemática del modelo no estructurado del ciclo infeccioso de un virus ssRNA+ del género *Potyvirus* en la célula vegetal.

Los virus de plantas constituyen una seria amenaza para numerosos cultivos, considerándose la segunda patología vegetal en importancia después de los hongos por las pérdidas que ocasionan en la agricultura. Aunque las infecciones ocasionadas por estos patógenos pueden ser asintomáticas, en la mayoría de casos descritos, la presencia del virus tiene un importante impacto negativo sobre el desarrollo normal de la planta infectada. La sintomatología típica se caracteriza por la aparición de clorosis o necrosis en los tejidos infectados, además de enanismo, deformaciones foliares, marchitamiento... Todo esto se traduce en una disminución considerable de la calidad de los cultivos. Las formas de transmisión son múltiples: por material vivo, pues permanecen en semillas, polen y tejidos que pueden ser propagados de generación en generación. Por transmisión mecánica a través de distintas prácticas agrícolas y ampliamente utilizado para generar infecciones experimentales. También transmisión por vectores tales como bacterias, artrópodos, hongos y nematodos.

Entre ellos los áfidos y las moscas blancas tienen la capacidad de transmitir el mayor número de especies de virus de plantas.

Parte de la Virología se ha focalizado en la comprensión de la interacción virus-planta para diseñar herramientas y estrategias antivirales efectivas para combatir la incidencia de estos patógenos. Tradicionalmente estos estudios han estado enfocados a especies concretas de virus y sus ciclos biológicos. En la actualidad sabemos que la patogénesis viral es una interacción extremadamente más compleja donde también juega un papel importante las interacciones virus-virus, al encontrar como tónica general que las infecciones mixtas son el hecho más frecuente y no la excepción en la naturaleza (Hunter *et al.*, 2002; Untiveros *et al.*, 2007). Por infección mixta se conoce cuando una misma planta se encuentra infectada por dos o más virus, y se puede distinguir entre coinfecciones y superinfecciones. En las coinfecciones dos o más virus invaden al huésped simultáneamente o en un intervalo de tiempo relativamente corto. En las superinfecciones los virus infectan al huésped en intervalos de tiempo diferentes. Frecuentemente suelen ir acompañadas de variaciones inapreciables en el desarrollo de los síntomas, en la infectividad, acumulación y transmisión viral. El conocimiento de las interacciones virus-virus durante este tipo de infecciones es fundamental en el desarrollo de estrategias antivirales, porque el transcurso de la éxito de la infección no solo depende de la adaptación de un virus concreto a su huésped sino también de la influencia que ejerza el virus acompañante (Miralles *et al.*, 2001). Cuando dos o más virus de plantas colonizan el mismo huésped generalmente se establecen dos tipos de interacciones entre sí:

1) Sinérgicas. El término sinergia hace referencia a que en estas infecciones mixtas se intensifican la severidad de los síntomas en la planta huésped y aumenta la replicación de uno o ambos virus, comparado con sus infecciones simples. Se ha observado que este tipo de interacción entre virus de plantas permite romper resistencias naturales del huésped ampliándose el rango de huésped que tendrían estos virus en infecciones simples y modificándose la eficiencia de transmisión (Guerini y Murphy, 1999; Hammond *et al.*, 1999; García-Cano *et al.*, 2006;

Wintermantel *et al.*, 2008). Otra relación de sinergia suele ocurrir entre virus que poseen dependencia uno del otro en alguna fase de su ciclo viral (Rao *et al.*, 1998; Syller, 2003; Ryang *et al.*, 2004).

2) Antagónica. En este caso la replicación de alguno de los virus se ve disminuida por la presencia de otro virus acompañante porque ambos virus son competidores. Esta interferencia entre virus en muchos casos puede llevar a la exclusión viral, que ocurre cuando la preinfección de las plantas por un virus imposibilita infecciones posteriores de un segundo virus. Este fenómeno también es conocido como protección cruzada. Se ha empleado como estrategia de control de virus muy virulentos en plantas de cultivos de interés con aislados de virus atenuados (Zaitlin y Palukaitis, 2000; Kokkinos y Clark, 2006; Martín y Elena, 2009; Ziebell y Carr, 2010; Folimonova, 2012). Otro tipo de interacción antagónica es conocida por exclusión viral mutua en la que ambos virus coinfectan la plantas, pero no transitan las por las mismas células, existiendo una separación espacial dentro del huésped entre ambas infecciones virales (Dietrich y Maiss, 2003; Takahashi *et al.*, 2007; González-Jara *et al.*, 2013).

1.3. Género *Potyvirus*.

Para poder diseñar estrategias de control eficientes para prevenir, proteger o minimizar las infecciones virales es fundamental el conocimiento de la biología molecular de los virus de plantas, comprender su ciclo infeccioso y las enfermedades que ocasionan. Los estudios de la biología molecular de virus de plantas se focalizan principalmente en las funciones de las proteínas virales, así como en la regulación de sus genomas; en las interacciones que establecen con su huésped y en los mecanismos mediante los cuales estos patógenos consiguen adaptarse a diferentes ambientes. La familia *Potyviridae* incluye aproximadamente el 30% de las especies conocidas de virus de plantas, y está compuesta de 8 géneros: *Potyvirus*, *Macluravirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Tritimovirus*, *Rymovirus*, *Poacevirus* y *Brambyvirus*. El género *Potyvirus* debe su nombre a su especie tipo, el virus Y de la patata (*Potato Y virus*, PYV), e incluye alrededor de 180 especies de

virus que infectan una amplia gama de plantas de diversas regiones climáticas, en las que provocan pérdidas significativas en la calidad y una reducción de la producción en cultivos hortícolas, ornamentales y pastos. Entre ellos se encuentran muchos virus de importante interés agronómico: el virus de la sharka (*Plum pox virus*, PPV), el virus del mosaico de la soja (*Soybean mosaic virus*, SMV), el virus del grabado del tabaco (*Tobacco etch virus*, TEV), el virus del moteado de las venas del tabaco (*Tobacco vein mottling virus*, TVMV) y TuMV (Shukla *et al.*, 1994; Koonin *et al.*, 2008). Los potyvirus, género al que pertenece TuMV, se replican en el citoplasma de la célula huésped encapsidándose en un virión filamentoso y flexuoso, no segmentado, con unas dimensiones de 680-900 nm de longitud por 11-15 nm de diámetro. El virión está compuesto por el genoma viral de RNA, unido en su extremo 5' a la proteína VPg (*virus protein genome-linked*) y con una cola poli(A) en el extremo 3', envuelto por aproximadamente 2000 copias de la CP. Además, la CP forma un complejo con la proteína HC-Pro (*helper-component protease*) que interviene en unir los viriones al estilete de los áfidos durante su transmisión (Blanc *et al.*, 1997; Blanc *et al.*, 1998). El genoma de los potyvirus consiste en una hebra simple de RNA de sentido positivo, aproximadamente de 10.000 nucleótidos (nt) que incluye un largo marco de lectura abierto que codifica una poliproteína que, cuando se traduce, es procesada por tres proteasas virales en al menos diez proteínas maduras: P1, HC-Pro, P3, 6K1, inclusión cilíndrica (CI), 6K2, inclusión nuclear a (NIa, una poliproteína que a su vez se procesa para generar VPg y NIaPro), inclusión nuclear b (NIb) y CP (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Además, la proteína P3N-PIPO se produce a través de un cambio de marco de lectura en el cistron P3 (Chung *et al.*, 2008).

A las distintas proteínas potyvirales se les han atribuido funciones importantes durante el ciclo infeccioso (Urcuqui-Inchima *et al.* 2001). HC-Pro es una cisteín proteasa que se autocorta de la poliproteína viral y suprime el silenciamiento génico mediado por RNA (Kasschau y Carrington, 1998). También está implicada en la transmisión de viriones por áfidos (Guo *et al.*, 2011). P3N-PIPO y CI desempeñan su función en el movimiento célula-célula del virus (Wei *et al.*, 2010b). 6K2 ancla el

complejo de replicación viral a las membranas intracelulares (Schaad *et al.*, 1997). VPg actúa como cebador durante la síntesis de RNA viral (Puustinen y Mäkinen, 2004) y está implicada en la traducción del virus (Eskelin *et al.*, 2011). NIaPro es una serín proteasa que actúa tanto en *cis* como en *trans* y escinde la mayoría de proteínas de la poliproteína potyviral (Carrington y Dougherty, 1987). Además NIa está implicada en la replicación del virus (Daròs *et al.*, 1999). NIB es la RNA polimerasa dependiente de RNA viral (Hong y Hunt, 1996) y CP funciona durante el ensamblaje del virión, la transmisión por áfidos (López-Moya *et al.*, 1999), y el movimiento viral (Dolja *et al.*, 1995).

Durante el ciclo infeccioso de virus de ssRNA⁺ se generan importantes alteraciones en las endomembranas de la célula para alcanzar con éxito la replicación y movimiento viral (den Boon *et al.*, 2010). Los potyvirus aíslan sus complejos de replicación del citosol mediante reorganizaciones membranosas. Se ha observado como la poliproteína 6K2-VPg-NIaPro es responsable de inducir la proliferación de vesículas, en el retículo endoplásmico (ER). Estas vesículas, llamadas vesículas 6K se desplazan a través de microfilamentos de actina hasta alcanzar la membrana de los cloroplastos donde suelen instalarse, formando una conglomeración de estos orgánulos celulares junto el aparato de Golgi en agregados membranosos que genera unas estructuras globulares perinucleares en la célula vegetal (Grangeon *et al.*, 2012b). Se sugiere que estas vesículas contienen las factorías víricas, pues se localiza además de 6K2 y NIa, CI (ATPasa y RNA helicasa) y la RNA polimerasa dependiente de RNA viral NIB, así como factores celulares; los componentes necesarios en el proceso (Cotton *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010a; Grangeon *et al.*, 2012a). Estos compartimentos similares a orgánulos virales propician un entorno más eficiente para la amplificación del RNA viral y sirven como protección frente a los mecanismos de defensa de la célula huésped (Fig. 3). Tanto la traducción como encapsidación son otros procesos del ciclo infeccioso que podrían tener lugar en estos compartimentos virales. Estas vesículas 6K virales también se ha descrito que se desplazan a través de microfilamentos hacia la membrana plasmática, alcanzando los plasmodesmos, por lo que también pueden

estar implicadas en la transmisión de los virus a células vecinas (Fig. 3). En el movimiento intracelular del virus hacia los plasmodesmos participan principalmente la proteína CI junto con P3N-PIPO (Gómez de Cedrón *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2010b). El transporte célula a célula está mediado por P3N-PIPO (Vijayapalani *et al.*, 2012) junto con HC-Pro y CP, que además de encapsidar al RNA genómico viral desempeña la función de aumentar el tamaño de exclusión del plasmodesmo (Rojas *et al.*, 1997). El genoma de los potyvirus carece en su extremo 5' de la estructura de caperuza (*cap*) a diferencia del RNA mensajero celular, pero presenta unida covalentemente la proteína VPg y además una entrada interna de ribosomas (*internal ribosome entry site*, IRES) en la región 5' no traducible (*5'-untranslated region*, 5'UTR). Todo ello permite la unión a factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E, para facilitar la entrada de eIF4G que permite el reclutamiento de subunidades 40S del ribosoma e iniciar la traducción (Carrington y Freed, 1990; Gallie, 2001; Gallie y Browning, 2001; Zeenko y Gallie, 2005).

El principal supresor del silenciamiento de los potyvirus es la proteína HC-Pro. Mutaciones que eliminan su función supresora causan la inviabilidad del virus para replicarse e infectar sistémicamente la planta (Kasschau *et al.*, 1997; Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 2001; Torres-Barceló *et al.*, 2008). Fundamentalmente se ha descrito que HC-Pro secuestra siRNAs inhibiendo su ensamblaje en el complejo de silenciamiento por RNA (*RNA-induced silencing complex*, RISC) (Lakatos *et al.*, 2006) y elimina la metilación de los siRNAs (Mallory *et al.*, 2001). También se ha encontrado que interactúa con el proteasoma 20S inhibiendo su actividad (Jin *et al.*, 2007; Sahana *et al.*, 2012). Esta misma proteína, entre otras funciones, también juega un papel importante para la transmisión de los potyvirus por áfidos (Atreya y Pirone, 1993).

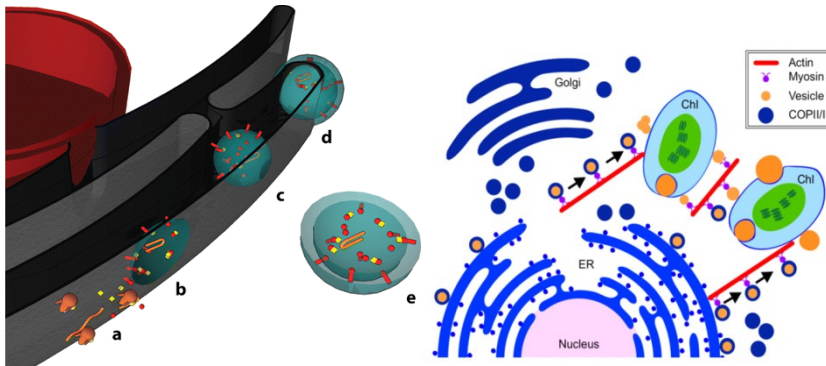


Figura 3. (A) Modelo de la biogénesis de vesículas inducidas por virus. La gran esfera de color rojo y la estructura gris representan el núcleo y el retículo endoplasmático (ER), respectivamente. En azul parcialmente transparente, se muestran las vesículas inducidas por virus. Las cintas anaranjadas y las pequeñas esferas rojas representan RNAs y proteínas virales, respectivamente. Las proteínas del huésped se muestran por los cubos de color amarillo, y las estructuras marrones representan los ribosomas. (a) Después de la liberación del RNA genómico viral en el citoplasma tras la desencapsidación, en los ribosomas asociados al ER tiene lugar la producción de proteínas virales. (b) Durante la traducción del RNA viral, las proteínas virales se dirigen hacia la membrana exterior del ER, acumulándose en parches y provocando una curvatura de la membrana. (c) La curvatura de la membrana aumenta con la acumulación de los componentes de replicación, lo que conduce finalmente a la formación de vesículas con una sola membrana dentro del orgánulo, que pueden o no tener conexión con el exterior a modo de poros. (d) Para algunos virus, la vesícula dentro del lumen adquiere una segunda membrana por gemación. Y (e) ésta se separa del ER. Tomado de Laliberté y Sanfaçon, 2010. (B) Modelo de la generación de vesículas 6K inducidas por los potyvirus, y localización en células vegetales. Las proteínas 6K se acumulan en los sitios de salida de la membrana del ER (*endoplasmic reticulum exit sites*, ERES) y se transportan hacia el aparato de Golgi por la vía secretora mediado por COPII (*coat protein complex II*). Las vesículas se mueven a lo largo de filamentos de actina y alcanzan la membrana de los cloroplastos donde tiene lugar la replicación viral. Tomado de Wei et al 2010a.

2. Características evolutivas de los virus.

2.1. Particularidades evolutivas de los virus de RNA.

Para los virus también puede ser aplicado el concepto de especie, pues poseen material genético, se replican y pueden evolucionar porque las poblaciones virales están sujetas a las principales fuerza de cambio evolutivo como la mutación, la selección natural y la deriva genética. Por lo tanto, los virus pueden especializarse, adaptándose y ocupando nuevos ambientes específicos. Más aun, los virus presentan

una gran capacidad evolutiva que propicia el peculiar fenómeno de aparición o emergencia de nuevos virus, siendo ejemplos recientes el virus del torrado del tomate (*Tomato torrado virus*, ToTV) o el virus del mosaico del pepino (*Pepino mosaic virus*, PepMV) (Gómez *et al.*, 2012). El conocimiento de las características evolutivas de los virus que contribuyen a su éxito como patógenos emergentes capaces de desafiar terapias antivirales es fundamental para el desarrollo de las mismas (Domingo, 2010). La rápida evolución que experimentan los virus de RNA se debe en gran medida a sus genomas compactos, rápidos mecanismos de replicación, elevadas tasas de mutación y recombinación y enormes tamaños poblacionales, todo lo cual genera una gran variabilidad genética. Con el fin de adquirir conocimientos básicos sobre procesos evolutivos, los virus de RNA de plantas se consideran excelentes modelos experimentales. Por un lado, las escalas temporales son pequeñas debido a los cortos tiempos de generación de las poblaciones virales, comparado con organismos pluricelulares; y por otro lado, permiten experimentar con el huésped real, a diferencia de las líneas celulares en cultivo que se emplean comúnmente en estudios con virus animales. También resuelven otras dificultades como las limitaciones éticas que conllevan los huéspedes de los virus de animales (Elena *et al.*, 2008).

2.2. Eficacia biológica viral.

Eficacia biológica (*fitness*) se define como la capacidad reproductiva de un individuo relativa a sus competidores en un determinado ambiente. La eficacia biológica viral hace referencia al grado en que la progenie viral procedente de un genotipo concreto, es viable y capaz de replicarse y contribuir a una nueva generación. En ambientes constantes, la selección actúa optimizando la eficacia biológica, donde nuevas mutaciones no son fijadas en la población debido a la fuerte presión de la selección en su contra. Solo alelos mutantes en la población viral con una mayor eficacia biológica comparada con la del virus silvestre, acabarán siendo fijados en la población. Con frecuencia a las poblaciones virales se les denomina cuasiespecies, adoptando el término añadido por M. Eigen (Eigen, 1971) en su teoría de los primeros replicadores moleculares. La teoría de las cuasiespecies,

controvertida y ampliamente revisada, predice que un aislado viral no está formado por una secuencia única, sino por un conjunto de secuencias mutantes junto con una más abundante, y la eficacia biológica del virus depende del conjunto por lo que la selección natural actúa sobre la cuasiespecie en su conjunto y no sobre los genomas individuales (Domingo y Holland, 1997; Holmes y Moya, 2002). A pesar de las altas tasas de mutación, las poblaciones de virus de RNA de plantas muestran una significativa estabilidad genética; hay muy pocos cambios en las poblaciones virales entre aislados y con el tiempo (García-Arenal *et al.*, 2001; Marco y Aranda, 2005). Pero los virus raramente experimentan una situación ambiental estática. Se encuentran en ambientes cambiantes, haciendo que la variación genética sea crucial para permitirles vencer mecanismos de defensa del huésped, genes de resistencia y diferentes tratamientos antivirales, ocurriendo el fenómeno de emergencia viral (McDonald y Linde, 2002; Holmes, 2009). También es manifiesto el hecho de que la escasa variabilidad poblacional de un virus en su huésped natural, se transforma en una rápida capacidad evolutiva en uno nuevo (Novella *et al.*, 1999). La adaptación requiere de la existencia de mutaciones favorables que se escapen del efecto aleatorio de la deriva genética asociada a eventos de transmisión entre plantas (Elena y Sanjuán, 2005a).

2.3. Tamaño del genoma.

Los genomas virales se encuentran restringidos en su tamaño. Una peculiaridad es que los virus de RNA suelen presentar un tamaño más limitado, que pueden llegar a ser ~3 órdenes de magnitud menor que el tamaño del genoma de un virus de DNA. Una posible explicación es la fragilidad y tendencia a la rotura de largas moléculas de RNA (Canns, 2005). En el caso particular de virus de plantas, el mecanismo de propagación célula a célula a través de los plasmodesmos también podría contribuir a limitar el tamaño del genoma viral (Roossinck, 2008). Pero otra posibilidad es que se deba a una restricción evolutiva. La conocida como ley de Drake (Drake *et al.*, 1998) postula la existencia de una correlación negativa entre la tasa de mutación y el tamaño de los genomas virales: a mayor tamaño genómico, las tasas de mutación por sitio han de ser menores para evitar que los genomas acumulen un excesivo número

de mutaciones, en su mayoría de efectos deletéreos. Así, las tasas de mutación más altas se darán en virus con tamaños pequeños (Drake *et al.*, 1998; Gago *et al.*, 2009). En comparación, los virus dsDNA se replican más lentamente y presentan una mayor fidelidad, observándose tasas de mutación más bajas que para virus de RNA, lo que les permitiría alcanzar tamaños genómicos mayores. De hecho los virus de RNA, así como los de ssDNA, que evolucionan más rápidamente, presentan un tamaño en sus genomas similares (Holmes, 2003). Sin embargo se desconoce si la selección actúa sobre la tasa de mutación y otras características como la naturaleza del ácido nucleico, la polaridad o estructura del genoma pueden influir. El tamaño reducido de los genomas de virus de RNA conlleva una serie de características como son: (1) estructuras secundarias funcionales en sus genomas de RNA, esenciales en distintos pasos del ciclo infeccioso, como replicación, traducción, ensamblaje..., además, se ha demostrado que las regiones estructuradas del genoma del virus limitan más las mutaciones que las no estructuradas (Pathak y Temin, 1992; Pita *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2007); (2) pautas de lectura solapadas que permiten ampliar el número de funciones proteicas sin comprometer el tamaño del genoma, además virus con genomas más largos presentan menos solapamiento (Belshaw *et al.*, 2007; Belshaw *et al.*, 2008); (3) proteínas virales multifuncionales.

2.4. Tasa de mutación.

Las mutaciones representan la primera fuente de variación genética sobre la que actúa la selección natural y la deriva genética determinando la distribución de las variantes genéticas en la población viral. Durante la replicación de los ácidos nucleicos, las polimerasas que son enzimas que catalizan la síntesis de la nueva molécula, a veces incorporan un nucleótido incorrecto. Si este error no se corrige se produce una mutación. Los virus presenta altas tasa de mutación (Drake y Holland, 1999), debido a que las RNA polimerasas dependientes de RNA y las transcriptasas inversas no presentan corrección de pauta de lectura, con excepción de los *Nidovirales* que presentan actividad exoribonucleasa 3'→5' (Gorbalenya *et al.*, 2006; Minskaia *et al.*, 2006). Todos los virus de RNA codifican sus propias RdRp, exceptuando algunos virus satélites. La baja fidelidad de copia se supone que está

comprometida por la alta actividad de síntesis que permite tiempos de replicación más rápidos (Elena y Sanjuán, 2005a; Elena y Sanjuán, 2005b; Furió *et al.*, 2005; Belshaw *et al.*, 2008). Generalmente los virus de RNA presentan las tasas de mutación más elevadas, mayores que las descritas para virus de DNA (Drake *et al.*, 1998). Las causas evolutivas de estas altas tasas de mutación son desconocidas aunque se acepta generalmente que pueden ser beneficiosas para escapar de la fuerte presión de selección impuesta por los mecanismos de defensa del huésped, aunque no necesariamente evolucionando en respuesta a la selección natural. De hecho, las altas tasas de mutación tiene efectos perjudiciales en la eficacia biológica del virus pues la mayoría de mutaciones que se producen son deletéreas (Sanjuán *et al.*, 2004b; Bonhoeffer, 2008). Sin embargo los virus de ssRNA+ de plantas muestran particularmente las tasas de mutación más bajas descritas para virus de RNA (Malpica *et al.*, 2002; Tromas y Elena, 2010; de la Iglesia *et al.*, 2012). Más aun, las poblaciones de virus de RNA de plantas son genéticamente estables entre aislados separados en el espacio o tiempo en comparación con virus de animales (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991; Fraile *et al.*, 1997). Esta baja variabilidad genética puede ser debida a la fuerte presión estabilizadora que ejerce la selección y a los severos cuellos de botella en los que la población viral se ve reducida durante el movimiento de célula a célula, durante la infección de tejidos distales de la planta y en la propagación entre huéspedes (García-Arenal *et al.*, 2001; Li y Roossinck, 2004; Ali *et al.*, 2006). Los cuellos de botella consisten en drásticos descensos en el número de individuos que componen la población viral, donde el tamaño puede llegar a ser tan pequeño como un único virión, que se encarga de producir una nueva generación (Zwart *et al.*, 2011). En virus de plantas se ha descrito que el tipo de mutaciones más frecuentes son sustituciones de nucleótido y deleciones (Malpica *et al.*, 2002; Tromas y Elena, 2010). La recombinación se considera otro mecanismo que opera durante la replicación y permite el intercambio de material genético, constituyendo otra fuente de variabilidad genética (Simon-Loriere y Holmes, 2011). Sin embargo las tasas recombinación que se ha descrito son muy bajas. Para el TEV se encuentra en el mismo rango que la tasa de mutación, por lo que podrían incidir de la misma manera en la generación de diversidad genética en las poblaciones de TEV (Tromas,

2013). Las tasas de mutación virales pueden ser evaluadas *in vivo* mediante distintas aproximaciones experimentales: (1) estimando la frecuencia de mutantes contenidos en una población generada a partir de un clon (Drake y Holland, 1999; Sanjuán *et al.*, 2009); (2) calculando el número de alelos mutantes acumulados en un locus protegido de la acción de la selección (Malpica *et al.*, 2002; Tromas y Elena, 2010); (3) calculando la frecuencia de alelos letales en una población (Gago *et al.*, 2009); (4) estimando la media y varianza de la eficacia biológica entre linajes independientes durante experimentos de acumulación de mutaciones, con el método de Mukai-Bateman (Elena y Moya, 1999); y (5) aplicando una prueba de fluctuación de un locus asociado a un fenotipo medible (Luria y Delbrück, 1943; Foster, 2006). El primer cálculo de la tasa de mutación para un virus de plantas fue para el virus del mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*, TMV). Se determinó que es de $1.8 \cdot 10^{-5}$ sustituciones por sitio o nucleótido por evento de replicación (s/n/r) (Malpica *et al.*, 2002). Entre los potyvirus la tasa de mutación calculada mediante distintas aproximaciones determinó que para el TEV se encuentra en un rango que va desde $2.960 \cdot 10^{-5}$ hasta $4.754 \cdot 10^{-5}$ s/n/r (Sanjuán *et al.*, 2009; Tromas y Elena, 2010). Y para el TuMV la tasa calculada fue $2.64 \cdot 10^{-6}$ s/n/r (de la Iglesia *et al.*, 2012). Estos datos se sitúan en torno a 10^{-5} y 10^{-6} , el rango de valores más bajo estimado para virus de RNA, inferior al de virus de animales y bacteriófagos (Sanjuán *et al.*, 2010). Según las teorías evolutivas cabría esperar que aumentar esas tasas de mutación debería favorecer la capacidad de invadir nuevos ambientes, saltar mecanismos de defensa y terapias antivirales. Pero aumentos en las tasa de mutación tienen serios efectos en la eficacia biológica por lo que los virus tal vez, presentan las tasas de mutación más altas posibles compatibles con el mantenimiento de la información genética necesaria para completar de manera eficiente su ciclo biológico (Crotty *et al.*, 2001; Elena y Sanjuán, 2005a; Summers y Litwin, 2006).

2.5. Umbral de error.

La tasa de mutación en los virus de RNA se ve limitada por un umbral de error (*error threshold*). Se trataría de un límite teórico de la tasa de mutación por encima del cual se acumularían tantas mutaciones deletéreas en la población viral que ésta

se vería abocada a la extinción o catástrofe de error (Eigen, 1996; Eigen, 2002; Biebricher y Eigen, 2005). El límite de la tasa de mutación resultaría del equilibrio entre la selección natural, la arquitectura genómica del virus y la capacidad para evitar disminuir su viabilidad o eficacia biológica, así como mantener íntegra la información genética (Holmes, 2003; Anderson *et al.*, 2004; Drake *et al.*, 2005).

2.6. Robustez en los virus de RNA.

La robustez es una propiedad de los seres vivos y se define como la capacidad de preservar la expresión fenotípica frente a perturbaciones en el ambiente o en el genotipo. Estas perturbaciones en virología suelen referirse a cambios de huésped (ambiente) o mutaciones en el genoma viral (genotipo) (de Visser *et al.*, 2003). En otras palabras, la robustez genética es la invariabilidad fenotípica frente a la presión mutacional. La robustez genética se ve incrementada en un organismo por sus genomas poliploides, duplicidades génicas con varios alelos que realizan la misma función, rutas metabólicas alternativas, mecanismos de reparación del genoma dañado, comprobación de errores para corrección de las mutaciones y mecanismos de regulación de la expresión génica, así como proteínas chaperonas que amortiguan el efecto de mutaciones. Los virus de RNA se considera que poseen genomas haploides y que no contienen redundancia genética. Al contrario, sus genomas son muy compactos con solapamiento de pautas de lectura. Poseen proteínas multifuncionales así como estructuras de RNA funcionales conservadas y carecen de funciones catalíticas alternativas. Esto provoca que pequeñas mutaciones puntuales tengan un efecto drástico en la eficacia biológica del virus, siendo sus genomas hipersensibles a las mutaciones. La mayoría de las mutaciones en los virus de RNA suelen ser deletéreas (Chao, 1990; Yuste *et al.*, 2000; Sanjuán *et al.*, 2004b), comparados con organismos de DNA. Así mismo, otra consecuencia de los genomas compactos de virus de RNA es la existencia de epistasia antagonista (Sanjuán *et al.*, 2004a; Sanjuán *et al.*, 2005; Bonhoeffer, 2008; Lalić y Elena, 2012). Sin embargo, la selección natural puede aumentar la robustez genética según estudios teóricos (Wilke *et al.*, 2001; de Visser *et al.*, 2003; Wilke y Adami, 2003; Félix y Wagner, 2008). ¿Cómo pueden ser compatibles las altas tasas de mutación que presentan los

virus de RNA con la robustez genética? Una explicación es que esta hipersensibilidad individual se traduce en una robustez a nivel de la población viral. Debido a los grandes tamaños poblaciones virales la selección purificadora es extremadamente eficiente eliminando genomas mutados y preservando los no mutados (Krakauer y Plotkin, 2002). La mayor parte de la variabilidad es rápidamente eliminada de la población siendo responsables de la adaptación unos pocos cambios beneficiosos (Novella *et al.*, 1999). Por otro lado, según la teoría de las cuasiespecies, la selección aumenta la robustez genética, ya que a altas tasas de mutación la población viral se desplaza en el paisaje adaptativo hacia picos adaptativos más anchos donde el efecto de las mutaciones pueda ser mayoritariamente neutral (Wilke y Ronnewinkel, 2001). Esta hipótesis conocida como supervivencia del mediocre (*survival of the flattest*) (Schuster y Swetina, 1988), y que contrasta solo aparentemente con la teoría de Darwin de la supervivencia del más apto (*survival of fittest*), ha sido confirmada experimentalmente con el virus de la estomatitis vesicular (*Vesicular stomatitis virus*, VSV) y viroides (Codoñer *et al.*, 2006). Por otro lado, la evolución consiste en la capacidad para generar una variación fenotípica heredable con el fin de adaptarse en respuesta a la selección (Wagner y Altenberg, 1996; Kirschner y Gerhart, 1998). Entre los trabajos disponibles, un estudio muestra como la robustez genética aumenta la capacidad de evolución en la termotolerancia del virus de RNA $\Phi 6$ (McBride *et al.* 2008), y otro en el que la robustez mutacional puede evolucionar como respuesta a selección por robustez ambiental (termoestabilidad) (Domingo-Calap *et al.*, 2010), lo que sugiere que los virus han evolucionado mecanismos para aumentar la robustez genética a nivel de sus poblaciones virales.

Aunque el genotipo de los virus de RNA se considera haploide, los virus también se pueden considerar como organismos n -ploides, siendo n variable teniendo en cuenta el tamaño de sus poblaciones virales durante el ciclo infeccioso, la multiplicidad de infección por célula y el número de genomas que pueden estar replicando y siendo traducidos en una misma célula. Al inicio de la infección el número de partículas virales en la célula es bajo, se puede considerar haploide. Etapas más tardías de la

infección, cuando el huésped está invadido, conlleva a un incremento de la ploidía. En este escenario ocurre la complementación genética. Si varios genomas diferentes coexisten en la misma célula, contribuyen igual a la síntesis de proteínas virales que actúan por igual en el citoplasma, pueden actuar por igual hacia los genomas mutados. Por eso mutantes letales se mantienen por complementación, o genomas de baja eficacia biológica pueden coexistir con el virus silvestre (Wilke *et al.*, 2004).

2.7. Modo de replicación viral.

La frecuencia de mutación de los virus se encuentra determinada por tres factores: el primero, las altas tasas de error de las RNA replicasas virales que no presentan corrección de errores, así como ausencia de mecanismos de reparación del RNA tras la replicación; el segundo los mecanismos de purificación que actúan sobre los RNAs defectuosos o aberrantes y por último el modo de replicación viral. La replicación es la etapa central del ciclo infeccioso viral que tiene como resultado la producción de múltiples genomas virales dentro de la célula huésped, que posee unos recursos limitados. Los diferentes pasos de los que consta el ciclo infeccioso de un virus de ssRNA⁺ de plantas se muestran en la figura 2. El primer paso consiste en la desencapsidación de la molécula de ssRNA⁺ genómico, seguido de su traducción en las proteínas virales mediante los ribosomas celulares, incluida la replicasa viral. Seguidamente tiene lugar la replicación, cuando la replicasa viral toma como molde las cadenas de ssRNA⁺ genómico y sintetiza cadenas de ssRNA⁻ antigenómico. Estas cadenas son usadas otra vez por la replicasa como molde para generar nuevas cadenas de ssRNA⁺, que servirán tanto como mRNAs virales para ser traducidas, como RNAs genómicos que se encapsidarán generando nuevos viriones que formaran la progenie viral. Se han propuesto dos modelos teóricos para describir la dinámica de acumulación de los RNAs + y - virales durante la replicación: el modelo de replicación geométrico y el modelo de replicación máquina de estampación (*stamping machine*). El modelo de replicación geométrico consiste en que las primeras cadenas de RNA + genómico que colonizan la célula son inmediatamente usadas como molde para sintetizar cadenas de RNA - antigenómico. Estos RNAs intermediarios replicativos, son usados para generar la

nueva progenie de RNA + genómico, que vuelven a ser utilizadas en nuevas rondas de replicación para la síntesis de nuevas cadenas de RNA-. Cada cadena de RNA sirve de molde para la producción de la cadena complementaria con la misma eficiencia de síntesis, la dinámica de acumulación de ambas cadenas de RNA viral es simétrica y crece exponencialmente con las sucesivas rondas de replicación durante el ciclo de infección (Fig. 4). En el modelo de replicación *stamping machine* las primeras cadenas de RNA + genómico se utilizan para generar en una ronda de replicación las cadenas de RNA - antígenómico que son usadas reiteradamente en sucesivas rondas de replicación como molde para producir la nueva progenie de RNA + genómico. Por tanto la dinámica de acumulación de ambas cadenas de RNA viral es asimétrica porque se acumulan varios ordenes de magnitud más RNA + que RNA -, la eficiencia de síntesis del RNA + genómico es mayor y su acumulación es lineal desde el inicio de la replicación (Fig. 4). ¿En qué medida afecta que la replicación siga uno u otro modelo a la frecuencia de genomas mutados en la población viral? Si la replicación sigue un modelo puramente *stamping machine*, puesto que los RNAs - antígenómicos son producidos en una sola ronda de replicación por ciclo de infección, solo aquellas mutaciones introducidas en este paso son copiadas en el RNA + genómico de la progenie viral. La frecuencia de mutación es aproximada a la tasa de mutación de la replicasa viral y las mutaciones por genoma siguen una distribución de Poisson (Luria, 1951). En el modelo geométrico los RNA + genómicos mutados son utilizados como molde en sucesivas rondas de replicación, con lo que la frecuencia de genomas mutados aumenta exponencialmente con el número de rondas de replicación. En un modelo geométrico la distribución de las mutaciones por genoma sigue una distribución Luria-Delbrück (Dewanji *et al.*, 2005). El modo de replicación además tiene una serie de consecuencias en la eficacia viral según las teorías evolutivas: la replicación *stamping machine* es más permisivo a tasas de mutación más altas porque no por ello se ve incrementada la frecuencia de mutación como sucedería con el modelo geométrico. Por lo tanto el modelo *stamping machine* es menos sensible a mutaciones deletéreas que el geométrico, pues reduce el promedio de genomas mutados. Dicho en otras palabras, el modelo *stamping machine* dota de mayor

robustez genética a la población viral que el modelo geométrico (Sardanyés *et al.*, 2009).

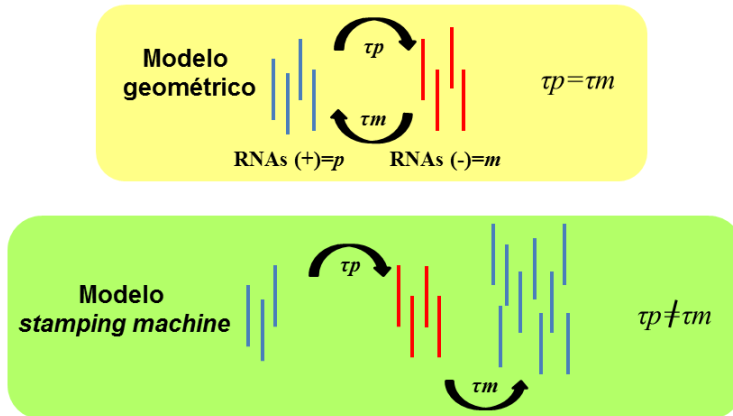


Figura 4. Modelo de crecimiento geométrico comparado con el modelo *stamping machine* para la replicación del RNA genómico viral. Las líneas azules representan RNAs virales de polaridad + y las rojas los RNAs de polaridad -. τ_p , tasa de síntesis de los RNAs + y τ_m , tasa de síntesis de los RNAs -.

Estos dos modelos representan los extremos opuestos de un continuo de posibilidades, por lo que es más que probable que el modo de replicación real de muchos virus sea intermedio entre estos extremos. Pese a su relevancia en la virología evolutiva, hasta la fecha se dispone de muy pocos datos experimentales sobre el modo concreto en que se replican los virus. De hecho, tan solo se han determinado para ciertos bacteriófagos. Los ejemplos son el fago T2 (dsDNA) que se replica mediante un modelo geométrico (Luria, 1951), el fago Φ X174 (ssDNA) que sigue un modelo *stamping machine* (Denhardt y Silver, 1966) y el fago Φ 6 (dsRNA) para el cual se concluyó un modelo mixto (Chao *et al.*, 2002). En un estudio más reciente con el bacteriófago Q β (ssRNA+) se ha determinado un modelo *stamping machine* (García-Villada y Drake, 2012). Para los virus de ssRNA+ de plantas es asumido que se replican según el modelo *stamping machine* debido a que la acumulación de su RNA + genómico es lineal (French y Stenger, 2003).

3. Silenciamiento por RNA en plantas.

3.1. Silenciamiento por RNA: aspectos generales.

El silenciamiento génico por RNA es un mecanismo conservado evolutivamente en la célula eucariota, entre especies de los diferentes reinos, que permite regular la expresión génica y está mediado por pequeños RNAs que causan la inactivación total o parcial de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas (Ketting *et al.*, 2001; Tomari y Zamore, 2005). Una de sus funciones en plantas es actuar como un sistema inmune protegiendo sus genomas frente al daño de ácidos nucleicos invasores como elementos móviles de DNA, transposones y centromeros, así como transgenes y virus (Wu-Scharf *et al.*, 2000; Voinnet, 2001). Se conoce también por los términos RNA de interferencia y silenciamiento génico postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS). El silenciamiento es inducido por moléculas de dsRNA, o ssRNA muy estructuradas, que pueden originarse por transcripción en el núcleo, durante infecciones virales o por acción de RNA polimerasas dependientes de RNA, o RDRs, que las sintetizan a partir de ssRNAs. Estas moléculas son cortadas por enzimas con actividad RNasa de tipo III denominadas Dicer o DCL (Dicer-like) originando un dúplex de RNAs de entre 19 y 25 nt. Una de las cadenas del dúplex denominado RNA de cadena sencilla interferente de pequeño tamaño (*small interfering RNA*, o siRNA) es incorporada en el complejo de silenciamiento por RNA o RISC (*RNA-induced silencing complex*) por una endonucleasa llamada Argonauta o AGO. Este complejo RISC se encarga de reconocer los ácidos nucleicos por homología con el siRNA y actuar durante la regulación transcripcional (a través de metilación del DNA o histonas) así como en la regulación postranscripcional de los mRNAs (corte o desestabilización e inhibición de la traducción de los mRNAs). Este mecanismo es amplificado por las RDRs que sintetizan nuevos dsRNAs que sirven a su vez como sustrato para DCL a partir de los ssRNAs procesados. Las nuevas moléculas de dsRNAs sintetizadas hacen que el silenciamiento persista incluso si la molécula que originó la señal se degrada (Voinnet y Baulcombe, 1997; Voinnet, 2005). En plantas existen diferentes rutas de silenciamiento por RNA donde participan distintos miembros de

la familia DCL y AGO (Fig. 5) (Molnar *et al.*, 2011). En plantas, los mecanismos de silenciamiento pueden activarse en una célula y transmitirse a células adyacentes y a tejidos distales. Estudios recientes han demostrado que tanto los siRNAs como los microRNAs (o miRNAs) tienen capacidad de moverse de una célula a otra y alcanzar el tejido vascular propagándose la señal del silenciamiento (Melnik *et al.*, 2011).

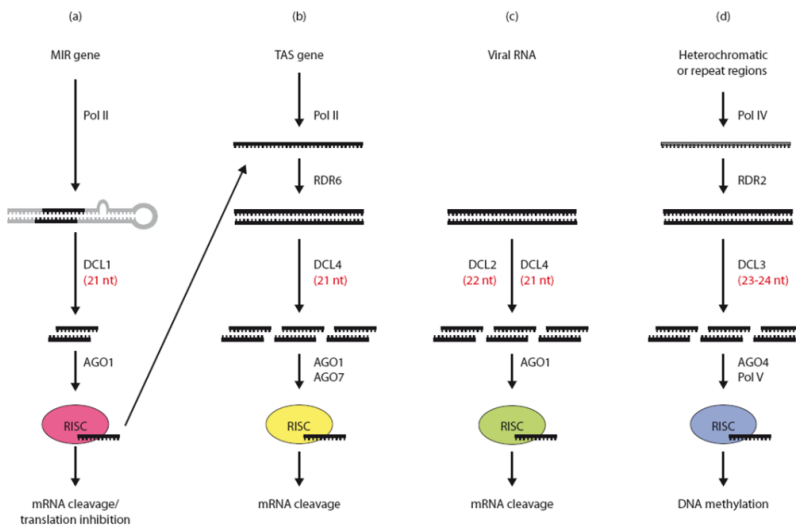


Figura 5. Esquema de las rutas de silenciamiento por RNA en plantas. (a) Ruta de los miRNAs, (b) los trans-acting siRNAs, (c) los vsRNAs y (d) siRNAs de heterocromatina. Los siRNAs son procesados a partir de precursores de dsRNA, mediante proteínas DCL. Los siRNAs son incorporados en el complejo RISC por AGO para dirigir la degradación del RNA diana. Las RDRs convierten los transcritos generados por la RNA polimerasas DNA dependientes (Pol II y Pol IV) en precursores de dsRNA. Para cada ruta se especifica que proteínas RDR, DCL y AGO participan, y con diferentes colores los distintos complejos RISC. También son indicados el tamaño y función de los distintos siRNA también son indicados. Tomado de Mólner *et al.*, 2011.

3.2. Los virus como inductores y dianas del silenciamiento por RNA

Una particularidad de este mecanismo inherente de la planta para la degradación específica de mRNAs a partir de siRNAs es que específicamente se induce por infecciones virales, constituyendo uno de los mecanismos principales de defensa antivirales. Los virus de ssRNA⁺, la mayor parte de virus de plantas, durante su replicación pueden formar dsRNAs intermediarios entre el RNA genómico y los

RNAs intermediarios de cadena –, siendo posibles sustratos de DCL, produciendo pequeños RNAs de origen viral o vsiRNAs (*viral small interfering RNAs*). Por otro lado, se ha sugerido que el RNA viral de cadena sencilla debido a sus estructuras secundarias en doble cadena pueden también ser la fuente de generación de los vsiRNA (Ding y Voinnet, 2007a). Esta señal antiviral puede diseminarse al resto de la planta, estableciendo una respuesta defensiva y una resistencia a la infección viral, incluso previa a la llegada del patógeno a esos tejidos. Aunque este mecanismo juega un papel fundamental a nivel celular evitando la invasión del virus, como ocurre en general con el PTGS, esta respuesta inmune al virus también se mueve sistémicamente entre diferentes tejidos y órganos a través del floema de la planta (Brosnan *et al.*, 2007; Dunoyer *et al.*, 2010). En *Arabidopsis thaliana* se han descrito cuatro proteínas DCL involucradas de manera jerárquica en la biosíntesis de vsiRNAs. En plantas infectadas con virus de RNAs actúa preferentemente DCL4, para producir vsiRNAs de 21 nt. Además puede actuar su sustituto funcional DCL2 que generan vsiRNAs de 22 nt, seguido de DCL3 que genera vsiRNAs de 24 nt y DCL1. Esta última contribuye en menor medida aunque puede actuar cuando están comprometidas las otras actividades DCL (Dunoyer *et al.*, 2005; Deleris *et al.*, 2006; García-Ruiz *et al.*, 2010). Los vsiRNA se asocian con el complejo RISC que se encarga de reconocer las dianas virales. La proteína AGO1 del complejo RISC se encarga en mayor medida de degradar el RNA viral impidiendo el establecimiento de la infección, aunque también se ha descrito en algunas especies de plantas la participación de AGO2 y AGO7 (Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008; Jaubert *et al.*, 2011). Por otro lado RDR1, RDR2 y RDR6, parecen ser componentes esenciales en estas vías de respuesta antiviral (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000), ya que pueden utilizar el RNA viral como molde para generar dsRNAs y amplificar la señal del silenciamiento. La importancia de RDR6 en la respuesta antiviral, se ha comprobado al observar que en aquellos casos en los que la actividad de esta enzima se encontraba comprometida, se produce un aumento de la susceptibilidad al patógeno así como la invasión por el virus de meristemos vegetales normalmente inmunes (Schwach *et al.*, 2005; Curaba y Chen, 2008; Voinnet, 2008).

3.3. Supresión viral del silenciamiento por RNA.

No es extraño por lo tanto esperar que los virus hayan evolucionado estrategias para contrarrestar este mecanismo de defensa de la planta, principalmente codificando factores capaces de interferir o inhibir diferentes pasos de las rutas de silenciamiento por RNAs. Estas proteínas son conocidas como supresoras del silenciamiento por RNA o VSRs (*viral suppressors of RNA silencing*). Todos los virus de plantas codifican un supresor del silenciamiento y en algunos casos más de uno, como ocurre con los géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Begomovirus* (Díaz-Pendón y Ding, 2008; Burguán y Havelda, 2011). Los supresores de silenciamiento son muy diversos en secuencia, estructura y actividad catalítica. Suelen estar implicados en otras funciones del ciclo viral, habiéndose encontrado actividad supresora en proteínas estructurales como la CP, así como en proteínas no estructurales que intervienen en replicación, movimiento o regulación de la traducción. Se han descrito actividades supresoras virales que interfieren prácticamente en cualquier etapa de las rutas de silenciamiento, al igual que hay datos que indican que un mismo supresor viral puede interferir en distintas etapas de las rutas. Los mecanismos de acción de los supresores virales son complejos y muy diversos. En general contrarrestan el silenciamiento secuestrando moléculas de RNA relacionadas con las rutas, o interaccionando con componentes proteicos de la maquinaria de silenciamiento. La principal estrategia de supresión del silenciamiento consiste en secuestrar tanto dsRNAs como siRNAs, impidiendo su funcionalidad o estabilidad. De hecho esta actividad se encuentra en supresores de virus de plantas de los géneros *Tospovirus*, *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Ipomovirus*, *Tombusvirus*, *Closterovirus*, *Vitivirus*, *Tobamovirus* y *Hordeivirus* (Lakatos *et al.*, 2006; Merai *et al.*, 2006; Cuellar *et al.*, 2009). En otras ocasiones, la supresión la ejercen interfiriendo con proteínas o factores reguladores de la maquinaria de silenciamiento. En plantas, se ha descrito que DRB4 (*dsRNA-binding protein 4*), factor auxiliar de DCL4, es una diana clave en el mecanismo de inhibición del silenciamiento de algunos supresores virales (Deleris *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008). Otra diana principal de los supresores virales es AGO1, para

inactivar al complejo RISC (Li y Ding, 2006b; Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010; Shimura y Pantaleo, 2011). Finalmente, también se han descrito supresores que actúan sobre las RDRs para impedir la formación de dsRNAs (Glick *et al.*, 2009). Esta gran diversidad funcional y estructural de los VSRs sugiere una convergencia evolutiva como necesidad para adaptarse a la ofensiva que desencadena el huésped, y al mismo tiempo pone de manifiesto el importante papel que juega el silenciamiento por RNA en la defensa antiviral de la planta. De la efectividad de su VSR depende en parte la habilidad para que un virus consiga replicarse con éxito e infectar sistémicamente a su huésped (Roth *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010). La supresión del silenciamiento puede facilitar la replicación de un segundo virus en infecciones mixtas, relacionándose este mecanismo con los fenómenos de sinergismo entre virus (Pruss *et al.*, 1997). Las infecciones, por otro lado, tienen un profundo impacto sobre las rutas de silenciamiento de RNA endógenas del huésped. Mediante diferentes aproximaciones (microarray, secuenciación masiva) se ha determinado un cambio sustancial en la acumulación de siRNAs y miRNAs en tejidos de plantas infectadas por virus. Se cuestiona si la actividad supresora de los VSRs para evadir la defensa de la planta, perturba la expresión de los mRNA endógenos de un modo colateral o es un fin en sí mismo, desvirtuando la expresión génica del huésped y creando un ambiente celular favorable para su ciclo infeccioso. Posiblemente ambas posibilidades no sean excluyentes.

3.4. Ruta de silenciamiento por miRNAs y los virus.

Los miRNA endógenos de la planta regulan un amplio rango de funciones biológicas que van desde el mantenimiento celular a respuesta a estrés ambiental. Los miRNAs tienen un tamaño de 21 nt. Los genes que los codifican son transcritos en un miRNA primario (pri-miRNA) no codificante de proteínas, por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA posee una estructura de horquilla, que es cortado por DCL1, auxiliado por HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) en un dúplex miRNA/miRNA* de 21 nt (pre-miRNA). Este pequeño dúplex, caracterizado por la presencia de un desapareamiento en el nucleótido 11, es estabilizado por 2'-O-

metilación de sus extremos 3' mediante HUA-ENHANCER 1 (HEN1), previniendo la uridilación y posible degradación del RNA. Finalmente del dúplex de miRNA-miRNA* solo una de las cadenas de miRNA es incorporada en el complejo RISC que contiene AGO1. El complejo reprime la expresión génica mediante corte del mRNA o inhibición de la traducción (Fig. 6) (Bartel, 2004; Voinnet, 2009). Regulan negativamente un amplio número de mRNAs endógenos mediante degradación o inhibición de su traducción (Molnar *et al.*, 2011). Durante las infecciones virales el patrón de expresión miRNAs de la planta se ve alterado. Mediante expresiones transitorias o por transgénesis de diferentes VSRs se ha demostrado la capacidad de unión de estas proteínas virales a dúplex de miRNA/miRNA*, al igual que se ha observado la interferencia en diferentes pasos de esta ruta provocando una alteración en la expresión génica asociada a menudo con el desarrollo de los síntomas propios de la infección viral (Kasschau *et al.*, 2003; Bazzini *et al.*, 2007; Várallyay *et al.*, 2010). En la figura 6 se representan distintos supresores virales que se han descrito y los pasos de la ruta de los miRNA que bloquean (Shimura y Pantaleo, 2011).

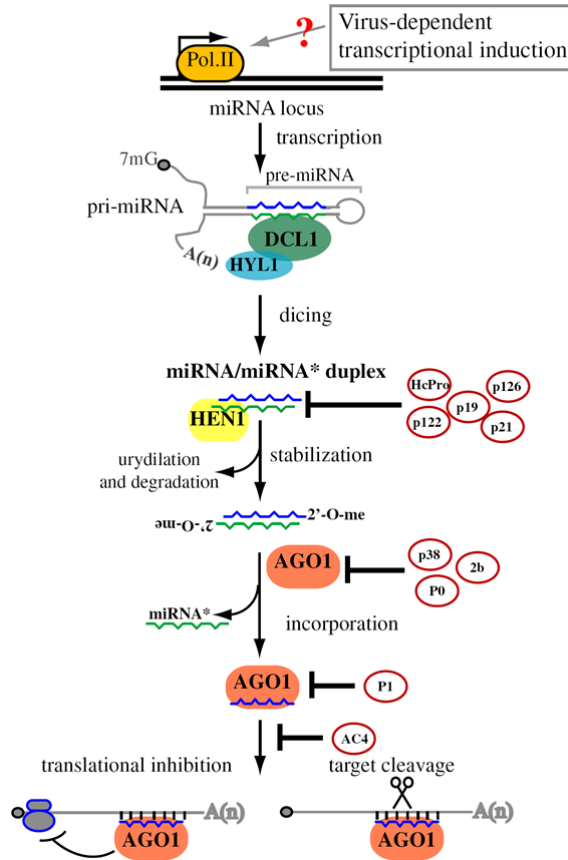


Figura 6. Actividad de los supresores virales del silenciamiento por RNA en la ruta endógena de los miRNAs. Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol.II). El miRNA primario (pri-miRNA) posee una estructura de horquilla y es cortado por DCL1, auxiliado por HYL1, en un dúplex miRNA/miRNA* de 21 nt (pre-miRNA). El dúplex es estabilizado por metilación mediada por HEN1. El miRNA es incorporado por AGO1 en el complejo RISC. Las proteínas supresoras del silenciamiento virales que se representan con círculo rojo puede actuar bloqueando el silenciamiento mediado por miRNAs, en distintos pasos de la ruta. HC-Pro del TEV (género *Potyvirus*), p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV género *Tombusvirus*), p126 y p122 del TMV (género *Tobamovirus*), P0 del virus del amarillo de la remolacha occidental (*Beet western yellows virus*, BWYV género *Polerovirus*), p38 del virus del arrugamiento del nabo (*Turnip crinkle virus*, TCV género *Carmovirus*), 2b del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV género *Cucumovirus*), P1 del virus del moteado suave del batata (*Sweet potato mild mottle virus*, SPMV género *Ipomovirus*). AC4 del virus del mosaico de la yuca africana (*African cassava mosaic virus*, ACMV género *Begomovirus*), p21 del virus del amarilleo de la remolacha (*Beet yellow virus*, BYV género *Closterovirus*). Tomado de Shimura y Pantaleo, 2011.

4. Estrategias para generar resistencia antiviral en plantas transgénicas.

4.1. Resistencia mediada por silenciamiento del RNA.

Las aproximaciones biotecnológicas para desarrollar resistencia a virus en plantas se basan fundamentalmente en la ingeniería genética. La primera estrategia de resistencia a virus de plantas utilizada se basó en el principio de resistencia derivada de patógeno (*pathogen-derived resistance*, PDR) propuesto por Sandfort y Johnson en 1985. Consiste en la expresión de un gen viral en plantas transgénicas que induce un efecto protector frente a la infección viral similar a la clásica protección cruzada. La primera experiencia se obtuvo al expresar la CP del TMV en plantas de tabaco transgénicas (Abel *et al.*, 1986), las cuales mostraron un título reducido del virus y un retraso en la aparición de síntomas. También se han utilizado desde entonces la expresión de replicasas, proteasas y proteínas del movimiento virales aunque lo más empleado ha sido la CP. También se puede expresar versiones mutadas de las proteínas que las hace disfuncionales. Se ha descrito que esta resistencia no suele ser específica, suelen actuar para un rango amplio de cepas de virus (Nejidad y Beachy, 1990; Schwach *et al.*, 2004). No se encuentra una clara correlación entre nivel de expresión de la proteína viral y el grado de resistencia y normalmente se rompe esta resistencia con altas dosis de inóculo viral. Aunque el mecanismo molecular no está comprendido del todo y tras observar que la expresión de RNAs no codificantes también inducen resistencia, se postula que puede estar jugando un papel relevante el PTGS del mRNA del transgen (Lindbo *et al.*, 1993). Esto abrió la puerta a la utilización de la maquinaria de silenciamiento por RNA para generar resistencia a virus. Los primeros trabajos consistieron en expresar transgénicamente secuencias repetidas e invertidas virales que generan RNAs estructurados en horquilla como precursores de siRNAs, secuencias no codificantes (hpRNAi) (Waterhouse *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Estos RNAs son expresados constitutivamente en la planta transgénica, son procesados por las DCLs en vsiRNAs que son incorporados en el complejo RISC activo. Ante la posible invasión del virus en la célula vegetal estos complejos RISC antivirales actúan degradando el RNA viral antes que el virus disponga de tiempo para replicarse y hacer efectivos sus mecanismos de supresión

del silenciamiento. También se ha utilizado la expresión del genoma entero viral, denominándolo amplicón (Prins *et al.*, 1995; Angell y Baulcombe, 1997; Vazquez Rovere *et al.*, 2002; Tenllado *et al.*, 2004; Bucher *et al.*, 2006). Esta estrategia de resistencia mediada por siRNA virales ha sido ampliamente utilizada para virus de ssRNA+, también se ha usado para virus de DNA (Aragaeo y Faria, 2009), y con viroides (Schwind *et al.*, 2009). Se puede decir que la planta transgénica se encuentra inmunizada de manera específica a ese virus concreto. La resistencia no es eficaz para virus que difieren, aproximadamente un 10% de esta secuencia (de Haan *et al.*, 1992). Las limitaciones de esta aproximación biotecnológica son la baja frecuencia con la que se obtienen líneas transgénicas resistentes, así como el grado de resistencia que muestran frente a las infecciones virales. En gran medida esta resistencia va a depender del nivel de acumulación de los siRNAs y de las secuencias diana en el RNA viral a donde van dirigidos los siRNAs. Puesto que depende de la maquinaria de silenciamiento endógena de la plantas, se ha observado que esta resistencia está limitada a temperaturas bajas donde la acumulación de siRNAs disminuye y por lo tanto el silenciamiento por RNA se ve atenuado. No es extraño el encontrar que esta resistencia mediada por siRNAs se rompe a bajas temperaturas. Además conlleva una serie de riesgos como la recombinación con virus contra los que no va dirigida la resistencia, o que pueden producir siRNAs complementarias a mRNAs endógenos de la planta con efectos no deseados (García y Simón-Mateo, 2006; Simón-Mateo y García, 2011). La búsqueda de nuevas estrategias de resistencia mediante silenciamiento por RNA llevo a la utilización de la ruta de biogénesis de los miRNAs.

4.2. Resistencia mediada por amiRNAs.

Los transcritos primarios de los miRNAs pueden manipularse sin comprometer su funcionalidad, modificándose la secuencia de 21 nt que codifica para el miRNA maduro (Zeng *et al.*, 2002; Parizotto *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2006). Estos miRNAs modificados se denominan miRNAs artificiales (amiRNAs) permiten la degradación del RNA que posee la secuencia complementaria. Esta tecnología fue demostrada en plantas silenciando genes con alto grado de especificidad (Alvarez *et*

al., 2006; Schwab *et al.*, 2006). La primera aplicación de esta tecnología a la virología de plantas la realizaron Niu y colaboradores (2006), y consistió en la expresión a partir del transcrito primario del miRNA-159 de *A. thaliana* de amiRNAs estables dirigidos contra secuencias específicas que codifican para los supresores del silenciamiento de dos virus de plantas, el tymovirus del mosaico amarillo del nabo (*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV) y el potyvirus TuMV. El amiRNA-159P69 fue diseñado contra la secuencia que codifica el supresor P69 del TYMV y el amiRNA-159HC-Pro contra la secuencia del supresor HC-Pro del TuMV. Líneas transgénicas que expresaban el apropiado amiRNA, 35S-pre-amiRNA159-P69 o 35S-pre-amiRNA159-HC-Pro en un alto nivel de acumulación, mostraron resistencia específica TYMV y TuMV respectivamente. La resistencia obtenida resultó en la nula capacidad de los virus para replicarse, infectar sistémicamente y desarrollar la sintomatología propia del patógeno. Además, los autores exploraron la posibilidad de expresar los dos amiRNA mediante pre-amiRNA diméricos para conferir resistencia a ambos virus. Propusieron que la expresión de múltiples amiRNAs permitiría la resistencia a un amplio espectro de virus, siendo eficaz esta inmunidad en la planta incluso a temperaturas bajas, en torno a 15 °C (Niu *et al.*, 2006). Recientemente esta tecnología se ha aplicado a otras especies como tabaco (Duan *et al.*, 2008; Ai *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2011; Kung *et al.*, 2012) tomate (Zhang *et al.*, 2011), vid (Jelly *et al.*, 2012) y trigo (Fahim *et al.*, 2012). Esta estrategia, sin embargo, conlleva varias limitaciones. Al igual que sucede con la expresión de siRNAs, depende de las líneas transgénicas y del nivel de acumulación del amiRNA (Simón-Mateo y García, 2006; Lin *et al.*, 2009; Lafforgue *et al.*, 2011; Kung *et al.*, 2012). En otro trabajo donde la proteína 2b supresora del silenciamiento del cucumovirus CMV fue diana de un amiRNA, las plantas transgénicas mostraron diferentes grados en respuesta a infecciones con CMV: fuerte resistencia, resistencia parcial, recuperación y susceptibilidad (Qu *et al.*, 2007). Depende de las secuencias diana escogidas en el RNA viral puesto que probablemente existen restricciones de secuencia con sitios más o menos accesibles a la maquinaria de silenciamiento. Es necesario un diseño del amiRNA que evite un posible defecto del reconocimiento del amiRNA con su secuencia diana (Duan *et al.*,

2008). Así mismo, la mayoría de virus de plantas muestran una heterogeneidad genética muy alta, por tanto la secuencia debe ser dirigida contra una región conservada en los distintos aislados. Niu y colaboradores (2006) demostraron que sus plantas eran resistentes para un 50% de los aislados analizados de TuMV. Por tanto, esta estrategia es altamente específica para una determinada secuencia o clon infeccioso lo que limita su aplicabilidad directa en la agricultura. Sin embargo los virus de plantas, en concreto los de RNA muestran una gran variabilidad en su entorno natural, lo que dificulta la búsqueda de posibles dianas contra las que dirigir el amiRNA.

5. Durabilidad de la resistencia mediada por amiRNAs.

Los virus presentan una alta mutabilidad, por lo que pueden emerger poblaciones virales que contengan variantes mutantes que escapen de la resistencia impuesta por el amiRNA. En sistemas animales con RNA de interferencia (RNAi) usado como terapias antivirales para inhibir la replicación de ciertos virus de humanos, como el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (HIV-1) o poliovirus, se ha observado la aparición de variantes resistentes que difieren del virus silvestre en una o varias mutaciones puntuales que se han fijado en la diana del RNAi. Estos cambios conllevan un apareamiento imperfecto del RNAi con la diana que evita que la maquinaria de silenciamiento procese correctamente el RNA de estos virus mutantes (Boden *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004; Gitlin *et al.*, 2005; Westerhout *et al.*, 2005). La maquinaria de silenciamiento admite cambios en algunas posiciones de los 21 nt de la diana, pero cambios en las posiciones centrales, particularmente cambios en la posición 9 y 11 tienen un impacto drástico (Westerhout y Berkhout, 2007). Simón-Mateo y colaboradores (2006) obtuvieron la primera evidencia de la capacidad de un virus de plantas para escapar de la resistencia impuesta en este caso por miRNA endógenos de la planta mediante mutaciones dentro de la secuencia diana. Para ello construyeron una serie de virus recombinantes del potyvirus PPV que contenían en su genoma las secuencias dianas de miRNAs naturales de *A. thaliana*. Describieron que las posiciones mutadas en el virus principalmente se concentraban en el extremo 5' del miRNA (Simón-Mateo y García, 2006). Lin y

colaboradores (2009) estudiaron la vulnerabilidad de estas posiciones en el caso de amiRNAs dirigidos contra el potyvirus TuMV. Para ello testaron la capacidad de romper la resistencia impuesta por el amiRNA en plantas transgénicas con una serie de virus recombinantes donde cada uno presentaba mutada una de las distintas posiciones de la diana del amiRNA. Demostraron que las posiciones 3 a la 6, 9 y 12 son esenciales para el eficiente procesamiento de RISC sobre los genomas virales, mientras que cambios en las posiciones 2, 10, 11, 13, 15 y 18 tienen un efecto moderado. El resto de posiciones tienen efectos menores. Más aún, estos virus capaces de romper la resistencia mediada por el amiRNA, presentaron deleciones en su secuencia o mutaciones adicionales durante su infección en las plantas transgénicas. Una vez rota la resistencia la progenie viral se encuentra sujeta a la presión de selección ejercida con la presencia del amiRNA, por lo que estas mutaciones o deleciones debieron ser seleccionadas positivamente por contribuir mejor a escapar del amiRNA (Lin *et al.*, 2009).

Estos trabajos ponen de manifiesto la posibilidad de romper la resistencia mediante la generación de variantes alélicas del virus que poseen mutadas la secuencia diana de 21 nt. La capacidad para acumular variantes rompedoras en la población viral encuentra dos restricciones según actué la selección: la primera sería la selección que actúa a nivel de proteína. Las mutaciones que en regiones codificantes quedan sujetas a la necesidad de garantizar las actividades catalíticas y funciones proteicas. Y la segunda presión de selección tiene que tratar de mantener la funcionalidad de los elementos de secuencia y estructura del RNA. En los trabajos mencionados anteriormente (Simón-Mateo *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009), la presión de selección era ejercida sobre secuencias no codificantes, por lo que las mutaciones descritas no afectaban la replicación y funciones virales. Estos trabajos plantean el debate sobre la posibilidad que estas variantes rompedoras se obtengan en el medio ambiente mediante la evolución natural de las poblaciones virales y consigan finalmente escapar de la resistencia de plantas transgénicas. Para responder esta cuestión se realizó un experimento de evolución con 25 linajes independientes de TuMV originados a partir de un clon viral ancestral que mediante pases seriados fue

evolucionando en plantas de *A. thaliana* silvestres, susceptibles al virus. Periódicamente se analizó si la población viral era capaz de romper la resistencia mediada por el amiRNA-159HC-Pro en la línea 12-4 de plantas de *A. thaliana* transgénicas, totalmente resistentes (Niu *et al.*, 2006). El resultado fue que todos los linajes consiguieron romper la resistencia con éxito, la rotura del primer linaje ocurrió tras 6 pases evolutivos y tras 28 pases el último de los 25 linajes (Lafforgue *et al.*, 2011). Un conjunto de nuevos experimentos similares se llevaron a cabo en la línea 10-4 de plantas de *A. thaliana* transgénicas, parcialmente resistentes porque expresan el amiRNA-159HC-Pro en cantidades sub-inhedoras para impedir la replicación del TuMV. El resultado fue que todos los linajes rompieron igualmente la resistencia pero más rápido, pues necesitaron de un número menor de pases (Fig. 7A) (Lafforgue *et al.*, 2011). Mediante la caracterización de la secuencia consenso de la población viral en la planta transgénica donde se da la rotura de la resistencia, se determinó el posible cambio ocurrido en alguna de las posiciones de la diana del amiRNA. En todos los 50 linajes, sin excepción alguna, se encontraron una o varias mutaciones puntuales en la secuencia de la diana del amiRNA, a las que se atribuyó el éxito de la rotura de la resistencia de estas poblaciones virales evolucionadas. Se concluyó que la evolución en la línea 10-4 fue más rápida porque la probabilidad de la generación de estos mutantes aumenta cuando la evolución ocurre en presencia del amiRNA, porque ejerce una presión de selección. Además se demostró que las posiciones que en mayor frecuencia se encontraron mutadas fueron las centrales, en concreto la posición 11 y 12, a diferencia de la probabilidad de mutación de otras posiciones dentro de la diana determinada en estudios anteriores (Fig. 7B) (Simón-Mateo y García, 2006; Lin *et al.*, 2009).

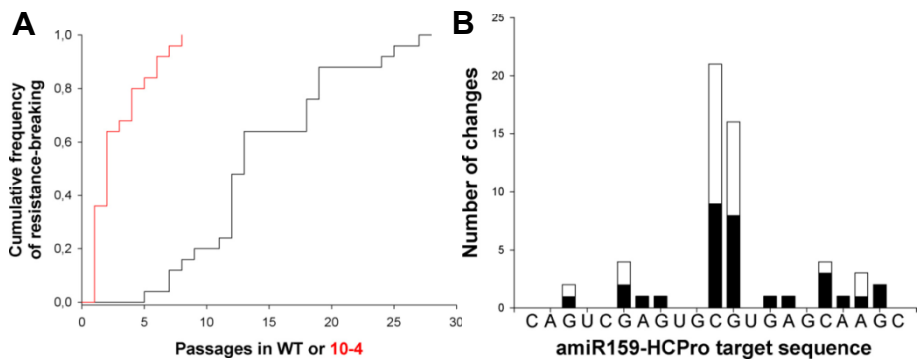



Figura 7. (A) Frecuencia acumulada de los linajes TuMV capaces de escapar de la resistencia mediada por el amiRNA 159-HC-Pro a lo largo de los pases evolutivos. La línea negra representa los linajes evolucionados en plantas *A. thaliana* silvestres (wild-type; WT) y la línea roja corresponde a los linajes evolucionados en plantas de la línea 10-4 transgénica de *A. thaliana*, parcialmente resistentes. La capacidad escapar del amiRNA de las poblaciones virales evolucionadas, se evaluó en plantas la línea 12-4 transgénica, totalmente resistente al genotipo ancestral de TuMV. Se consideró rota la resistencia cuando al menos una de 20 plantas 12-4 inoculada resulto infectada por TuMV. (B) Distribución de las mutaciones presentes en la diana del amiRNA-159-HC-Pro, encontradas en la secuencia consenso de las poblaciones virales evolucionadas en los distintos linajes de TuMV. Las barras negras corresponden a la frecuencia de las mutaciones encontradas en los linajes evolucionados en plantas de *A. thaliana* silvestres, y las blancas a las registradas en la evolución en plantas de la línea 10-4 transgénica. Adaptado de Lafforgue *et al.*, 2011.

Probablemente esto fue debido a que la presión de selección se ejerce sobre una secuencia codificante de la proteína HC-Pro. Los cambios en su mayoría, un 95%, fueron transiciones G por A y C por U. Muchos linajes independientes presentaron la misma mutación, un claro ejemplo de convergencia evolutiva, debido probablemente a que la evolución transcurre en un ambiente idéntico con la misma fuerza de selección, y con pocos caminos adaptativos alternativos (Lafforgue *et al.*, 2011). La durabilidad de esta estrategia de resistencia mediada por RNAi está limitada en el tiempo por la capacidad evolutiva de los virus de RNA.

En retrospectiva, la relativa facilidad que encontraron las poblaciones evolucionadas de TuMV para romper la resistencia antiviral se puede explicar en gran medida por la variación existente en la diana del amiRNA en poblaciones naturales de TuMV, que sugiere que esta región no se encuentra bajo una fuerte presión de selección. Por



lo tanto para mejorar la efectividad de la resistencia por amiRNA es prioritario fijar sus dianas en regiones altamente conservadas en la secuencia del genoma viral, sujetas a una fuerte presión de selección y que difícilmente pueden acumularse variantes mutadas en la población viral. Otra aproximación para la mejora de la estrategia antiviral es incorporar en una misma planta transgénica la expresión de dos o más amiRNA dirigidos contra distintas regiones del genoma con el fin de dificultar la enorme capacidad evolutiva de las poblaciones virales (Lafforgue *et al.*, 2013).

OBJETIVOS





Para profundizar en el conocimiento de la replicación de los virus de RNA de cadena positiva de plantas y entender cómo las poblaciones de estos virus son capaces de romper la resistencia impuesta por la expresión de un microRNA artificial, en esta Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

1.- Analizar la dinámica de acumulación intracelular de los RNAs de polaridad + y – del potyvirus del mosaico del nabo durante un ciclo de infección celular, determinando en qué grado su mecanismo de replicación se ajusta a un modelo de amplificación geométrica o de *stamping machine*.

2.- Caracterizar las poblaciones evolucionadas del potyvirus del mosaico del nabo capaces de romper la resistencia mediada por un microRNA artificial (amiRNA) mediante ultrasecuenciación de un fragmento del genoma del virus que contiene la diana del amiRNA.

3.- Evaluar el efecto de infecciones mixtas del potyvirus del mosaico del nabo y de otros virus de plantas, pertenecientes a grupos taxonómicos con distinto grado de parentesco, sobre el destino de la resistencia basada en la expresión de amiRNAs antivirales.



CAPÍTULO I





Dynamics of a Plant RNA Virus Intracellular Accumulation: Stamping Machine vs. Geometric Replication

Fernando Martínez^{*}, Josep Sardanyés^{*}, Santiago F. Elena^{*,§,1} and José-Antonio Daròs^{*,1}

^{*}Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Universidad Politécnica de Valencia), Valencia, Spain and [§]Santa Fe Institute, Santa Fe, NM 87501, USA

¹Corresponding authors: J. A. Daròs, E-mail: jadaros@ibmcp.upv.es or S. F. Elena, E-mail: sfelena@ibmcp.upv.es

Genetics (2011) 88:637-646

ABSTRACT

The tremendous evolutionary potential of RNA viruses allows them thriving despite host defense mechanisms and endows them with properties as emergence, host switching and virulence. The frequency of mutant viruses after an infectious process results from the interplay between the error rate of the viral replicase, from purifying mechanisms acting after transcription on aberrant RNAs, and from the amplification dynamics of virus RNA positive (+) and negative (-) strands. Two extreme scenarios describing viral RNA amplification are the geometric growth, where each RNA strand serves as template for the synthesis of complementary strands with the same efficiency, and the stamping machine, where a strand is reiteratively used as template to synthesize multiple copies of the complementary. The resulting mutation frequencies are completely different, being geometric growth largely more mutagenic than stamping machine. In this work we evaluate the contribution of geometric growth and stamping machine to the overall genome amplification of the plant (+) strand RNA virus turnip mosaic potyvirus (TuMV). By means of transfection experiments of *Nicotiana benthamiana* protoplasts with a TuMV cDNA infectious clone and by using strand-specific quantitative real-time PCR, we determined the amplification dynamics of viral (+) and (-) RNAs during a single cell infectious process. A mathematical model describing the amplification of each viral strand was fitted to the data. Analyses of the model parameters showed that TuMV (+) and (-) RNA amplification occurs through a mixed strategy with ~93% of genomes produced via stamping machine and only ~7% resulting from geometric growth.

INTRODUCTION

RNA viruses are among the organisms displaying the fastest rates of evolution (Duffy *et al.*, 2008), due to the combination of large population sizes and high mutation rates. Rapid evolution likely allows RNA viruses to thrive in the hostile environment of host cells where they replicate. In the case of positive (+) strand RNA viruses, amplification of the viral genome is the result of an RNA-to-RNA transcription process that includes the synthesis of an antigenomic RNA intermediate of complementary polarity (–) that serves as the template for transcription of genomic (+) RNA progeny. This process occurs in the cytoplasm of infected cells in virus-induced membranous structures. There, the different components of the replication machinery, some encoded by the virus and others recruited from the host, act (Den Boon *et al.*, 2010; Laliberté and Sanfaçon, 2010). A central element in this machinery is the RNA-dependent RNA polymerase, the enzyme that ultimately catalyzes the synthesis of viral RNA. Plus strand RNA viruses encode their own RNA polymerase, which always lacks proof-reading exonuclease activity (Ferrer-Orta *et al.*, 2006), a key property resulting in the high mutation rate of these pathogens (Sanjuán *et al.*, 2010).

In addition to the error rate of the viral replicase, other factors also contribute to the mutation frequency resulting from the viral amplification process. One of them is the dynamics of within-cell viral (+) and (–) strands production. Two opposed theoretical scenarios describing the mode of the viral RNA amplification process are geometric growth and the so-called stamping machine (Sardanyés *et al.*, 2009; Thébaud *et al.*, 2010). When there is geometric growth, each RNA strand serves as a template for the synthesis of complementary strands with the same efficiency. In this replication mode, transcription errors are geometrically amplified resulting in a relatively high mutation frequency, exceeding the error rate of the viral replicase. In the stamping machine, a few copies of the viral (–) replication intermediates produced from the genomic (+) RNA initially infecting the cell act as templates for the asymmetric synthesis of genomic (+) RNAs. In this case, the mutation frequency is approximately the error rate of the viral replicase, if purifying selection is

disregarded. In other words, geometric replication within a cell results in a linear increase in the frequency of mutations per genomic (+) RNA molecules with the number of replication events, whereas for the stamping machine this frequency is independent of the number of replication cycles (Drake, 1993; Drake and Holland, 1999). In addition to this effect, geometric replication combined with the production of an excess of deleterious mutations has two other consequences for viral fitness (Sardanyés *et al.*, 2009): (1) as templates that already carry *de novo* mutations will be used, the average number of mutations per genome in a population is always larger than for the stamping machine, and (2) the average population fitness will be lower since the mutational load is higher. Due to all these properties, selection for increased mutational robustness may have favored the stamping machine replication strategy (Sardanyés *et al.*, 2009). Given all these potential disadvantages, it is not obvious whether geometric replication may provide any clear advantage for RNA viruses. An advantage may be a more efficient evasion from immune pressures by quickly finding the right combination of escape mutations. However, this benefit should be balanced by the excessive production of deleterious mutations (Elena and Sanjuán, 2005).

In practice, it is expected that the different (+) strand RNA viruses employ an RNA amplification strategy that combines, at least to some extent, both of these opposed modes of replication. The extent to which geometric amplification and the stamping machine modes of replication contribute to the overall amplification of viral RNA is of fundamental importance to the biology of RNA viruses. Moreover, the mode of amplification will have strong implications for important phenomena such as the ability to escape from host defense mechanisms or adaptation to new hosts; in short, for properties such as virulence and viral emergence. Despite this importance, little information is available on the preferred modes of replication used by different RNA viruses. Exceptional in this sense is the work of Chao *et al.*, (2002). Analyzing the distribution of spontaneous mutations produced after a single burst of bacteriophage $\phi 6$, these authors showed that $\phi 6$ replicated mostly according to a stamping machine, although a minor fraction of the produced (+) progeny also served as templates for producing additional (-) strands.

In the present work, the accumulation dynamics of (+) and (-) RNAs of the plant (+) strand RNA virus *Turnip mosaic virus* (TuMV) during a single infection process of *Nicotiana benthamiana* protoplasts are analyzed and the contributions of geometric growth and the stamping machine mode of amplification are evaluated. TuMV belongs to genus *Potyvirus* within the family *Potyviridae* and is phylogenetically related to the Picorna-like supergroup of (+) strand RNA viruses (Koonin et al., 2008). TuMV consists of a genomic RNA of approximately 10,000 nt, linked at the 5' end to a viral protein (VPg) and with a poly(A) tail at the 3' end. It encodes about eleven mature gene products that result from the processing of a large viral polyprotein by three viral proteases (Urcuqui-Inchima et al., 2001), and a second polypeptide derived from a translational read-through process (Chung et al., 2008). In order to determine the accumulation dynamics of TuMV (+) and (-) RNA strands, two experimental obstacles had to be overcome. The first is specific PCR amplification of the viral (-) strands, for the purpose of quantification, without interference from the most abundant (+) strands. This was achieved by optimizing the conditions of the reverse transcription (RT) reaction performed prior to quantitative real-time PCR (qPCR), and by employing RT primers tagged at the 5' end with specific non-viral sequences (Plaskon et al., 2009). The second obstacle was to discriminate between (+) strands from the inoculum, and those resulting from viral amplification. This distinction is especially important immediately after transfection, when inoculum (+) strands could account for most of the (+) strand genomic RNA present in the sample. This obstacle was overcome by starting infection from a virus cDNA clone under the control of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter and *Agrobacterium tumefaciens nos* terminator. The use of this construct ensured constitutive transcription of inoculum (+) strands at stable levels throughout the experiment, or at least until the infection finally exhausts the cellular resources or significantly shuts down cellular processes. As we will show below, the constitutive expression of TuMV (+) RNA from the plasmid did not interfere with our ability to quantify the (+) molecules resulting from viral replication. Similarly, we will show that no (-) strands were produced from the plasmid. A simple mathematical model describing viral RNA accumulation

dynamics and correcting for the contribution of the viral (+) strands by continuous transcription from the 35S promoter was used to fit the experimental data. The quantitative data showed that in a single TuMV burst in protoplasts, viral RNA strands amplify asymmetrically with a final preponderance of the (+) strand of about two orders of magnitude. From the analyses of the model parameters we inferred that (+) and (-) amplification occur through a mixed strategy in which ~93% of genomes are produced by stamping machine amplification and only ~7% result from geometric growth.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Plasmid pTuMV contains an infectious TuMV cDNA clone obtained from calla lily (*Zantedeschia* sp.) infected with the TuMV isolate YC5 (Chen *et al.*, 2003), under the control of CaMV 35S promoter and *A. tumefaciens nos* terminator. The cloned TuMV sequence variant corresponds to Genbank accession number AF530055.2 with a few sequence variations. pTuMV-VNN is a derivative of pTuMV in which the tripeptide GDD (5'-GGAGATGAT-3', positions 5976-5984) in the active centre of the viral RNA polymerase Nib was mutated to VNN (5'-GTCAATAAT-3'). pTuMV-GFP is another derivative of pTuMV in which the TuMV cDNA is tagged with a green fluorescent protein (GFP) cDNA in between the Nib and coat protein (CP) cistrons. The GFP cDNA includes an artificial Nla-Pro proteolytic cleavage site that mediates GFP release from the viral polyprotein. pCP3'UTR+ and pCP3'UTR- contain the same TuMV cDNA encompassing the CP cistron and the 3' untranslated region (Bessaud *et al.*) (from position 8757 to 9832 in AF530055.2) under the control of bacteriophage T3 RNA polymerase promoter in opposite orientations. *In vitro* transcription with T3 RNA polymerase of these plasmids linearized with *Xba*I produce two partial-length TuMV RNA molecules (CP cistron plus 3' UTR) in (+) and (-) polarities.

Protoplast transfection

N. benthamiana Domin plants were grown under 16 h light at 23 °C and 8 h dark at 20 °C. For transfection experiments (Yoo *et al.*, 2007), aliquots of 1 g of fully expanded leaves cut into 1.5-2 mm strips were vacuum-infiltrated in 10 ml of enzyme solution (0.9 % cellulase RS, 0.4% macerozyme R10, 20 mM MES pH 5.7, 0.4 M mannitol, 20 mM KCl, 10 mM CaCl₂ and 0.1% BSA) for 5 min and incubated in the dark for 3 h at 24 °C. Released protoplasts were filtered through a 75-nm nylon mesh, recovered by centrifugation at 700 rpm for 1 min and washed by centrifugation in 10 ml of W5 solution (154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl and 2 mM MES pH 5.7). Protoplast concentration was adjusted to 10⁵ ml⁻¹ in W5, followed by incubation on ice for 30 min. Prior to transfection, protoplasts were pelleted and resuspended in MMg transfection solution (0.4 M manitol, 15 mM MgCl₂ and 4 mM MES pH 5.7) at a concentration of 10⁶ ml⁻¹. Aliquots of 100 µl protoplast suspension (10⁵ protoplasts) were mixed with 10 µl DNA (30 µg of the corresponding plasmid) and 110 µl of PEG-Ca transfection solution (40% polyethylene glycol 4000, 0.2 M mannitol, 100 mM CaCl₂ and 10% dymethyl sulfoxide). After 1 min incubation the transfection was stopped by adding 440 µl of W5 solution. The different aliquots of transfected protoplasts were combined, washed with W5 solution by centrifugation and divided in a number of aliquots containing 2×10⁵ protoplasts according to the time points in the experiment. Transfected protoplasts were incubated in a growth chamber under 16 h light at 24 °C and 8 h dark at 20 °C. At the selected time points, protoplasts were harvested by centrifugation at 700 rpm for 2 min, resuspended in Trizol reagent (Invitrogen) and stored at -80 °C for RNA extraction.

RNA purification

Total RNA was purified using the Trizol reagent. Contaminating DNA was digested with DNase I (Fermentas). Treated RNA was extracted with phenol:chloroform (1:1) pH 8.0, precipitated with isopropanol and resuspended in 12 µl H₂O. RNA concentration was measured spectrophotometrically (Nanodrop, Thermo Scientific).

RNA quantification

(+) and (-) TuMV RNA was quantified by RT-qPCR using the quantified partial-length TuMV RNAs (CP plus 3' UTR) of (+) and (-) polarities as standards. The (+) RNA standard ran from 1.28×10^8 to 4×10^4 molecules at 1/5-fold dilution intervals. The (-) RNA standard ran from 6.2×10^6 to 2×10^3 molecules also at 1/5-fold dilution intervals. The Primer Express program (Applied Biosystems) was used for primer design. Aliquots of 100 ng of protoplast total RNA were reverse transcribed in triplicate in the presence of 250 nM of either the (-) primer PI (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAATAACCCTTAACGCCAAGTAAG-3', non-viral 5' tag underlined, sequence complementary to TuMV Genbank accession AF530055.2 positions 9599-9620 non-underlined) or the (+) primer PII (5'-GGCCGTCATGGTGGCGAATAACAATACGTGCGAGAGAAGCACAC-3', non-viral 5' tag underlined, sequence homologous to TuMV positions 9448-9470 non-underlined) with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) in 20 μ l reactions for 30 min at 55 °C. Previous to reaction, primers were allowed to anneal by incubating 5 min at 70 °C and snap-cooling on ice. Reverse transcription reaction was stop by heating at 85 °C for 10 min. Sequence specific qPCR was performed in 20 μ l using the Maxima SYBR Green Master Mix reagent (Fermentas) at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 25 s at 79 °C. TuMV (+) RNA was quantified from 2 μ l of the reverse transcription reaction performed with primer PI by using 250 nM of primers PIII (5'-*AATAAATCATAA*CAATACGTGCGAGAGAAGCACAC-3', sequence homologous to TuMV positions 9448-9470 non-italicized) and PIV (5'-*AATAAATCATAA*GGCCGTCATGGTGGCGAATAA-3', sequence equal to the 5' tag of PI and PII underlined) and TuMV (-) RNA from 2 μ l of the reverse transcription reaction performed with primer PII by using 500 nM of primers PIV and PV (5'-*AATAAATCATAA*TAACCCTTAACGCCAAGTAAG-3', sequence complementary to TuMV positions 9599-9620 non-italicized). Primers PIII to PV contained 5' flaps (italicized sequence) to improve qPCR (Afonina *et al.*, 2007). Potential non-specific amplification products were monitored by a one cycle incubation of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 15 s at 95 °C.

Mathematical model and data analyses

Mathematical modeling of the accumulation dynamics of (+) and (–)

TuMV RNAs

In this section we present a simple unstructured model describing the dynamics of RNA virus accumulation that allows for the analysis of different modes of amplification. This mean field model describes the change over time of three state variables: p_{35S} , p_{repl} and m . Variable p_{35S} denotes the concentration of the (+) RNA molecules transcribed from the 35S promoter used to initiate the infection. The other two variables, p_{repl} and m , correspond, respectively, to the concentration of (+) and (–) RNA molecules produced by the viral replicase from the corresponding RNA template (see Figure 1 for a schematic description of the modeled system). The model is given by the following set of three ordinary differential equations:

$$\frac{dp_{35S}}{dt} = \tau\Phi - \delta_p p_{35S}, \quad (1)$$

$$\frac{dp_{repl}}{dt} = rm\Phi - \delta_p p_{repl}, \quad (2)$$

$$\frac{dm}{dt} = r_m(p_{35S} + p_{repl})\Phi - \delta_m m, \quad (3)$$

with

$$\Phi = 1 - (p_{35S} + p_{repl} + m)/K. \quad (4)$$

The function Φ imposes a logistic growth restriction to viral amplification due to finite cellular resources. Parameter K plays the role of the cellular carrying capacity (i.e., the maximum number of viral RNA molecules that can be produced in an infected cell). This type of growth constrain is a common assumption in replicators growing in finite systems (Murray, 1989). The parameter $\tau > 0$ is the rate of production of (+) RNA molecules from the cDNA under the control of the 35S promoter, which for simplicity is assumed to be time-independent. The parameters $\delta_p > 0$ and $\delta_m > 0$ are the degradation rates of (+) and (–) RNA molecules, respectively. The amplification rates of the viral (+) and (–) RNA molecules by the

viral replicase are given by the parameters $r > 0$ and $r_m > 0$, respectively. To model the asymmetry in the amplification of both polarities, we introduce a parameter $\alpha \in (0, 1]$, so the replication rate of (-) strains can be expressed as a function of the replication rate of the (+) strands: $r_m = \alpha r$. With $\alpha = 1$, both strands replicate at the same rate and thus replication is purely geometric. For values of $\alpha \rightarrow 0$, amplification will be closer to the stamping machine mode. Furthermore, it is plausible that as (+) RNAs accumulate in the cell, they may start inhibiting the synthesis of (-) strands by any kind of feed-back regulatory mechanism. Mathematically, this can be conveniently described by a Hill function

$$r_m = \frac{\alpha r}{1 + \psi p^\theta},$$

where ψ measures the negative effect of (+) strands on the synthesis of (-) ones and θ is the Hill exponent. For simplicity, we assume that (+) strands do not cooperate in inhibiting the synthesis of (-) templates and thus $\theta = 1$. If $\psi = 0$, (+) strands do not inhibit the synthesis of (-) ones and thus $r_m = \alpha r$. If $\psi > 0$, (+) strands inhibit the synthesis of (-) ones. In this case, the two extreme scenarios are: (i) if the concentration of (+) strands is low ($p \rightarrow 0$), the rate of (-) synthesis is still given by $r_m = \alpha r$; (ii) if the concentration of (+) strands is very large ($p \rightarrow \infty$), then $r_m \rightarrow 0$ and thus the synthesis of (-) strands has been effectively shutoff.

In practical terms, (+) RNA molecules synthesized from 35S transcription or viral replication are indistinguishable, therefore, the previous model can be reduced to a two-dimensional dynamical system by considering the whole pool of (+) RNA molecules as a single variable $p = p_{35S} + p_{repl}$. Then, from $dp/dt = dp_{35S}/dt + dp_{repl}/dt$, we obtain:

$$\frac{dp}{dt} = (\tau + rm)\Phi - \delta_p p \quad (4)$$

$$\frac{dm}{dt} = \frac{\alpha r}{1 + \psi p} p\Phi - \delta_m m \quad (5)$$

now with $\Phi = 1 - (p + m)/K$. Since the amplification of the viral strands by the viral replicase necessarily starts after the first (+) strands are transcribed from the cDNA, we assume as initial conditions $p(0) = m(0) = 0$.

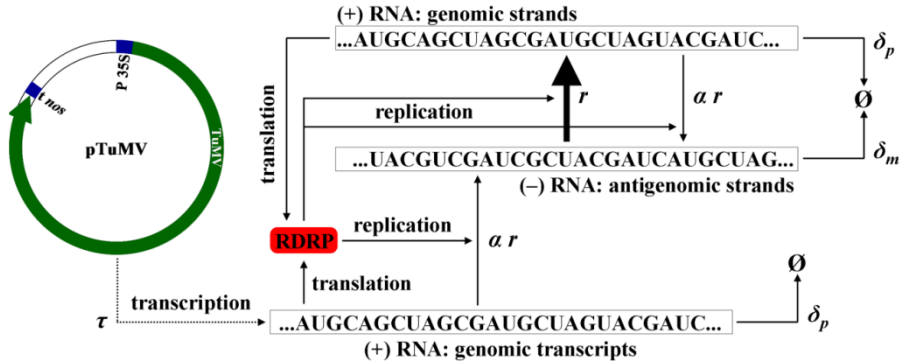


FIGURE 1.— Schematic representation of the dynamical system modeled with Equations (4) - (5). The model considers that after initiation of the cDNA transcription, a given sequence is replicated giving place to the complementary strand at a rate r . The parameter α takes into account the mode of replication. When $\alpha = 1$, the replication is geometric whereas α close to zero represent the stamping machine. Degradation rates for the genomic and antigenomic strands are described by the parameters δ_p and δ_m , respectively. TuMV cDNA transcription from plasmid pTuMV is driven by CaMV 35S promoter (P 35S) and *A. tumefaciens nos* terminator (t nos) at a rate τ .

Model fitting algorithm

Equations (4) and (5) were used to fit the data sets using a Monte Carlo simulated annealing (MCSA) method (Kirkpatrick *et al.*, 1983). For each experiment, data values were first normalized by dividing each time series by the maximum value in the list (in all the cases for (+) strands). Equations (4) and (5) were then used to generate simulated time-series using the fourth-order Runge-Kutta method with a constant time step size $\Delta t = 0.01$ h, and a total number of 8000 iterations, which resulted in a similar time scale to the one used in the experiments (i.e., 80 h). The MCSA algorithm searches possible parameter configurations such as that the sum of the squares of the deviations between the experimental and the simulated data is minimized. Specifically, S_p and S_m are the least-squares computed, respectively, from the data for (+) and (-) strands, with $S_k = \sum_i (y_i - \phi_k(x_i, \mathbf{b}))^2$, $k \in \{p, m\}$.

Here y_i corresponds to the experimental value at time i , and $\varphi_k(x_i, \mathbf{b})$ is the value of variable k obtained numerically from the model at time i and $\mathbf{b} = \{\alpha, r, \tau, K, \delta_p, \delta_m, \psi\}$ is a vector containing all the parameters of the mathematical model. The least-squares are computed by means of all the residuals for all the available replicas at each time point. For the simultaneous optimization of S_p and S_m a Pareto objective function, $S = \lambda S_p + (1 - \lambda) S_m$, was constructed with $\lambda = 0.5$. The following rules were applied during the optimization process: (i) small random modifications were introduced to all the parameters in vector \mathbf{b} ; (ii) using this modified \mathbf{b} , the corresponding time series were obtained numerically from Equations (4) and (5); (iii) a new objective function (S_{new}) was computed; and (iv) if the new parameters improved S (i.e., $S_{new} \leq S$), then the parameters were accepted and $S = S_{new}$. Otherwise, the new set of parameters was accepted with probability $\exp(-\Delta S/T)$, where $\Delta S = S_{new} - S$, and T is a temperature parameter that decreases exponentially with the number of iterations ($10^{-2} \leq T \leq 10^{-4}$). The process (i) – (iv) was iterated 10^5 times. The parameter values reported for each experimental set were computed as the median from 500 independent runs of the MCSA algorithm. 95% confidence intervals were constructed from the 2.5% and 97.5% quantils.

RESULTS

Strand-specific quantification of viral RNA by RT-qPCR

The quantification of TuMV (+) and (–) strands in protoplasts at short times post-transfection requires a technique with a low detection limit, such as RT-qPCR. However, it has been repeatedly demonstrated that this technique must be carefully optimized to achieve strand-specific detection (Besasaud *et al.*, 2008; Plaskon *et al.*, 2009; Tuiskunen *et al.*, 2010). To quantify (+) and (–) TuMV strands by RT-qPCR, the amplification of a 173-bp cDNA fragment at the end of CP cistron (positions 9,448-9,620 in Genbank accession AF530055.2) was selected using a qPCR primer design program. Two RNA species corresponding to the TuMV CP cistron plus the

3' UTR in both (+) and (-) polarities were synthesized by *in vitro* transcription. These two RNAs were used as standards and to optimize the quantification protocol. Optimal strand-specific RT-qPCR amplification was obtained only when the RT reactions were performed at a temperature as high as 55 °C and when the RT primers were tagged at the 5' ends with specific non-viral sequences used subsequently for the qPCR primers as described by (Plaskon *et al.*, 2009)(Figure 2A). qPCR primers also included AT-rich 5' flaps to improve the quantification (Afonina *et al.*, 2007) (Figure 2A). The control experiment in Figure 2B shows detection by RT-qPCR of different amounts of TuMV (-) RNA, ranging from 10^3 to 10^7 molecules, with no interference of 10^6 copies of complementary TuMV (+) RNA in a preparation of plant protoplast total RNA. The two standard curves obtained in the absence and in the presence of 10^6 TuMV (+) RNA molecules were similar, with slopes of -3.675 ± 0.030 and $-3.539 \pm 0,092$ and R^2 values of 0.999 and 0.991, respectively. The calculated amplification efficiencies were 87.12% and 92.03%, respectively. Figure 2B also shows the standard curve obtained for the RNA (+), which has a slope of -3.692 ± 0.042 ($R^2 = 0.998$) and amplification efficiency of 86.58%.

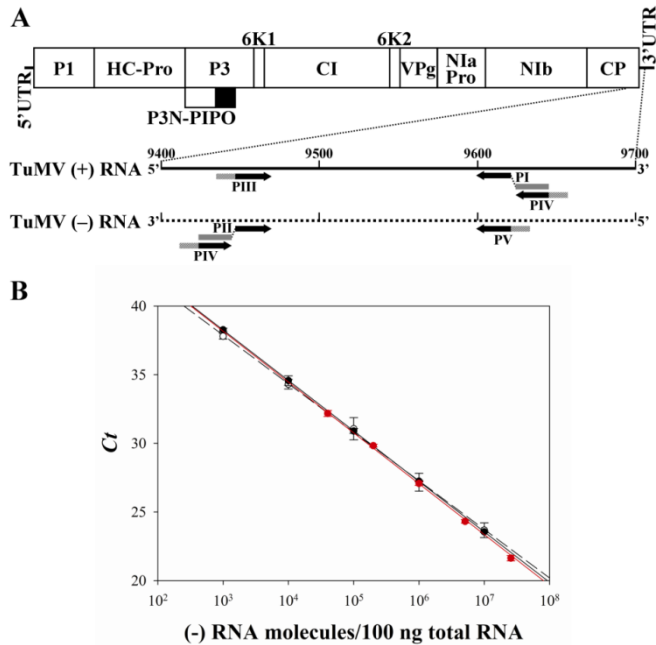


Fig. 2.- (A) Diagram describing the primers used in the strand-specific RT-qPCR amplification to quantify the (+) and (-) TuMV RNAs. The RT primers (PI and PII) were tagged at the 5' end with specific non-viral sequences (gray rectangles). The qPCR primers (PIII to PV) were tagged at the 5' end with AT-rich flaps (striped rectangles). Indicated in the diagram are the positions of TuMV genome untranslated regions (5'UTR and 3'UTR) and cistrons (P1, HC-Pro, P3, P3N-PIPO, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaPro, NIb and CP). (B) Strand-specific quantification of TuMV RNAs by RT-qPCR. Black symbols correspond to the standard curves obtained for the RNA (-) in the absence (solid circles and continuous line) or in the presence (open circles and dash line) of a competing amount of 10^6 TuMV (+) RNA molecules. Red symbols correspond to the standard curves obtained for the RNA (+). The average of three replicate determinations of the C_t parameter is plotted versus the amount of TuMV RNA molecules per 100 ng of plant total RNA evaluated spectrophotometrically. Bars indicate ± 1 SD.

Transfection of *N. benthamiana* protoplasts with TuMV cDNA

To study the dynamics of (+) and (-) TuMV RNA accumulation during replication in single-cells, we transfected *N. benthamiana* protoplasts. *N. benthamiana* is a well-established experimental host for this virus. The idea of using virions or purified viral RNA was discarded because this kind of inoculum cannot be entirely removed after transfection, and the remains would interfere with the subsequent quantification of viral RNA. Therefore, transfection with plasmid DNA containing

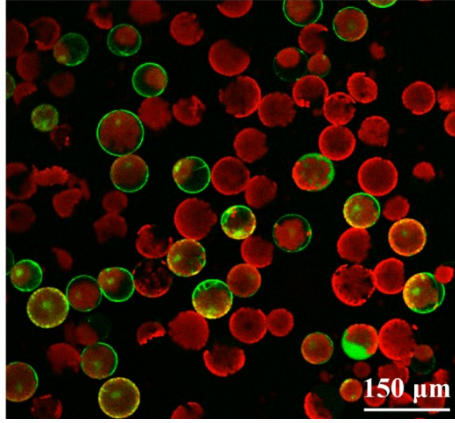
an infectious TuMV cDNA clone under 35S promoter and *nos* terminator control was chosen. This inoculum does not interfere with subsequent RNA quantification. In this case, infection is started by the synthesis of copies of TuMV (+) RNA in transfected protoplasts. To control for transfection efficiency in different experiments, a plasmid containing the same TuMV cDNA clone tagged with GFP, TuMV-GFP, was used.

Protoplasts obtained from adult *N. benthamiana* leaves were transfected with plasmid DNA preparations at a ratio of 30 µg DNA per 10⁶ protoplasts. Immediately after transfection, protoplasts were washed, aliquoted and incubated in culture medium. At different times post-transfection total RNA was purified, minor amounts of contaminating DNA exhaustively removed by digestion with DNase I, and TuMV (+) and (-) strands quantified by RT-qPCR. When TuMV-GFP was transfected in a control experiment, a fraction of the protoplasts showed an intense green fluorescence 48 h after transfection when observed under the fluorescence microscope (Figure 3A). Observation under the fluorescence microscope of the protoplast aliquots transfected with TuMV-GFP at 48 h post-transfection indicated that the average transfection efficiency for this control plasmid in the three independent experiments was 37.5% (± 2.5).

Transfection of *N. benthamiana* protoplasts with replication-defective TuMV-VNN results in no accumulation of (-) strands

Plasmid-driven transcription of TuMV (+) RNA continued throughout the experiment, contributing to the overall amount of TuMV (+) RNA. Therefore, it is important to evaluate the contribution of this source of (+) RNA to the total amount as well as to confirm that no (-) strands are produced from the plasmid. To this ends, a plasmid containing TuMV with the lethal triple mutation GDD to VNN in the active core of the viral RNA polymerase N1b, TuMV-VNN, was used. The amount of TuMV (+) RNA per 100 ng of plant total RNA was quantified in triplicate at different times post-transfection in four transfection experiments (Figure 3B). Very importantly, no (-) strands were detected at all in any of the four experiments, thus

A



B

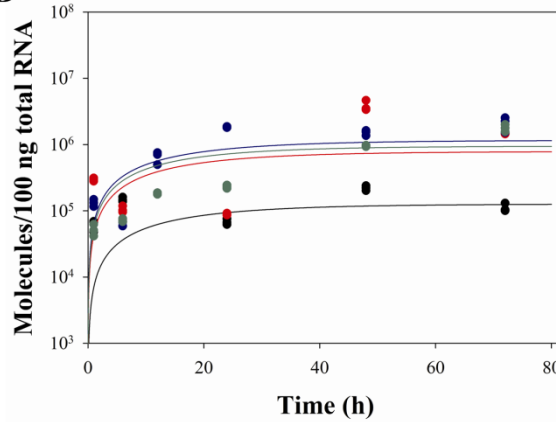


Fig. 3.- (A) *N. benthamiana* protoplasts infected by TuMV-GFP. Fluorescence micrograph at 48 h post-transfection showing GFP expression in the fraction of protoplasts that resulted infected with TuMV-GFP. (B) Accumulation dynamics of (+) TuMV RNA in *N. benthamiana* protoplasts transfected with a plasmid expressing the replication-defective TuMV-VNN mutant. Plot of TuMV (+) RNA molecules in 100 ng of plant total RNA versus time in four independent transfection experiments. Each experimental data correspond to the average of three qRT-PCR determinations. Different experiments are represented with different colors. Solid lines represent the best fit of Equation (6) to the control data.

discarding the possibility of these strands being produced from the cDNA. Since (−) did not accumulate in this experiment, Equation (1) can be simplified to

$$\frac{dp_{35S}}{dt} = \tau \left(1 - \frac{p_{35S}}{K} \right) - \delta_p p_{35S} \quad (6)$$

and it can be fitted to the data shown in Figure 3B using the MCSA method, allowing to estimate the corresponding parameters (the solid lines represent the best fittings). On average, the 35S promoter produced (+) strands at a rate $\tau = 0.0653$ molecules/h (95% CI: 0.0012, 0.0821) and strands were degraded at a rate $\delta_p = 0.0610$ molecules/h (95% CI: 0.0017, 0.0839). Synthesis and degradation of (+) strands reached an equilibrium value of $K = 5.105 \times 10^6$ molecules (95% CI: 4.659×10^6 , 5.543×10^6).

***N. benthamiana* protoplasts transfected with the wild-type TuMV accumulate RNAs of both polarities**

Using optimized RT-qPCR conditions that allow for strand-specific quantification of TuMV (+) and (–) RNA molecules, three independent transfection experiments were performed. For protoplasts transfected with TuMV, aliquots were taken at different times post-transfection, total RNA purified and the (+) and (–) TuMV RNA quantified in triplicate. The number of TuMV (+) and (–) RNA molecules per 100 ng of plant total RNA was calculated from standard curves obtained under the same conditions with *in vitro* synthesized standards (Figure 4).

First, we sought for differences in the accumulation levels after transfecting protoplasts with wild-type TuMV (Figure 4) and with TuMV-VNN (Figure 3B). A general linear model was fitted to the accumulation data to assess for differences between the amounts of (+) RNA accumulated. Both, the genotype of the virus in the inoculum and the experimental replicates were treated as random factors, with the second factor nested within the first. Time was treated as a covariable. First, a significant positive effect of time on the amount of (+) RNA measured was observed ($\chi^2 = 225.677$, 1 d.f., $P < 0.001$). Second, the accumulation of (+) RNA was, overall, 7.3-fold larger for TuMV than for the non-replicative defective virus, a significant difference ($\chi^2 = 25.812$, 1 d.f., $P < 0.001$), reflecting the contribution of TuMV replication via intermediary (–) RNAs in the former case. Finally, significant differences between replicates exist in both types of experiments ($\chi^2 = 79.744$, 5 d.f.,

$P < 0.001$). This difference will be explained in terms of model parameters in the following section.

Therefore, we conclude that our experimental setup allows for (i) detecting the accumulation of (–) in a highly efficient manner and (ii) to account for the accumulation of (+) strands due to viral replication from those produced by constitutive transcription from the plasmid.

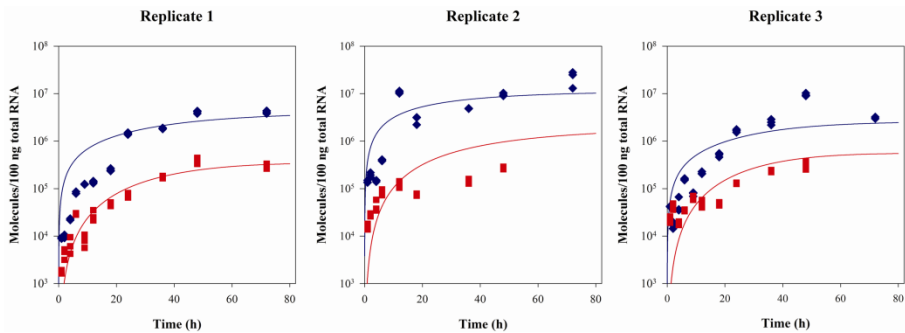


Fig. 4.- Accumulation dynamics of (+) and (–) TuMV RNA in infected *N. benthamiana* protoplasts. Plot of TuMV (+) (blue diamonds) and (–) (red squares) RNA molecules in 100 ng of plant total RNA versus time in three independent transfection experiments. For each time point (+) and (–) RNAs were determined by triplicate. Solid lines represent the best fit of Equations (4) – (5) to the data: (+) strands in blue, (–) strands in red.

Model fitting to experimental data and parameter determination

Figure 4 illustrates the results of the MCSA best fitting of Equations (4) – (5) to the experimental data. Table 1 shows the parameter values estimated for all three replicates as well as the values estimated after pooling together all the available data (last column). The three experiments rendered fully consistent estimates (overlapping 95% CI) for r , δ_p , δ_m , K , τ , and ψ and a minor discrepancy among experiments for α . Estimates of α were homogeneous for replicates 1 and 2, and significantly larger for replicate 3 (its 95% CI did not overlap with those obtained for the other two replicates). Indeed, this heterogeneity in α explains the significant differences among accumulation curves described in the previous section. In all cases, the 95% confidence intervals of the estimated parameters excluded zero, supporting their statistical significance.

The observed asymmetry in the accumulation of both RNA polarities may result from two sources: (i) a preponderance of stamping machine, measured in our model by the parameter α , and (ii) any potential inhibition that (+) strands may have on the synthesis of (-) templates, measured by the parameter ψ . This second possibility, indeed, is particularly worrisome in our experiments due to the constant input of (+) RNA molecules transcribed from the plasmid. In all three cases, the amplification asymmetry parameter, α , was closer to zero than to one, thus indicating that TuMV replication was mainly dominated by the stamping machine. Indeed, the results are compatible with a picture in which, on average, $100 \times (1 - 0.0743) = 92.57\%$ of all TuMV genomes produced during a single cycle of cell infection are so by means of the stamping machine mode while only a minor proportion would result from additional rounds of geometric amplification. The estimated ψ value was significantly larger than zero, although very small. Indeed, the rate of synthesis of (-) strands would be halved only if the concentration of (+) strands becomes $1/\psi = 3.494 \times 10^7$ molecules, a value that is only reached at the very end of our experiments and that is close to the carrying capacity K (Table 1). Therefore, we conclude that the observed asymmetry in the accumulation of both strains is mostly driven by the stamping machine mechanism of replication and not by the inhibition of the synthesis of (-) strands as (+) ones accumulated.

The comparison between the transcription rate from the cDNA 35S promoter, τ , and the synthesis of viral (+) RNAs by the viral replicase, r , shows that, on average, 7.4 times more molecules resulted from viral replication than from transcription of the cDNA. The difference between both rates was highly significant as confirmed by the non-overlapping 95% CIs. This difference is in good agreement with the excess of (+) RNAs accumulated by the replicative virus relative to the non-replicative one (Figure 3B and related statistical analyses). On average, the degradation rate of the (+) RNAs, δ_p , was 2.5 times lower than estimated for the (-) RNA molecules, δ_m . This asymmetry in the degradation rates could be easily explained by (+) RNAs being protected from degradation by RNases by the binding of VPg at 5', the existence of the 3' poly(A) tail and, obviously, encapsidation. However, the

observed difference was not statistically significant due to the large overlap between the associated 95% CIs. The overall rate of (+) RNA synthesis ($\tau + r$) was, on average, 28.0 fold greater than its degradation rate, δ_p , suggesting that for the time frame of the experiments, RNA degradation played a negligible role.

Finally, it is worth mentioning that the estimates of τ and δ_p obtained from the control experiments with TuMV-VNN (Figure 3B) did not statistically differ from the above ones (overlapping 95% CIs)

Table 1. Model parameters estimated by MCSA. Each one of the three experimental replicates has been fitted to the model independently. Confidence limits represent the 95% confidence intervals obtained from 500 realizations of the numerical optimization process.

Parameter (units)	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Average values
α	0.0622 (0.0346, 0.1023)	0.0654 (0.0094, 0.1114)	0.1695 (0.1351, 0.2084)	0.0743 (0.0264, 0.1941)
r (molecules/h)	0.1217 (0.0937, 0.1707)	0.1175 (0.0658, 0.1703)	0.1220 (0.0981, 0.1691)	0.1211 (0.0758, 0.1704)
δ_p (molecules/h)	1.088×10^{-4} (1.790×10^{-6} , 0.0076)	0.0286 (0.0063, 0.0606)	0.0040 (8.554×10^{-4} , 0.0137)	0.0049 (5.508×10^{-6} , 0.0544)
δ_m (molecules/h)	0.0081 (4.332×10^{-4} , 0.0396)	0.0184 (0.0012, 0.0674)	0.0141 (0.0028, 0.0443)	0.0121 (8.107×10^{-4} , 0.0564)
K (molecules)	4.694×10^7 (4.561×10^7 , 4.887×10^7)	3.061×10^7 (2.936×10^7 , 3.222×10^7)	3.537×10^7 (3.399×10^7 , 3.659×10^7)	4.694×10^7 (3.460×10^7 , 3.158×10^8)
τ (molecules/h)	0.0170 (0.0132, 0.0212)	0.0132 (0.0086, 0.0204)	0.0167 (0.0144, 0.0191)	0.0163 (0.0094, 0.0204)
ψ (1/molecules)	3.340×10^{-8} (4.154×10^{-9} , 7.717×10^{-8})	7.159×10^{-9} (6.880×10^{-10} , 1.689×10^{-8})	4.581×10^{-8} (5.486×10^{-9} , 1.161×10^{-7})	2.862×10^{-8} (1.602×10^{-9} , 9.240×10^{-8})

DISCUSSION

The amplification dynamics of the (+) and (-) strands occurring during the replication of a (+) strand RNA virus like TuMV is a fundamental parameter to understand the accumulation of mutations in viral populations. Moreover, it is therefore relevant for understanding phenomena such as interactions between the virus and host defensive systems, and viral emergence or adaptation to new hosts. This dynamics also reflects certain aspects of virus molecular biology, such as the fraction of viral genomic RNA that acts as a template for amplification or translation, during each moment of the replication cycle. Pioneering studies have shown that in the case of (+) strand RNA viruses, RNA replication is asymmetric and that the prevalence of (+) strand results is several orders of magnitude higher than (-) strands from the replication process. In this work our aim was to establish the dynamics of (+) and (-) strand accumulation of TuMV during a single replication cycle in *N. benthamiana* protoplasts. Previous works have reported differences in the accumulation of (+) and (-) sense strands for plant viruses (Palani and Lin, 2007), but none of them provided dynamical accumulation data and, hence, it was not possible to make inferences about the underlying dynamics of production of strands of both polarities.

The RT-qPCR technique used in this work is suitable for detecting low levels of viral RNAs produced early in the infection process. However, as has been repeatedly reported, this technique lacks strand specificity (Afonina *et al.*, 2007; Bessaud *et al.*, 2008), presenting a serious challenge at determining both (+) and (-) strand amplification dynamics. One of the reasons proposed to explain this lack of strand specificity is the ability of reverse transcriptases to use very short primers, including RNA primers, which facilitates heterologous priming and RNA self-priming during the RT reaction (Tuiskunen *et al.*, 2010). Plaskon *et al.* (2009) solved this problem in the case of O'nyang-nyang virus RNA by using RT primers tagged with specific 5' non-viral sequences and using one qPCR primer consisting of this non-viral sequence. The use of this strategy in our work (Figure 2A) allowed accurate quantification of as low as 10^3 molecules of TuMV (-) RNA in a preparation of total

RNA from *N. benthamiana* protoplasts (Figure 2B). The qPCR primers used in this work also included AT-rich flaps (Figure 2A), previously shown to improve qPCR performance (Afonina *et al.*, 2007).

Another methodological challenge for the accurate determination of the viral (+) and (-) RNA accumulation dynamics is the interfering effect of the material used to start the infection. Viral RNA coming from an *in vitro* transcription or a virion preparation cannot be entirely removed after transfection or infection, interfering with subsequent virus RNA determination. In this work this problem is solved by starting infection with a TuMV cDNA under the control of the 35S promoter and *nos* terminator. The use of a replication-defective TuMV mutant (TuMV-VNN) allowed for a correction for TuMV (+) RNA coming from 35S-driven transcription (Figure 3) versus that coming from viral replication. Our mathematical analyses confirm the validity of this approach. In fact, the rate of production of TuMV (+) RNA by the viral replicase is ~7 times larger than the production of transcripts driven by the 35S promoter.

Once the RNA accumulation curves were determined, we estimated by means of a dynamical mathematical model which part of the viral progeny comes from a geometric growth process, and what part from a stamping machine amplification mode. Our results support the view that TuMV amplification follows a mixed strategy, which is largely dominated by the stamping machine mode (~93%). What are the evolutionary consequences of such a conservative replication strategy? If replication was purely geometric, then the expected fraction of mutant genomes produced per infected cell would depend on the number of replication rounds, k , according to the expression $1 - e^{-ku}$, where u is the genomic mutation rate. By contrast, if replication proceeds as a pure stamping machine, this fraction is independent of k and given by the expression $1 - e^{-u}$. The estimates of k and u recently obtained for another closely related potyvirus, *Tobacco etch virus* (Tomas and Elena, 2010), can be used to evaluate these two expressions: $u = 0.045$ and $k = 13.4$. In the case of a pure geometric model, 45.28% of genomes produced will be mutant, whereas in the case of a pure stamping machine, this number is reduced to 4.40%. Therefore, for a mixed replication model as that described here for TuMV,

the fraction of mutant genomes can be computed as $0.9257 \times 0.0440 + (1 - 0.9257) \times 0.4528 = 0.0744$. In other words, during TuMV replication, only 7.4% of the (+) RNA genomes produced will be mutants. Of course this computation should be taken with caution given the uncertainties associated with the actual values of k and u for TuMV.

By lowering the number of mutant genomes produced per cell infection, the stamping machine can be considered as a mechanism of mutational avoidance and, somehow a way of increasing population robustness against mutations. Robustness is defined as a reduced sensitivity to perturbations affecting phenotypic expression. It has been proposed that several mechanisms may contribute to the robustness of RNA virus populations (Elena *et al.*, 2006), some being intrinsic to virus replication (e.g., complementation, neutrality), while others are extrinsic and the consequence of the exploitation of cellular buffering mechanisms (e.g., heat-shock chaperones). Viruses as different as TuMV (here), $\phi 6$ (Chao *et al.*, 2002) and $\phi X174$ (Denhardt and Silver, 1966) have been shown to replicate mostly via the stamping machine mode, suggesting that selection may have operated on independent viral lineages to favor this replicative strategy, perhaps as a way of reducing the population mutational load.

Perhaps it needs to be highlighted that our experimental protocol only allowed for a single cycle of cell infection. Accordingly, our mathematical model only simulates the replication process within an infected cell, and what we demonstrate here is that intracellular TuMV amplification mainly follows a stamping machine strategy. However, it must be taken into consideration that within a multicellular host, virus population growth, as a first approximation, will still be a geometric process with rate R , where R stands for the average number of newly infected cells per already infected one. This population growth dynamics explains why viral population can reach very large sizes in very short times; despite the actual RNA replication mechanism may be linear.

Our interdisciplinary work provides a dynamical characterization for the intracellular accumulation of viral RNA genomes and the estimates for key parameters tied to replication obtained from a simple mathematical model. The

availability of biologically meaningful parameters obtained from *in vivo* quantification experiments is important for further investigations, especially for the fields of theoretical or computational biology.

ACKNOWLEDGEMENTS

Special thanks are due to Javier García-Andrade for his generous help and useful suggestions in protoplast transfection work, to Javier Carrera for help with the MCSA algorithm, Mark P. Zwart for critical reading of the manuscript, and two anonymous reviewers for insightful comments and suggestions. FM is the recipient of a predoctoral fellowship from Universidad Politécnica de Valencia. This work has been supported by grants BIO2008-01986 (Krause-Sakate *et al.*) and BFU2009-06993 (SFE) from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, RGP2008/12 from the Human Frontier Science Program Organization and PROMETEO/2010/019 from the Generalitat Valenciana. We also acknowledge support from the Santa Fe Institute.

LITERATURE CITED

Afonina, I., Ankoudinova, I., Mills, A., Lokhov, S., Huynh, P. *et al.* 2007 Primers with 5' flaps improve real-time PCR. *Biotechniques* **43**: 770-774.

Bessaud, M., Autret, A., Jegouic, S., Balanant, J., Joffret, M. L. *et al.* 2008 Development of a Taqman RT-PCR assay for the detection and quantification of negatively stranded RNA of human enteroviruses: evidence for false-priming and improvement by tagged RT-PCR. *J. Virol. Meth.* **153**: 182-189.

Chao, L., Rang, C. U., Wong, L. E. 2002 Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage $\phi 6$. *J. Virol.* **76**: 3276-3281.

Chen, C. C., Chao, C. H., Chen, C. C., Yeh, S. D., Tsai H. T. *et al.* 2003 Identification of *Turnip mosaic virus* isolates causing yellow stripe and spot on calla lily. *Plant Dis.* **87**: 901-905.

Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F., Firth, A. E. 2008 An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 5897-5902.

Den Boon, J. A., Diaz, A., Ahlquist, P. 2010 Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host Microbe* **8**: 77-85.

Denhardt, D. T., and Silver, R. B. 1966 An analysis of the clone size distribution of ϕ X174 mutants and recombinants. *Virology* **30**: 10-19.

Drake, J. W. 1993 Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4171-4175.

Drake, J. W., and Holland, J. J. 1999 Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13910-13913.

Duffy, S., Shackelton, L. A., Holmes, E. C. 2008 Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 267-276.

Elena, S. F., Carrasco, P., Daròs, J. A., Sanjuán, R. 2006 Mechanisms of genetic robustness in RNA viruses. *EMBO Rep.* **7**: 168-173.

Elena, S. F., and Sanjuán, R. 2005 Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. *J. Virol.* **79**: 11555-11558.

Ferrer-Orta, C., Arias, A., Escarmís, C., Verdaguer, N. 2006 A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 27-34.

Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. Jr., Vecchi, M. P. 1983 Optimization by simulated annealing. *Science* **220**: 671-680.

Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nagasaki, K., Dolja, V. V. 2008 The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 925-939.

Laliberté, J. F., and Sanfaçon, H. 2010 Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**: 69-91.

Murray, J. D. 1989 *Mathematical Biology*. Springer Verlag, New York.

Palani, P. V., and Lin, N. S. 2007 Northern analysis of viral plus- and minus-strand RNAs. *Curr. Prot. Microbiol.* **16**: 16e3.

Plaskon, N. E., Adelman, Z. N., Myles, K. M. 2009 Accurate strand-specific quantification of viral RNA. *PLoS ONE* **4**: e7468.

Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., Belshaw, R. 2010 Viral mutation rates. *J. Virol.* **84**: 9733-9748.

Sardanyés, J., Solé, R. V., Elena, S. F. 2009 Replication mode and landscape topology differentially affect RNA virus mutational load and robustness. *J. Virol.* **83**: 12579-12589.

Thébaud, G., Chadoeuf, J., Morelli, M. J., McCauley, J. W., Haydon, D. T. 2010 The relationship between mutation frequency and replication strategy in positive-sense single-stranded RNA viruses. *Proc. R. Soc. B* **277**: 809-817.

Tromas, N., and Elena, S. F. 2010 The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus. *Genetics* **185**: 983-989.

Tuiskunen, A., Leparc-Goffart, I., Boubis, L., Monteil, V., Klingström J. et al. 2010 Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *J. Gen. Virol.* **91**: 1019-1027.

Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., Bernardi, F. 2001 Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* **74**: 157-175.

Yoo, S. D., Cho, Y. H., Sheen, J. 2007 *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**: 1565-1572.



CAPÍTULO II





Ultradeep Sequencing Analysis of Population Dynamics of Virus Escape Mutants in RNAi-Mediated Resistant Plants

Fernando Martínez,¹ Guillaume Lafforgue,¹ Marco J. Morelli,²
Fernando González-Candelas³, Nam-Hai Chua,⁴ José-Antonio
Daròs,¹ Santiago F. Elena^{*,1,5}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain.

²Institute of Biodiversity, Animal Health & Comparative Medicine, College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK.

³Unidad Mixta Genómica y Salud, Centro Superior de Investigación en Salud Pública-Instituto *Cavanilles* de Biodiversitat i Biologia Evolutiva, Universitat de València, 46071 València, Spain.

⁴Laboratory of Plant Biology, Rockefeller University, New York, NY 10065, USA.

⁵The Santa Fe Institute, Santa Fe, NM 87501, USA.

*Corresponding author: E-mail: sfelena@ibmcp.upv.es

Molecular Biology and Evolution (2012) 29(11):3297-3307

ABSTRACT

Plant artificial microRNAs (amiRs) have been engineered to target viral genomes and induce their degradation. However, the exceptional evolutionary plasticity of RNA viruses threatens the durability of the resistance conferred by these amiRs. It has recently been shown that viral populations not experiencing strong selective pressure from an antiviral amiR may already contain enough genetic variability in the targeted sequence to escape plant resistance in an almost deterministic manner. Furthermore, it has also been shown that viral populations exposed to sub-inhibitory concentrations of the antiviral amiR speed up this process. In this article, we have characterized the molecular evolutionary dynamics of an amiR target sequence in a viral genome under both conditions. The use of Illumina ultra-deep sequencing allowed us to identify virus sequence variants at frequencies as low as 2×10^{-6} and to track their variation in time before and after the viral population was able of successfully infecting plants fully resistant to the ancestral virus. We found that every site in amiR-target sequence of the viral genome presented variation and that the variant that eventually broke resistance was randomly sampled among the many coexisting ones. For this system, viral evolution in fully susceptible plants results from an equilibrium between mutation and genetic drift, whereas evolution in partially resistant plants originates from a more complex dynamics involving mutation, selection and drift.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are short RNAs found in eukaryotic cells that operate as post-transcriptional regulators of gene expression (He and Hannon, 2004). They regulate the abundance of target mRNAs by guiding the RNA-induced silencing complex (RISC) to cleave the corresponding complementary sequence. As changes within the miRNA 21-nt sequence do not affect miRNA biogenesis and maturation (Vaucheret *et al.*, 2004; Guo, *et al.*, 2005) it is possible to redesign the miRNA sequence to target different transcripts using different pre-miRNAs as backbones (Niu *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007; Warthman *et al.*, 2008). One application of this technology is to produce plants expressing artificial miRNAs (amiRs) targeting viral genomes, thus conferring the host resistance to viral infection (Niu *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007). Niu *et al.*, (2006) used the pre-miRNA159a precursor as backbone to construct two different amiR159 with sequences complementary to the RNA genome of *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) and *Turnip mosaic virus* (TuMV), respectively. In short, the original sequences forming the stem of the pre-miRNA159a were replaced by the corresponding viral target sequences in complementary polarities to maintain the correct stem-loop structure and subsequent processing by the DCL1 nuclease (Niu *et al.*, 2006). Transgenic expression of the amiRs in *Arabidopsis thaliana* conferred high levels of specific resistance against the corresponding virus. Similarly, a gene-silencing mechanism (RNAi) has been used in *in vitro* assays as antiviral therapeutics to inhibit the replication of human viruses such as *Human immunodeficiency virus* type 1 (HIV-1; Coburn *et al.*, 2002), *Hepatitis C virus* (Krönke *et al.*, 2004) and *Influenza A virus* (Ge *et al.*, 2003). In all these experiments, a single amiR was expressed, and thus, resistance strictly depended on the match between this amiR and the corresponding viral sequence.

A major issue confronting these amiR-based antiviral strategies has been the emergence of resistant virus variants (Boden *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2004; Gitlin *et al.*, 2005; Westerhout *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Lafforgue *et al.*, 2011). These variants differ from the wild-type virus by at least one point mutation in the 21-nt

target leading to imperfect matching with the corresponding amiR and hence to inefficient or ineffective processing by RISC (Westerhout *et al.*, 2005; Sabariegos *et al.*, 2006; von Eije *et al.*, 2008). Although the RNAi machinery tolerates changes in some positions of the 21-nt target, it is sensitive to changes in some others, particularly at the center of the target site (Elbashir *et al.*, 2001; Westerhout and Berkhout, 2007; Lin *et al.*, 2009). Moreover, it has been shown that the 21 TuMV genotypes resulting from introducing every single synonymous mutation in the 21-nt target that successfully infected transgenic plants expressing amiR accumulated additional changes at alternative sites within the 21-nt target, further jeopardizing the resistance of the transgenic plants (Lin *et al.*, 2009).

Taken together, these results show that changes in the 21-nt target sequence may generate virus escape variants. However, the relevance of these escape variants in natural viral populations has not been clarified. In other words, to evaluate the viability of antiviral therapies based on the transgenic expression of amiRs in plants, it is essential to understand how likely viral populations are to contain escape variants, which may be subsequently transmitted to the immunized individuals. Moreover, it is also crucial to evaluate whether variations in the expression of the amiR transgenes in different tissues or at different stages of plant development, especially at sub-inhibitory concentrations, might affect the accumulation and evolution of viral escape mutants. More specifically, we are interested in addressing the following issues: (1) What is the likelihood of virus escape mutations arising and accumulating in a wild-type (WT) host population? (2) Does partial resistance favor the accumulation of escape mutants? (3) At what frequency are these mutant viruses maintained in susceptible hosts? and (4) What sites in the 21-nt target are more critical for escaping from the amiR surveillance?

To address the first of these issues, in a previous study, we experimentally evolved independent lineages of TuMV (family *Potyviridae*) in susceptible WT *A. thaliana* plants. At each passage until resistance was broken (Lafforgue *et al.*, 2011), we evaluated the infectivity of the evolving populations in transgenic *A. thaliana* plants (line 12-4) that were fully resistant to the ancestral virus due to high-level expression of amiR159-HCPro, an engineered variant of miRNA159 that is

complementary to 21 nt within the TuMV cistron that encodes for the multifunctional protein HC-Pro (Niu *et al.*, 2006). In the same work, we addressed the second issue, by evolving in the same way 25 additional TuMV lineages in *A. thaliana* transgenic plants (line 10-4) expressing the amiR159-HCPro at sub-inhibitory concentrations. Our results showed that TuMV populations replicating in both susceptible hosts (WT and 10-4) accumulated resistance-breaking alleles, resulting in overcoming the resistance of 12-4 plants. The rate at which resistance was broken was significantly faster for TuMV populations that experienced sub-inhibitory concentrations of the antiviral amiR159-HCPro during their evolution, thus suggesting that TuMV escape alleles were at higher frequencies in the partially resistant plants, possibly because of a selective advantage. This previous study mainly focused on making quantitative inferences about the likelihood of resistance breaking. We confirmed that resistance-breaking had a genetic basis by characterizing the consensus sequence of the TuMV population isolated from the 12-4 resistant plants that first showed infection symptoms. However, we did not determine whether escape mutants were already present in the evolving populations before being inoculated in the 12-4 plants nor the level of polymorphism in the population replicating in these plants (especially whether it contained a fraction of non-resistant TuMV genotypes).

To address these issues, classical Sanger dideoxynucleotide sequencing methods are not adequate, as they only allow for the detection of viral variants present in the population at frequencies around 2×10^{-1} (e.g., Zagordi *et al.*, 2011). On the other hand, next-generation sequencing (Tuiskunen *et al.*) techniques can generate a massive amount of genetic data, which can be used to detect variants at much lower frequencies (Wang *et al.*, 2007; Eriksson *et al.*, 2008; Solmone *et al.*, 2009; Cordey *et al.*, 2010; Eckerle *et al.*, 2010; Murcia *et al.*, 2010; Zagordi *et al.*, 2010; Willerth *et al.*, 2010; Bunnik *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2011). In this study, we have generated tens of millions of short reads with Illumina sequencing to obtain an unprecedented ultradeep coverage of amiR targets in the TuMV genome, thus characterizing in great detail the genetic composition of TuMV lineages evolving in WT and 10-4 plants at different time points during the evolution process and right

after the first successful infection of 12-4 resistant plants. Although in general the limited length of Illumina reads makes it difficult to assess linkage among mutations, in our particular case this is not an issue because the 21-nt sequences corresponding to the amiR159-HC-Pro target were completely covered by the 76-nt-long reads. The validity of the Illumina technology for assessing virus diversity has been proved with studies of the *Severe acute respiratory syndrome coronavirus* (Eckerle *et al.*, 2010), *Human rhinovirus* (Cordey *et al.*, 2010), HIV-1 (Willerth *et al.*, 2010) and *Foot-and-mouth disease virus* (Wright *et al.*, 2011).

MATERIALS AND METHODS

Plant material and growth conditions

Two homozygous T4 transgenic *A. thaliana* Col-0 lines expressing amiR159-HCPro were used in this study: 10-4 and 12-4 (Niu *et al.*, 2006; Lafforgue *et al.*, 2011). Plants were maintained in a growth chamber under 16 h light 25 °C/8 h darkness 22 °C; 12-4 plant were fully resistant to infection with the ancestral TuMV clone, whereas 10-4 plants showed incomplete penetrance and variable expressivity of the resistance character (Lafforgue *et al.*, 2011).

Population passages and evaluation of pathogenicity in *A. thaliana* 12-4 plants

Details of the evolution experiments and evaluation of the pathogenicity of evolving populations were described elsewhere (Lafforgue *et al.*, 2011). In short, a large stock of infectious sap was obtained from TuMV-infected *Nicotiana benthamiana* inoculated with a plasmid containing a TuMV cDNA (GenBank accession no. AF530055.2). Saps were obtained by grinding-infected tissues with 20 volumes of grinding buffer (50 mM potassium phosphate pH 7.0, 3% polyethylene glycol 6000). Aliquots of 5 μ L 10% carborundum were applied to three different *A. thaliana* leaves, and inoculation was done mechanically by gentle rubbing with a cotton swab

soaked with infectious sap. Twenty-five WT and 25 transgenic 10-4 *A. thaliana* plants were initially inoculated. Each plant represented the starting point for an independent evolution lineage. Fourteen days post-inoculation (dpi), symptomatic tissue was collected for each lineage and ground in a mortar with liquid N₂ and stored at -80 °C. A portion of the ground tissue was extracted with grinding buffer and used to inoculate the next set of plants. A second portion was used for the pathogenicity tests in 12-4 plants. A third portion was used to purify RNA for reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of TuMV cDNA.

For the pathogenicity test, 20 plants from the 12-4 line were inoculated as described early. Infection was determined 14 dpi and the frequency of infected plants, that is pathogenicity, recorded. These challenge experiments were performed after every evolutionary passage for each one of the 50 evolving lineages.

RNA preparation and RT-PCR Amplification of a TuMV cDNA

TuMV infected tissue from *A. thaliana* plants (0.2 g) was ground with mortar and pestle in the presence of liquid N₂ and RNA purified by chromatography using silica gel spin columns (Zymo Research). RNA was finally eluted from the columns with 12 µL 20 mM Tris-HCl, pH 8.5 and quantified by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Scientific).

RNA aliquots from TuMV-infected *A. thaliana* plants (100 ng) were subjected to reverse transcription with 50 U M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas) in the presence of 5 pmol primer PI (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGCCTGATT CTGTTGTGACAC-3', sequence complementary to TuMV-AF530055.2 positions 2095-2115 underlined) in 10 µL reactions for 45 min at 42 °C, 10 min at 50 °C and 5 min at 60 °C. Before the reaction, the primer was allowed to anneal to the RNA by incubation for 1.5 min at 98 °C and snap cooling on ice. Reverse transcription reactions were stopped by heating at 72 °C for 15 min. PCR amplifications were performed in 20 µL with 0.4 U of the high-fidelity Phusion DNA polymerase (Finnzymes) in HF buffer (Finnzymes) and 3% dimethyl sulfoxide, 0.2 mM dNTPs

and 1 μL of the previous reverse transcription reaction. Reactions also contained 0.5 μM primer PI and 0.5 μM of a particular version of primer PII. For multiplex deep sequencing, a series of 45 different PII primers was designed including a constant 5' sequence required for the deep sequencing protocol, a variable 4-nt sequence (XXXX) for bar coding and a constant 3' sequence (underlined) homologous to TuMV-AF530055.2 positions 2011-2031: 5'AATGATACGGCGACCACCGACAG GTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCXXXXGAAAGGCGAACCGGTAGAA C-3'. The reactions were incubated for 30 s at 98 °C followed by 20 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels in buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.2) and stained with ethidium bromide. The TuMV cDNA amplification products (177 bp) from the different reactions were eluted from the gel using silica gel spin columns (Zymo Research) and quantified by spectrophotometry.

NGS

The amplified TuMV cDNAs from the evolution experiments in WT and 10-4 plants were mixed in separated pools. Each pool contained normalized amounts of the different cDNAs at 18 ng/ μL . The two cDNA pools were subjected to NGS using the Illumina HiSeq 2000 sequencer at the Rockefeller University Genomics Resource Center.

Data filtering and analysis of sequence diversity

To exclude the considering sequencing or experimental miscalls as true mutations, we carefully considered the nucleotide qualities provided by the Illumina sequencing platform. Each nucleotide in each read has a quality score Q , which can be translated measure of the probability, p , of it being an erroneous call with the expression $p = 1/(1 + 10^{Q/10})$. The average error probability along the reads increased with nucleotide position and reached 1% after nucleotide 65: these levels are

incompatible with the reliable identification of low-frequency polymorphisms. Typically, this poor average performance is due to a restricted number of very low-quality reads, which suffered some problems during the base-calling process. Therefore, we removed from the analysis all the reads with an average sequencing error per nucleotide higher than 0.1% (corresponding to 5% - 15% of the sample total). The coverage of the samples obtained with the filtered reads ranged between 3.5×10^5 and 8.5×10^5 -fold. Reads were then aligned to the reference sequence with a simple score-assigning routine, and new, sample-specific consensus sequences were obtained.

Subsequently, we estimated the frequency of site-specific polymorphisms from the frequency of mismatches to the reference genome found in the aligned reads. A proportion of these mismatches are expected to be artifacts, arising from base miscalling. To discriminate between real variation and sequencing artifacts, we used a variation of the method developed by Wright *et al.*, (2011): we considered the probability of a sequencing error appearing at genome position i in read j , p_{ij} , and we averaged over all the reads to obtain $p_i = \sum_{j=1}^{n_i} p_{ij}$, where n_i is the coverage of site i . Values of $p_i \sim 0.03\%$ corresponding to $Q = 35$. If all the erroneous callings are independent, the probability of a mutation appearing in x reads at site i to be a sequencing error follows a binomial distribution $B(x_i|p_i/3, n_i)$, where n_i is the coverage of site i , and $p_i/3$ is the average probability of observing a specific base calling error. p_i is averaged over all the nucleotides aligned at site i bearing a mutation with respect to the consensus. Furthermore, we assumed that all possible sequencing errors occur with the same probability (e.g., A can be mistaken for C, G or U with no preferences).

At each genome site, we ranked the frequencies of the nucleotides observed in the reads and assigned a score to each mutation, defined as $s_{ik} = B(x_{i,k}|p_i/3, n_i)$, where $x_{i,k}$ is the number of reads aligned at site i bearing mutation $k \in \{A, C, G, U\}$. s_{ik} increases if a mutation is observed in a large number of reads, making it unlikely to be a sequencing error: when s_{ik} is small, we can reject the hypothesis “the observed mutation is generated by sequencing error”. We considered only mutations where s_{ik}

$< q$, with q being a threshold chosen to be 0.05. All these analyses were performed with custom-made C scripts.

Finally, we estimated the probability of resequencing the same fragment more than once. Let M be the initial number of fragment present in the sample and N the coverage of a site: the probability of sampling a fragment l times is distributed according to the binomial law $B(l|1/M, N)$, where $1/M$ is the probability of choosing a particular genome among the M available. Therefore, the probability of resequencing the same genome is $P(l > 1) = \sum_{l=2}^{\infty} B(l|1/M, N)$. For the typical values $N = 5 \times 10^5$ and $M = 1.2 \times 10^{11}$ (De la Iglesia *et al.*, 2012), $P(l > 1) \approx 8 \times 10^{-12}$, which is sufficiently small to be ignored.

Population genetic analyses were performed with ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). The average per site nucleotide diversity (π) and the average number of pairwise nucleotide differences (k) were computed for each population. Using these two figures, we computed Tajima's D statistics (Tajima, 1989) to evaluate whether the observed variability patterns were compatible with the neutral expectation ($D = 0$), with the action of directional selection/population growth ($D < 0$) or with balancing selection/population subdivision ($D > 0$). Patterns of nucleotide substitutions in the amiR159-HCPro target in TuMV genome were analyzed using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Nucleotide substitution matrices and ratios of transitions to transversion rates (κ) were estimated by maximum likelihood for each evolutionary lineage under the general time reversible model with uniform rates among sites and using a neighbor-joining phylogenetic tree (Saitou and Nei, 1987). Substitution rates per synonymous (d_S) and nonsynonymous (d_N) sites were estimated using Nei-Gojobori's modified method and bootstrap SEM (1,000 pseudo-replicates). IBM SPSS version 19 was used for all additional statistical analysis reported.

RESULTS AND DISCUSSION

To study by NGS the population dynamics of evolving TuMV sequence variants and the escape mutants able to break resistance in fully resistant 12-4 plants, we chose four evolutionary lineages from our previous work (Lafforgue *et al.*, 2011). The first lineage, labeled as L20.Col-0, consisted of 19 passages in WT. At each passage, a pathogenicity test was performed (see Materials and Methods section). All tests were negative until passage 19. The TuMV population replicating in the infected 12-4 plants was analyzed by NGS and are referred in figure 2A as passage 20 (highlighted in light green). In this case, the escape allele identified by Sanger sequencing as the most abundant one contained the mutation C11U (numbering referred to the 21-nt of the amiR159-HCPro target), a synonymous mutation that appeared in 7 out of the 25 independent lineages evolved in this host. For the other three lineages evolution took place in the partially resistant 10-4 plants and occurred faster. Lineage L11.10-4 also contained the C11U escape allele, and it arose after only two passages in 10-4 plants followed by the successful pathogenicity test in 12-4 plants (labeled as passage 3 and highlight in green in fig. 3A). Finally, lineages L1.10-4 and L10.10-4 consisted, respectively, of three and four evolutionary passages in 10-4 plants plus the subsequent positive pathogenicity tests in 12-4 plants (labeled as passage 4 and 5 and highlight in green in fig. 3B and C, respectively). Consensus sequencing of escape alleles for these two lineages showed mutations A19C (K to T amino acid replacement) and G12A (V to M conservative amino acid change) (Lafforgue *et al.*, 2011).

Description and filtering of Illumina data

Samples from all the evolution passages for the four lineages describe earlier were sent out for Illumina sequencing, and the resulting data were subjected to the quality analyses described in the corresponding section of the Materials and Methods section. Figure 1A illustrates the sequence reads quality scores Q_i translated into error probabilities p_i . The Q_i associated with each nucleotide decreased toward the end of the reads, as the reliability of the sequencing process decreases with the

number of cycles of the Illumina sequencing platform, and therefore p_i increased along the reads. After discarding reads with an average $p > 0.2\%$, the error profile became flatter (dashed line in Figure 1A). The number of valid reads varied widely among lineages and between sampling times within each lineage. For L20.Col-0 the number of valid reads ranged from 291,348 for passage 9th to 858,037 for passage 15th or to 598,784 for passage 20th passage, when the resistance of 12-4 plants was broken, with a median value of 485,318. For lineage L1.10-4, the number of valid reads ranged 609,097 – 678,729, with a median of 620,168 reads. For lineage L10.10-4 the range went from 477,218 to 1,222,462 valid reads (median 729,630). Finally, for lineage L11.10-4, the number of valid reads runs within the interval 502,642 – 637,476, with a median value of 531,402. Only nucleotides with $Q > 30$ were used to determine haplotypes.

Figure 1B shows the log-log relationship between the number of reads and the number of detected haplotypes. The power law relationship between the number of valid reads and of detected haplotypes ($r^2 = 0.962$, $F_{1,30} = 749.420$, $P < 0.001$) imposes a certain degree of uncertainty about the number of different haplotypes existing in each viral population sampled: as the power law has no asymptotic value, the more reads would be analyzed the more new haplotypes can still be detected. In other words, an infinite number of valid reads would be necessary to estimate the exact number of haplotypes contained in a viral population. This being said, we can still make some valid inferences from our data. For instance, we can ask whether the number of haplotypes differed significantly between samples and/or lineages. For lineage L20.Col-0, the number of haplotypes per passage ranged between 19 (for passage 8) to 287 (for passage 20), with a median value of 28. Interestingly, the median number of haplotypes was larger for the three lineages evolved in the partially resistant 10-4 plants: for lineage L1.10-4, the number spanned between 44 and 256 (median 114), for lineage L10.10-4 between 38 and 255 (median 41), and for lineage L11.10-4 between 29 and 129 (median 57). An ANCOVA on the log number of haplotypes using lineage as random factor and the log number of valid reads as covariable revealed a significant difference in the median number of haplotypes between the lineage evolved in WT and the three lineages evolved in 10-

4 plants ($F_{4,24} = 9.072$, $P < 0.001$). In other words, the expression of sub-inhibitory amounts of an amiR by the host plant facilitates the accumulation of genetic variability in the virus amiR target. Furthermore, the analysis also detected a significant effect of the random factor on the slope of the regression line ($F_{3,24} = 5.595$, $P = 0.005$), which suggests that the underlying power law relationship may be different for each experiment. In this study, we are not exploring further whether this difference in slope among lineages reflects some underlying biological process, or in contrast, it may result from some more trivial reasons (e.g., the fact that the number of reads is different for each lineage).

For the sake of simplicity, in the following sections, we will concentrate our discussion in only the 50 most abundant haplotypes detected in each evolutionary lineage.

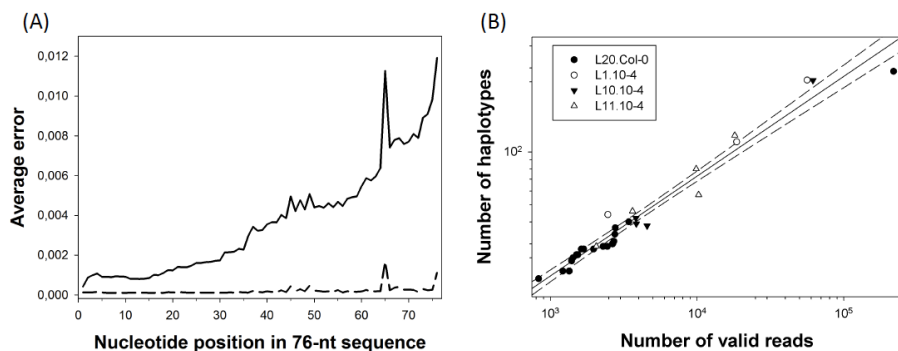


Fig. 1.- (A) Average errors per nucleotide in the 76-nt reads, computed with base qualities. The average error increased greatly towards the ends of the reads (solid line). The dashed line shows the average error after filtering. Positions 37 - 57 within the reads correspond to the 21-nt amiR159-HCPro target. (B) Relationship between the number of valid reads (R) per sample and the number of different haplotypes (H) detected in a sample. The solid line represents the fit to the power model $H = 0.391R^{0.567}$ ($r^2 = 0.962$, $F_{1,30} = 749.420$, $P < 0.001$). The dashed lines correspond to the 95% confidence interval of the model.

Dynamics of molecular evolution in the TuMV target of amiR159-HCPro: passages in WT plants

Figure 2A shows the evolution in relative abundance for the 50 most common haplotypes that arose in the TuMV lineage evolved in fully susceptible WT plants (e.g., lineage L20.Col-0). The last passage represented, the 20th, corresponds to the infectivity test in which lineage L20.Col-0 broke the amiR159-HCPro-mediated

resistance of the 12-4 plants for the first time. Several striking conclusions can be drawn from these results. First and most notably, no less than 21 potential escape alleles were present in the evolving population from the very beginning of the evolution experiment. The median frequency of haplotypes carrying potential escape mutations across passages was 0.02%. Indeed, the haplotype containing the escape mutation C11U that turned out to be the most abundant one in the population infecting the 12-4 plants at passage 20 (62.88%) also had the highest population frequency during most intermediate passages (range 0.02% at passage 18 to 0.09% at passage 11, median 0.06%) except in passages 9 and 10. The second most abundant haplotype (17.73%) found in the 12-4 plants had mutation G12A; four other haplotypes had frequencies in the range 4.82% – 1.23%. Interestingly, when the diversity indexes k and π were computed pooling data from consecutive passages, we found that k was 13.3-fold larger in the comparison between passages 19 and 20 ($k = 0.096$) than in any other of the previous 19 pairs (average $k = [7.215 \pm 0.162] \times 10^{-3}$; z -score, $P < 0.001$). Similarly, π was 25.6-fold larger (z -score, $P < 0.001$) in the comparison between passages 19 and 20 ($\pi = 4.575 \times 10^{-3}$) than across all the other pairs (average $\pi = [3.435 \pm 0.077] \times 10^{-4}$). These results suggest that the viral population composition changed substantially after the TuMV population was moved from WT to 12-4 hosts.

The temporal persistence of these potential escape mutations suggests that the event of successfully infecting the 12-4 resistant plants after passage 19 was not dependent on a steady increase of its frequency or on the accumulation of different escape alleles until some critical value was reached. Rather, the TuMV genotype that finally overcame the resistance of the 12-4 plants was randomly chosen among the many coexisting ones. This can be explained by the transmission bottlenecks followed by strong selection of resistance alleles in presence of the amiR159-HCPro. Indeed, that breaking resistance does not depend only on the previous presence of escape mutation is supported by two additional sources of evidence. First, there is no correlation between the frequency of the different haplotypes in the 12-4 plant (passage 20) and their median frequency across the different passages in WT plants (Spearman's $r_s = -0.195$, 48 df, $P = 0.176$). Second, Tajima's D statistic was

significantly smaller than zero in every passage (supplementary fig. S1, Supplementary Material online), thus suggesting that the observed excess of low frequency polymorphisms can be simply explained by the population bottlenecks associated to each transmission event. These results support the hypothesis of Lafforgue *et al.*, (2011) that TuMV populations evolving in WT plants were at the mutation-drift balance.

A second observation is that 28 of the haplotypes identified in the 12-4 plant (passage 20) did not qualify between the 50 most abundant in any of the previous passages in WT. Very interestingly, 25 of these haplotypes carried two mutations in the amiR159-HCPro target, in comparison with all the 21 pre-existing haplotypes, all of which carried a single nucleotide substitution, being the difference in the number of mutations per haplotype between both groups statistically significant (Fisher's exact test $P < 0.001$). Eighteen of these double-mutant haplotypes contained the most abundant mutation C11U, four of them contained the second most abundant mutation G12A, and one contained both mutations. The other three double-mutant haplotypes had mutations G16C/A18G, G14A/A18G, and C17U/A19C. Mutation A18G was already detected in most passages in WT plants. By contrast, mutation A19C was the third most common single-mutation haplotype found in the 12-4 plant (passage 20) but it was not observed in any of the previous passages in WT plants. Therefore, we can conclude that most of these double-mutant haplotypes arose when resistance was broken and resulted from imperfect replication of pre-existing single-mutation haplotypes that were strongly selected upon inoculation in the 12-4 plants. This result is in good agreement with the observation by Lin *et al.*, (2009) that additional mutations in the amiR target arise and facilitate escape.

A third, very interesting observation was that the TuMV ancestral sequence was still found in the 12-4 plants at a frequency of 0.69%, ranking 25th in this population. The presence of the TuMV ancestral sequence in the 12-4 plants can be explained by three nonmutually exclusive hypotheses. First, the ancestral TuMV genome is able of evading the amiR resistance when it only represents a minor fraction of the population, suggesting that the efficiency of the RNA silencing machinery in

detecting allelic variation in the target depends on a threshold concentration. Second, the escape mutants that dominate the population express the silencing suppressor HC-Pro that interferes with the RNA silencing machinery and blocks its action. The ancestral TuMV genotypes simply take advantage of this situation by coinfecting cells along with the mutant viruses. Third, the ancestral TuMV sequence is being constantly created by back mutation from the other more abundant mutant genotypes. We find this third possibility less plausible than the other two. Using a recent estimate of TuMV mutation rate in *A. thaliana* (De la Iglesia *et al.*, 2012) of $\sim 6 \times 10^{-5}$ per replication event and the fact that TuMV replication mostly proceeds via a stamping machine (Martínez *et al.*, 2011), the expected population frequency of reversion mutants produced by backward mutation during replication of the numerically dominant resistant haplotype should be $\sim 0.006\%$, a value that is ca. 115-fold smaller than the observed frequency. Therefore, we can conclude that the observed frequency of TuMV genomes carrying the ancestral amiR159-HCPro target sequence is much higher than expected by backward mutation, and therefore, likely to be a consequence of inefficient RNA silencing machinery or of complementation with escape mutants during cell coinfection.

Finally, Figure 2A shows that the temporal dynamics of the 50 most abundant haplotypes is complex, with frequent stochastic fluctuations and haplotypes that appear, disappear (i.e., went beyond experimental detection limit), and, in some cases, bounce back later on time.

Next, we investigated the evolution of variability at the different positions of the amiR target. Figure 2B shows the evolution of diversity in each of the 21-nt in the amiR159-HCPro target. During the 19 passages in WT plants, all positions of the amiR159-HCPro target showed variability. Under the hypothesis of mutations accumulating neutrally, we should expect all sites showing approximately the same amount of variability. Furthermore, under the same assumption, we should expect this variability to fluctuate around some value that results from a balance between mutation and the stochastic genetic drift associated to the passage events. To explore whether the first expectation would hold up, we fitted the frequency data to an ANCOVA model in which variability at each nucleotide site was treated as a

random variable and passage as a covariable. This analysis detected significant differences among nucleotide sites ($F_{21,357} = 38.343$, $P < 0.001$), thus rejecting the null hypothesis of all sites accumulating mutations at equal frequency. Further, a two-step cluster analysis found that the optimal number of groups into which sites could be classified was 6, with site 1 being the less variable (average frequency across passages 0.02%) one and site 11 accumulated almost twice as many variants (average frequency across passages 0.05%). The ANCOVA analysis also revealed that the frequency of variants per site remained constant along the experimental evolution process ($F_{1,357} = 0.458$, $P = 0.499$), which supports our second expectation. However, this equilibrium composition radically changed on successful infection of the transgenic 12-4 plant (passage 20, fig. 2B). In this new situation, 52.52% of sequences, regardless their haplotype had a change at position 11 of the amiR159-HCPro target. This change is a synonymous replacement. The second most variable site was position 12, with 22.24% of the sequences (again, regardless their haplotype) containing a mutation. This mutation results in the conservative amino acid replacement V to M. Positions 3, 9, 16, 17, 18, and 19 had frequencies of variation around ~1%. This distribution of variation along the amiR159-HCPro target within a single evolutionary lineage matches the distribution of mutations found by Lafforgue *et al.*, (2011) for 25 independent lineages. In that case, positions 11 and 12 were overwhelmingly associated to resistance breaking and positions 17, 18 and 19 were also frequently associated to escapes. Using an heterologous system of transgenic *A. thaliana* plants expressing amiR159-P69 targeting an engineered TuMV genome that contained 21-nt from the TYMV P69 cistron, Lin *et al.*, (2009) showed that positions 3, 9 and 12 were critical for resistance breaking, although other sites, qualified as being crucial (4, 5 and 6), did not show particularly high frequencies of variants in our study. By contrast, position 11 was dubbed as of moderate importance for resistance breaking (Lin *et al.*, 2009) but turned out to be the most important one in our study. A critical difference between Lin *et al.*, (2009) study and ours is that in their case the amiR159-P69 target sequence was neutral for the virus (non-coding), whereas here it targets a coding region of TuMV HC-Pro cistron and, consequently, mutations in successful escape variants must result from

the balance between avoiding recognition by amiR159-HCPro and retaining biological function. Indeed this neutral effect may explain why Lin *et al.*, (2009) observed an excess of critical positions at the 5' end of the amiR159-P69. The importance of the two central positions may be explained by the fact that imperfect pairing with central mismatches in sRNA-target hybrids promotes translational repression as it excludes slicing (Brodersen *et al.*, 2008). This observation suggests the possibility that imperfect pairing between the amiR159-HCPro and mutated targets might lead to translational repression rather than to viral RNA cleavage. In contrast to the catalytic effect of amiR-mediated viral RNA cleavage, translational repression requires stoichiometric amounts of amiRs and therefore is not as efficient an antiviral mechanism that may allow for residual viral replication.

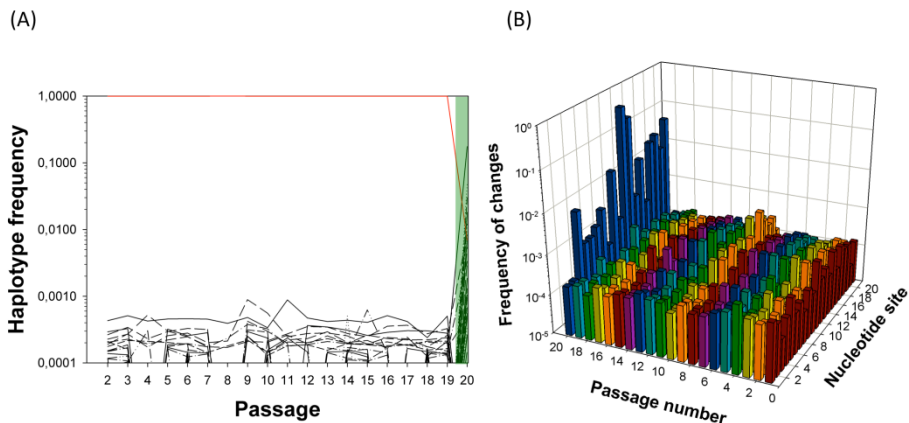


Fig. 2.- Diversity evolution in one TuMV lineage evolved in fully susceptible *A. thaliana* plants (WT). (A) Evolution of frequency for the 50 more abundant haplotypes detected for the amiR159-HCPro target sequence along the evolution experiment. The red line corresponds to the ancestral TuMV haplotype. (B) Observed diversity per each of the 21-nt in the amiR159-HCPro target along the 20 serial passages. At passage 20 we show the haplotypic composition found after resistance breaking in the 12-4 plants (shadow in light green): the numerically dominant haplotypes carry mutations in the target. However, the ancestral TuMV haplotype was still present at a detectable frequency in the population. Abscises axes are in decimal log scale.

Dynamics of molecular evolution in the TuMV target of amiR159-HCPro: passages in partially resistant 10-4 plants

Figures 3A-C show the evolution in frequency of the 50 most common haplotypes for each of three independent lineages evolved in the partially resistant 10-4 plants.

The patterns described in these figures are qualitatively homogeneous and similar to what we have discussed for the case of lineage L20.Col-0, although the event of resistance breaking took place much earlier. In all cases, haplotypes containing mutations in the amiR159-HCPro target were present in the populations since the very first experimental passage. Another remarkable difference is that although in the L20.Col-0 lineage the frequency of haplotypes containing putative escape mutations was in the range 0.0001 – 0.001, in the three lineages evolved in 10-4 plants, this frequency fluctuated between 0.001 and 0.01, ca.10-fold higher, an observation that is consistent with the hypothesis that in these partially resistant plants escape mutations confer a fitness advantage to the viral genotypes bearing them (Lafforgue *et al.*, 2011).

In the case of lineage L1.10-4 (fig. 3A), the resistance of 12-4 plants was broken only after two serial passages in 10-4 plants. The most abundant escape mutant haplotype contained an A19C mutation in the amiR159-HCPro target, and it completely dominated the population infecting the 12-4 plant (99.59% frequency). The other 17 haplotypes identified in the end-point population (among the 50 more abundant during the evolution process) had frequencies that were in the range 0.01% - 0.03%, including the ancestral TuMV genotype, which was retained at a frequency of ~0.02%. All-but-one non-ancestral haplotypes present in this population contained the A19C mutation plus an additional one, an observation that is compatible with the notion that they were produced by mutation during replication of the numerically dominant haplotype. The remaining haplotype carried mutation A19U and it was present at a frequency slightly lower than 0.02%.

As illustrated in figure 3B, lineage L10.10-4 was able to successfully infect 12-4 plants after three serial passages. In this case, the most abundant haplotype in the successful population had mutation G12A (99.48%), but the population still retained 17 additional haplotypes at frequencies lower than 0.04% and 0.02%. The ancestral TuMV genotype was also present in the population at a frequency of ~0.03%. In this case, all the low-frequency haplotypes (aside from the ancestral one) carried two mutations in the target, with G12A always being present, thus suggesting that they are being generated from replication of the dominant haplotype.

Lineage L11.10-4 showed a similar evolutionary pattern (fig. 3C). In this case, it took four consecutive passages in partially susceptible 10-4 plants to break the resistance imposed by plants 12-4. As in previous cases, a single haplotype containing a point mutation in the amiR159-HCPro target dominated (98.06%) the population found in the 12-4 plant. In this case the escape mutation was C11U, describe in detail earlier. Twenty other haplotypes were identified, with frequencies in the range 0.01% - 0.76%, including the ancestral-sensitive TuMV genotype (0.04% frequency). As in the previous two lineages, all minority haplotypes also contained the C11U mutation plus an additional one.

Similarly to what has been described earlier for the L20.Col-0 lineage, also for these lineages Tajima's D was significantly negative in all cases (supplementary fig. S1, Supplementary Material online), thus suggesting that bottlenecks played a major role in configuring the genetic make-up of the lineages. Putting together this observations and the previous one of the higher frequency of escape mutants in the partially resistant plants provide support to the hypothesis of Lafforgue *et al.*, (2011) that TuMV populations evolving in the host were at mutation-selection-drift balance: mutation and selection being relevant within a plant (and specially after the resistance-breaking event) and drift being relevant during the serial transmission events.

Figure 3D-F show the evolution in diversity for each of the 21 nt in the amiR target for the three 10-4-evolved lineages. In all cases the variability per site fluctuated both among sites and along time, although an ANCOVA test using lineage and nucleotide site as random factors and time as covariate showed that variation among sites had not a net significant effect. This can be interpreted as indicating that no site is particularly variable or conserved, but only in the context of the interaction with passage ($F_{20,126} = 3.067$, $P < 0.001$) and in the three-way interaction ($F_{40,126} = 3.414$, $P < 0.001$), meaning that in some particular passages and lineages, certain sites appear as more polymorphic than others. This is quite obvious for instance in lineage L1.10-4 (Figure 3D), where sites 11, 12 and 16 are more variable (~1%) at the second passage than at any other, whereas site 19 is the most variable in the population replicating in the 12-4 plant. A similar situation can be described for

passage 3 of lineage L10.10-4 (fig. 3E), in which sites 3, 11, 12, 16, 17, and 19 had frequencies of variants in the range 0.1% - 1%.

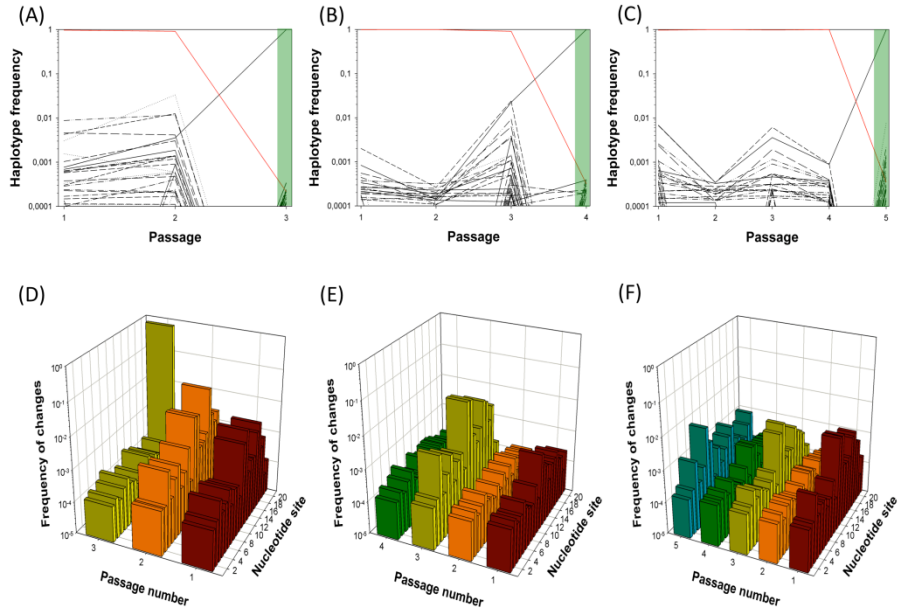


Fig. 3.- Diversity evolution in three TuMV lineages evolved in partially resistant *A. thaliana* 10-4 plants. (A) – (C) Evolution of frequency for up to the 50 more abundant haplotypes detected for the amiR target sequence along the evolution experiments. (D) – (F) Observed diversity per each of the 21-nt in the amiR target at each passage. Panels A and D corresponds to lineage L1.10-4, panels B and E to lineage L10.10-4, and panels C and F to lineage L11.10-4. Diversity at the last indicated passage corresponds to that observed in the population that broke the 12-4 resistance (shadow in light green). Abscises axes are in decimal log scale.

Evolutionary molecular dynamics outside the amiR159HC-Pro target

The Illumina approach used in this study generates reads that are longer than the amiR159-HCPro 21-nt target analyzed in the two previous sections. Indeed, the analysis of the flanking sequences (50 nucleotides in total) may still provide useful and interesting information. For example, we can hypothesize that if the amiR159-HCPro target is what drives the evolutionary transition from sensitivity to the resistance observed in the last passage of figure 2A and 3A-C, then variation outside the target would not be the object of selection and thus would simply reflect the

mutation-selection balance. In the case of lineage L20.Col-0, the ancestral sequence was preserved along the entire evolution experiment, with its frequency oscillating in the narrow range 99.07% – 99.62% (median value 99.50%). Only three other haplotypes remained in all passages, with frequencies 0.02% – 0.04%. Looking at the per site variability, all sites showed variation, but it was lower than 0.4% for all sites and passages (median 0.02%). A similar situation was found in the three lineages evolved in the partially resistant 10-4 plants. For lineage L1.10-4, the ancestral TuMV haplotype had a median frequency across the three passages of 99.36%, with an average frequency of variants per site of ~0.02%. In the case of lineage L10.10-4, the median frequency of the ancestral haplotype was 99.38% across the four passages, and the average frequency of variants per site in the amiR159-HCPro target was ~0.02%. Finally, the ancestral sequence also dominated all passages of lineage L11.10-4 (99.42% on median) and the average variation per site was equivalent to that observed in the other lineages (~0.02%).

Interestingly, all the haplotypes characterized outside the target contained a single nucleotide substitution, even those found in the population infecting the 12-4 resistant plants, thus confirming our interpretation that the additional mutations found in the target were produced within the 12-4 plant during replication of a genome that already contained a point mutation that facilitated escape from the RISC machinery and providing further support for the strong effects of drift..

Patterns of nucleotide substitution

Figure 4 shows the pattern of nucleotide substitutions estimated by maximum likelihood from the 50 most abundant haplotypes identified in the four evolutionary lineages. A first remarkable observation from this figure is the significant heterogeneity among the substitution patterns estimated for each lineage ($\chi^2 = 97.136$, 15 d.f., $P < 0.001$). However, this heterogeneity is completely driven by the peculiar pattern observed for lineage L1.10-4, characterized for an excess of AC/UG and GU/CA transversions and a defect of transitions. After removing this lineage

from the analysis, no heterogeneity among the remaining three lineages was observed ($\chi^2 = 17.225$, 10 d.f., $P = 0.070$).

Consistent with the principle that transitions are biochemically more likely than transversions and that they are more often silent at the codon level, the maximum likelihood estimates of the overall rate of transitions to transversions κ were > 4 for lineages L20.Col-0 ($\kappa = 4.26$), L10.10-4 ($\kappa = 4.50$) and L11.10-4 ($\kappa = 4.42$). This excess also occurred when purines or pyrimidines were considered separately. Indeed, the observed frequencies of transitions among purines and among pyrimidines were similar (fig. 4) and by far the most frequent type of mutation in these three lineages. In sharp contrast, but consistent with the aforementioned excess of transversions over transitions, $\kappa = 0.97$ for lineage L1.10-4. Overall, we can conclude that TuMV replicase produces, on average, $\sim 4/5$ transitions and $\sim 1/5$ transversions. This result is in qualitative agreement with the mutational spectrum described for another potyvirus, TEV, for which 2/3 of the observed point mutations were transitions and 1/3 transversions (Tromas and Elena, 2010).

Under the observed mutational spectrum, the equilibrium base composition was homogenous among the four lineages ($\chi^2 = 0.799$, 9 d.f., $P = 1$) and equal to 24.25% A, 20.25% U, 18.75% C, and 36.75% G. This distribution significantly deviated from the expectation by sheer chance ($\chi^2 = 32.720$, 15 d.f., $P = 0.005$) and the deviation was mainly driven by the 47% excess in G that compensated the defect in both pyrimidines.

Next, we sought to evaluate the impact of nucleotide substitutions in the TuMV HC-Pro protein amino acid sequence. In all four lineages the number of nonsynonymous mutations was larger than the number of synonymous mutations; being the largest observed difference for lineage L20.Col-0 (23 nonsynonymous and 6 synonymous) and the smallest for L1.10-4 (18 nonsynonymous and 9 synonymous), although no significant difference in the distribution of both types of substitutions was found among lineages ($\chi^2 = 1.584$, 3 d.f., $P = 0.663$). To evaluate whether this pattern of synonymous and nonsynonymous changes was compatible with a model of neutral evolution, we estimated the difference between substitutions rates per nonsynonymous and synonymous sites, $d_N - d_S$. For lineages L20.Col-0 (–

0.182±0.128), L1.10-4 (−0.026±0.055), and L10.10-4 (−0.077±0.055) the differences between rates were negative but not large enough as to reject the null hypothesis of neutral evolution (in all cases z -score, $P \geq 0.078$). In the case of lineage L11.10-4, however, the difference was positive (0.249±0.131) and significant, $P = 0.028$), although the test became not significant when the sequential Bonferroni correction for multiple tests of the same null hypothesis was applied. Therefore, we may conclude that selection at the amino acid level has played a minor role, if any, in shaping the observed patterns of nucleotide substitutions.

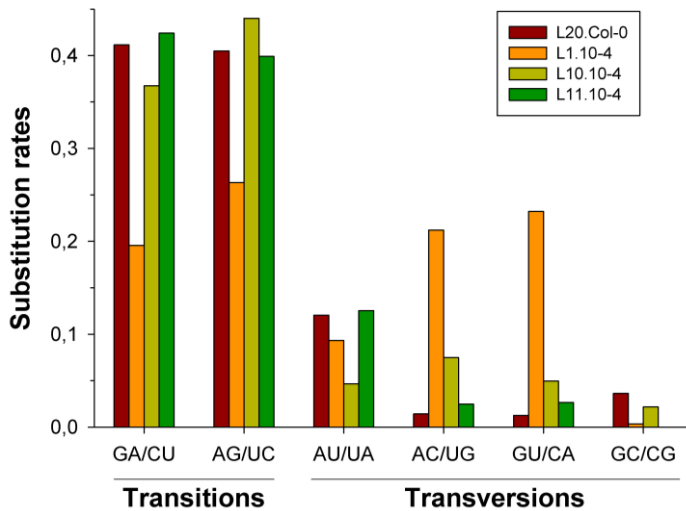


Fig. 4.- Observed rates for the different types of nucleotide substitutions. Each column groups mutations rendering complementary pairs and, thus, can occur during the synthesis of TuMV genomic or antigenomic strains. Each lineage is represented by a different color, as indicate in the legend. For any given lineage, rates have been made relative so they add up to one.

CONCLUSION

We had previously shown that the durability of plant resistance to RNA viruses generated by transgenic expression of amiRs targeting viral genomes can be jeopardized by mutations in the viral genome (Lafforgue *et al.*, 2011). In this previous study, we showed the emergence of escape alleles containing mutations in the target that are likely to affect the binding of the amiR and consequently slicing by RISC. Now, we have characterized the molecular evolutionary dynamics of TuMV populations evolving either in a fully susceptible or in a partially resistant host. Using Illumina ultradeep sequencing, we have reached an unprecedented detection limit, allowing us to detect variants in the viral populations at a frequency as low as 2×10^{-6} . We have shown that variation in the amiR159-HCPro target was generated and maintained along evolutionary time and that every nucleotide in the target sequence underwent mutation. In fully susceptible plants, new variants emerged to frequencies below 0.001. Some variants persisted for several passages, while others had a transient existence. The escape variant that finally succeeded in infecting the fully resistant 12-4 plants was present in the evolving population from the very beginning of the evolution experiment. These results are compatible with a mutation-drift model (substantiated by significant negative Tajima's *D*). TuMV populations evolving in partially resistant plants showed a qualitatively similar behavior although with a quantitatively important difference: the frequency of escape variants in the evolving populations was more than one order of magnitude higher in partially resistant than in fully susceptible plants. These results are compatible with a mutation-selection-drift model of evolution and explain why resistance was broken much more easily in the former case. In both cases, selective fixation of variants was due to the change in nucleotide sequences and not driven by changes in the amino acid composition of the HC-Pro, as the rates of synonymous and nonsynonymous substitutions were equivalent.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francisca de la Iglesia for technical assistance and the useful comments from two anonymous reviewers. This research was supported by the Human Frontier Science Program Organization grant RGP0012/2008, Generalitat Valenciana grant PROMETEO/2010/019 and by CSIC grant 2010TW0015. FM was supported by a fellowship from the Universidad Politécnica de Valencia. MJM was supported by a SYSBIO postdoctoral grant (BB/F005733/1) from the UK BBSRC.

REFERENCES

Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Ramratnam, B. 2003. *Human immunodeficiency virus* type 1 escape from RNA interference. *J Virol* **77**:11531-11535.

Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., Voinnet, O. 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**:1185-1190.

Bunnik, E. M., Swenson, L. C., Edo-Matas, D. et al. 2011. Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS Pathog* **7**:e1002106.

Coburn, G.A., Cullen, B. R. 2002. Potent and specific inhibition of *Human immunodeficiency virus* type 1 replication by RNA interference. *J Virol* **76**:9225-9231.

Cordey, S., Junier, T., Gerlach, D., Gobbini, F., Farinelli, L., Zdobnov, E. M., Winther, B., Tapparel, C., Kaiser, L. 2010. Rhinovirus genome evolution during experimental human infection. *PLoS ONE* **5**:e10588.

Das, A. T., Brummelkamp, T. R., Westerhout, E. M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R., Berkhout, B. 2004. *Human immunodeficiency virus* type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* **78**:2601-2605.

De la Iglesia, F., Martínez, F., Hillung, J., Cuevas, J. M., Gerrish, P. J., Daròs, J. A., Elena, S. F. 2012. Luria-Delbrück estimation of *Turnip mosaic virus* mutation rate *in vivo*. *J Virol* **86**:3386-3388.

Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A. et al. 2010. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6:e1000896.

Elbashir, S. M., Martínez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 20:6877-6888.

Eriksson, N., Pachter, L., Mitsuya, Y., Rhee, S. Y., Wang, C., Bharizadeh, B., Ronaghi, M., Shafer, R.W., Beerenwinkel, N. 2008. Viral population estimation using pyrosequencing. *PLoS Comp Biol* 4:e1000074.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinf Online* 1:47-50.

Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., Shen, C. H., Sharp P. A., Eisen H. N., Chen, J. 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2718-2723.

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

Guo, B., Vorwald, A. C., Alt, D. P., Lager, K. M., Bayles, D. O., Faaberg, K. S. 2011. Large scale parallel pyrosequencing technology: PRRSV strain VR-2332 nsp2 deletion mutant stability in swine. *Virus Res* 161:162-169.

Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., Chua, N.H. 2005 MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell* 17:1376-1386.

He, L., Hannon, G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 5:522-531.

Krönke, J., Kittler, R., Buchholz, F., Windisch, M. P., Pietschmann, T., Bartenschlager, R., Frese, M. 2004. Alternative approaches for efficient inhibition of *Hepatitis C virus* RNA replication by small interfering RNAs. *J Virol* 78:3436-3446.

Lafforgue, G., Martínez, F., Sardanyés, J., de la Iglesia, F., Niu, Q. W., Lin, S. S., Solé, R. V., Chua, N. H., Daròs, J. A., Elena, S. F. 2011. Tempo and mode of plant RNA virus escape from RNA interference-mediated resistance. *J Virol* 85:9686-9695.

Lin, S. S., Wu, H. W., Elena, S. F., Chen, K. C., Niu, Q. W., Yeh, S. D., Chen, C. C., Chua, N. H. 2009. Molecular evolution of a viral non-coding sequence under the selective pressure of amiRNA-mediated silencing. *PLoS Pathog* **5**:e1000312.

Martínez, F., Sardanyés, J., Elena, S. F., Daròs, J. A. 2011. Dynamics of a plant RNA virus intracellular accumulation: stamping machine vs. geometric replication. *Genetics* **188**:637-646.

Murcia, P. R., Baillie, G. J., Daly, J. et al. 2010. Intra- and interhost evolutionary dynamics of *Equine influenza virus*. *J Virol* **84**:6943-6954.

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

Qu, J., Ye, J., Fang, R. 2007. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* **81**:6690-6699.

Sabariegos, R., Giménez-Barcons, M., Tàpia, N., Clotet, B., Martínez, M. A. 2006. Sequence homology required by *Human immunodeficiency virus* type 1 to escape from short interfering RNAs. *J Virol* **80**:571-577.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-425.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:1121-1133.

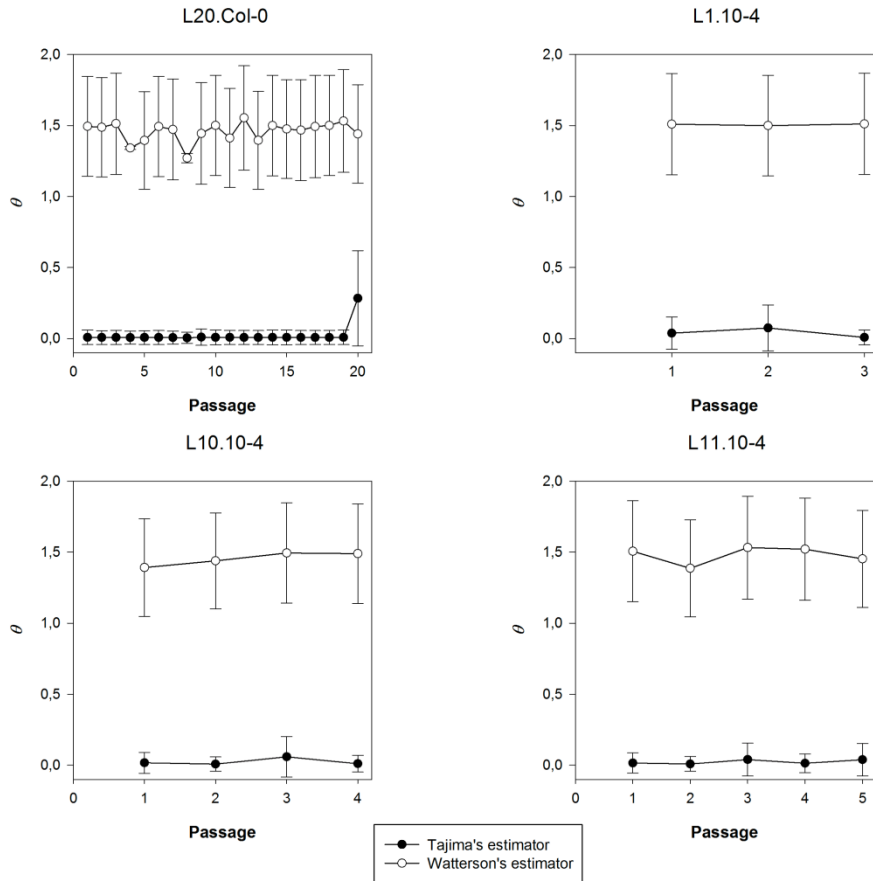
Solmone, M., Vincenti, D., Prosperi, M. C. F., Bruselles, A., Ippolito, G., Capobianchi, M. R. 2009. Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of *Hepatitis B virus* in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J Virol* **83**:1718-1726.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**:585-595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Tamura, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**:2731-2739.

Tromas, N. and Elena, S. F. 2010. The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus. *Genetics* **185**:983-989.

- Vaucheret, H., Vázquez, F., Crete, P., Bartel, D. P.** 2004. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* **18**:1187-1197.
- Von Eije, K. J., ter Brake, O., Berkhout, B.** 2008. *Human immunodeficiency virus* type 1 escape is restricted when conserved genome sequences are targeted by RNA interference. *J Virol* **82**:2895-2903.
- Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., Shafer, R. W.** 2007. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res* **17**:1195-1201.
- Warthmann, N., Chen, H., Ossowski, S., Weigel, D., Hervé, P.** 2008. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in rice. *PLoS ONE* **3**:e1829.
- Westerhout, E. M. and Berkhout, B.** 2007. A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucl Acids Res* **35**:4322-4330.
- Westerhout, E. M., Ooms, M., Vink, M., Das, A. T., Berkhout, B.** 2005. HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucl Acids Res* **33**:796-804.
- Willerth, S. M., Pedro, H. A. M., Pachter, L., Humeau, L. M., Arkin, A. P., Schaffer, D. V.** 2010. Development of a low bias method for characterizing viral populations using next generation sequencing technology. *PLoS ONE* **5**:e13564.
- Wright, C. F., Morelli, M. J., Thébaud, G., Knowles, N. J., Herzyk, P., Paton, D. J., Haydon, D. T., King, D. P.** 2011. Beyond the consensus: dissecting within-host viral population diversity of *Foot-and-mouth disease virus* by using next-generation genome sequencing. *J Virol* **85**:2266-2275.
- Zagordi, O., Klein, R., Däumer, M., Beerenwinkel, N.** 2010. Error correction of next-generation sequencing data and reliable estimation of HIV quasispecies. *Nucl Acids Res* **38**:7400-7409.



Supplementary Fig. 1. Evolution of the Tajima's θ_T and Watterson's θ_W estimators of the effective number of mutants contained in a population ($2N\mu$). Each panel corresponds to a different evolutionary lineage. If $\theta_T = \theta_W$, the observed variability matches the neutral expectation. Here, in all cases $\theta_T < \theta_W$, which indicates an excess of low frequency polymorphisms that have no effect on the number of polymorphic sites but reduce the average number of pairwise differences. This can be interpreted as an indication of selective sweeps or population bottlenecks.

CAPÍTULO III



Fate of Artificial MicroRNA-Mediated Resistance to Plant Viruses in Mixed Infections

Fernando Martínez, Santiago F. Elena, José-Antonio Daròs

First, second and third authors: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia), 46022 Valencia, Spain; second author: Santa Fe Institute, Santa Fe, New Mexico, USA.

Corresponding author: J.A. Daròs; E-mail address: jadaros@ibmcp.upv.es

Phytopathology (2013) 103(8):870-876



ABSTRACT

Artificial microRNAs (amiRNAs) are the expression products of engineered microRNA (miRNA) genes that efficiently and specifically down-regulate RNAs that contain complementary sequences. Transgenic plants expressing high levels of one or more amiRNAs targeting particular sequences in the genomes of some RNA viruses have shown specific resistance to the corresponding virus. This is the case of the *Arabidopsis thaliana* transgenic line 12-4 expressing a high level of the amiR159-HC-Pro targeting 21 nucleotides in the *Turnip mosaic virus* (TuMV; family *Potyviridae*) cistron coding for the viral RNA silencing suppressor HC-Pro that is highly resistant to TuMV infection. In this study we explored the fate of this resistance when the *A. thaliana* 12-4 plants are challenged with a second virus in addition to TuMV. The *A. thaliana* 12-4 plants maintained the resistance to TuMV when this virus was co-inoculated with *Tobacco mosaic virus*, *Tobacco rattle virus* (TRV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Turnip yellow mosaic virus*, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Lettuce mosaic virus* or *Plum pox virus*. However, when the plants were pre-infected with these viruses, TuMV was able to co-infect 12-4 plants pre-infected with TRV, CaMV, and, particularly, with CMV. So, pre-infection by another virus jeopardizes the amiRNA-mediated resistance to TuMV.

INTRODUCTION

Most groups of eukaryotic organisms contain in their genomes microRNA (miRNA) genes, which are involved in the regulation of gene expression and epigenetic modifications (Ambros, 2008). Genes coding for miRNAs are transcribed by the RNA polymerase II in long non-protein-coding primary-microRNA transcripts (pri-miRNAs), which are first processed to fold-back precursors (pre-miRNAs) and then matured to small double stranded RNAs (Bartel, 2004). The guide and passenger strands forming the RNA duplex are properly unfolded and only the mature miRNA (guide strand) is recruited by an Argonaute (AGO) protein to form the active RNA-induced silencing complex (RISC). In plants, like *Arabidopsis thaliana* L., Dicer-like1 (DCL1), an enzyme of the Dicer family with two RNase III domains, mediates cleavage of the pri- and pre-miRNAs. The miRNA loaded in RISC acts as a template to guide the silencing of complementary target mRNAs. In plants, miRNAs are usually highly complementary to their target, which typically triggers the cleavage of the targeted mRNA and subsequent degradation (Llave *et al.*, 2002; Voinnet, 2009).

Soon after the discovery of the basic steps of the miRNA processing pathway, it was shown that both animal and plant miRNA precursors could be engineered to express small RNAs whose sequences were unrelated to the corresponding mature miRNAs (Zeng *et al.*, 2002; Parizotto *et al.*, 2004). The utility of the artificial miRNA (amiRNA) technology was previously demonstrated in plants silencing genes with high specificity (Alvarez *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2006). Schwab *et al.* (2006) designed and expressed a series of amiRNAs based on *A. thaliana* miRNA172a and miRNA319a backbones to target selected genes with notable phenotypic outcomes. The technology of amiRNAs was quickly adapted to produce virus resistant plants. Niu *et al.* (2006) generated *A. thaliana* transgenic lines expressing amiRNAs targeting two different 21-nt regions in the genes coding for the P69 and HC-Pro RNA silencing suppressors of *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV; family *Tymoviridae*) and *Turnip mosaic virus* (TuMV; family *Potyviridae*). Each amiRNA (amiR159-P69 and amiR159-HC-Pro) was produced from a 273-nt backbone based

on the precursor of the endogenous amiR159a from *A. thaliana* and conferred specific resistance to the corresponding virus (Niu *et al.*, 2006). Similar strategies based on the expression of one or co-expression of two or more amiRNAs conferred resistance to *Cucumber mosaic virus* (CMV) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Qu *et al.*, 2007), in *A. thaliana* (Duan *et al.*, 2008) and in tomato (Zhang *et al.*, 2011), *Potato virus Y* in tobacco (Jiang *et al.*, 2011), some negative-sense single-stranded RNA viruses in *Nicotiana benthamiana* Domin. plants (Kung *et al.*, 2012), or *Wheat streak mosaic virus* in wheat (Fahim *et al.*, 2012).

Using two different *A. thaliana* transgenic lines expressing different levels of the amiR159-HC-Pro against TuMV (Niu *et al.*, 2006), we have recently investigated the likelihood of emergence of virus variants able to break the amiRNA-mediated resistance (Lafforgue *et al.*, 2011a). Although the *A. thaliana* transgenic line 12-4 expressing a high level of the amiR159-HC-Pro was remarkably resistant to TuMV infection, certain virus populations evolved by successive passaging in *A. thaliana* wild-type (WT) plants were able to break the resistance. All virus populations breaking resistance had fixed alleles with at least one mutation in the 21-nt sequence targeted by the amiRNA. Interestingly, virus evolved by successive passaging in the *A. thaliana* transgenic line 10-4 expressing a sub-inhibitory level of the amiR159-HC-Pro broke the resistance of the 12-4 line at a seven times higher rate (Lafforgue *et al.*, 2011a). Characterization by ultra-deep sequencing of some of the virus lineages that were able to break the resistance in the *A. thaliana* 12-4 transgenic line showed that from the very first passage the virus populations contained many alleles potentially able to break resistance, although at low frequencies. Some of these resistance-breaking alleles were predominant in the viral population once the resistance was broken in the *A. thaliana* 12-4 line, although co-existed with the WT allele, now at low frequency (Martínez *et al.*, 2012). Not surprisingly, the frequencies of the potentially resistance-breaking alleles were more than one order of magnitude higher in the virus populations evolved in the *A. thaliana* transgenic line 10-4 expressing a sub-inhibitory amount of the amiR159-HC-Pro (Martínez *et al.*, 2012).

The goal of the present study was to analyze another potential cause of breaking the amiRNA-mediated antiviral resistance, namely mixed viral infections. Plants use some of the RNA silencing pathways as one of main defense line against invading viruses (Ding y Voinnet, 2007b). Viruses respond with the expression of RNA silencing suppressors to counteract the plant defense (Li y Ding, 2006a), and the expression of some viral RNA silencing suppressors has been shown to interfere not only with the antiviral RNA silencing pathways but also with the miRNA pathway (Kasschau *et al.*, 2003), potentially affecting the amiRNA biogenesis. Here, we screened the fate of the amiR159-HC-Pro-mediated resistance to TuMV in mixed infections with viruses belonging to five different taxonomic groups. The virus accompanying TuMV was either co-inoculated or pre-inoculated in the *A. thaliana* 12-4 transgenic line. Our results illustrate how some viruses like *Tobacco rattle virus* (TRV), *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and, notably, CMV help TuMV break the amiRNA-mediated resistance when they are already present in the plant at the moment of TuMV inoculation.

MATERIALS AND METHDOS

Plant inoculations

To produce TuMV, *Tobacco mosaic virus* (TMV), TRV, CMV, TYMV, CaMV, *Lettuce mosaic virus* (LMV), and *Plum pox virus* (PPV) infectious extracts, adequate host plants for each virus were inoculated with an initial infectious material (see below). About 14 days post-inoculation (dpi), when infection symptoms were clearly observable, symptomatic tissues were harvested, aliquoted, and frozen and stored at -80°C . Aliquots of the different infected tissues were then ground with a mortar and pestle in the presence of liquid N_2 and homogenized in ten volumes of inoculation buffer (50 mM potassium phosphate, pH 8.0). The resulting crude extracts were used to mechanically inoculate batches of 3-week-old *A. thaliana* WT and transgenic (line 12-4, expressing a high level of amiR159-HC-Pro) plants. For this purpose, three aliquots of 5 μl 10% Carborundum in inoculation buffer were

applied onto three different fully-expanded rosette leaves and a cotton swab, soaked with infectious extract (or 1:1 mix of extracts in co-inoculation experiments), rubbed gently on the leaves' surface. In both the co-inoculation and pre-inoculation experiments, four *A. thaliana* WT plants were inoculated with TuMV and TMV, TRV, TYMV, LMV or PPV, and 20 *A. thaliana* WT plants were inoculated with TuMV and CMV or CaMV. In the case of the *A. thaliana* 12-4 plants two batches of 20 plants were inoculated in two independent experiments (total 40 plants) with TuMV and each one of the seven other viruses for both the co-inoculation and pre-inoculation. In pre-inoculation experiments, the other viruses were first inoculated and a week later three new fully-expanded rosette leaves were inoculated with TuMV. Plants were kept in a growth chamber with cycles of 12 h of light at 25 °C and 12 h of darkness at 23 °C.

To produce the initial TuMV infection, *N. benthamiana* plants were mechanically inoculated with a plasmid containing a TuMV cDNA (GenBank accession number AF530055.2 with a few point mutations) corresponding to isolate YC5 from calla lily (*Zantedeschia* sp.) (Chen *et al.*, 2003) under the control of CaMV 35S promoter (Chen *et al.*, 2007). In the case of TMV, *N. benthamiana* plants were mechanically inoculated with 5'-capped transcripts produced *in vitro* from a plasmid containing a cDNA of the TMV-U1 strain (Chen *et al.*, 1996). The initial infection of TRV was produced by agroinoculation of *N. benthamiana* plants with a 1:1 mix of two *Agrobacterium tumefaciens* transformed with plasmids containing the cDNAs corresponding to the RNA1 and RNA2 of this virus under the control of the CaMV 35S promoter (Dinesh-Kumar *et al.*, 2003). A mix of the three 5'-capped transcripts corresponding to the CMV-Fny strain were produced *in vitro* and mechanically inoculated in tobacco (Rizzo y Palukaitis, 1989). The infection with TYMV was started by mechanical inoculation of *A. thaliana* with a plasmid containing a TYMV cDNA (Pflieger *et al.*, 2008). Plasmid pCaMVW260 (Schoelz y Shepherd, 1988) was mechanically inoculated in *Brassica rapa* L. cv. Just Right. A plasmid with the cDNA of an LMV sequence variant consisting of a recombinant between LMV-E and LMV-AF199 under the control of CaMV 35S promoter and *A. tumefaciens nos* terminator (Krause-Sakate *et al.*, 2005; Nicaise *et al.*, 2007) was mechanically

inoculated in *N. benthamiana*. Finally, the Rankovic strain of PPV under the control of 35S promoter and *nos* terminator was agroinoculated in *N. benthamiana* (López-Moya *et al.*, 2000).

Virus diagnosis

Fourteen days after the co-inoculation or after the second inoculation (pre-inoculation experiments), 100 mg of tissue from various systemic leaves were harvested, frozen and ground in a 2 ml Eppendorf tube with a 4 mm diameter stainless steel ball using a Retsch MM300 mill for 1 min at 30 s⁻¹. RNA or DNA was purified using silica gel spin columns eluting in 10 µl (Zymo Research, Irving, CA, USA). To reverse transcribe the viral RNAs, 1 µl of the RNA preparations were subjected to reverse transcription with 50 U M-MuLV reverse transcriptase (Revertaid, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 10 U RNase inhibitor (Thermo Scientific), 1 mM dNTPs and 5 pmol of the appropriate primer depending on the diagnosed virus (Table 1) in a 10 µl volume reaction with 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂ and 10 mM dithiothreitol for 45 min at 42 °C, 10 min at 50 °C and 5 min at 60 °C. The mix of RNA and primer in H₂O was denatured for 1.5 min at 98 °C prior to addition of the remaining reagents. One µl of DNA or the cDNA product of the RT reaction were subjected to PCR amplification in 20 µl volume reactions with 1 U *Thermus thermophilus* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain), 1 µM each primer (Table 1), 0.2 mM dNTPs, 75 mM Tris-HCl, pH 9.0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl and 20 mM (NH₄)₂SO₄. Reactions were incubated for 2 min at 94 °C followed by 30 cycles of 40 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 3 min at 72 °C, with a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels in buffer TAE (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.2). Gels were stained with ethidium bromide.

AmiR159-HC-Pro quantification

Total RNA was extracted from three different fully-expanded rosette leaves of three independent 4-week-old amiR159-HC-Pro-expressing *A. thaliana* plants (line 12-4) non-inoculated or pre-infected by TMV, TRV, CMV, TYMV, CaMV, LMV or PPV

using the Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK). The quantification of amiR159-HC-Pro in the RNA preparations was performed by RT-quantitative PCR as described before (Lafforgue *et al.*, 2011).

Table 1. Primers used in virus diagnosis by RT-PCR and PCR.

Virus	Reaction	Deoxyoligonucleotide sequence (from 5' to 3')
TuMV	RT	TGTCCTTGCATCCTATCAAATGTAAAG
	PCR	GCAGGTGAAACGCTTGATGCAGGTTTG (F) ^a CAACCCCTGAACGCCAGTAAGTTATG (R) ^a
TMV	RT	CGCTTTATTACGTGCCTGCGGATGT
	PCR	CGTTGATGAGTTCGTGGAAGATGTC (F) GTGGAGGGAAAAGCACTATGCG (R)
TRV	RT	CTAATGGCATCAGTGAATATGGTATCACC
	PCR	TAGGGATTAGGACGTATCGGACCTC (F) GTCCTGCTGACTTGATGGACGATTC (R)
CMV	RT	TCAGACTGGGAGCACTCCAGACG
	PCR	ATGGACAAATCTGAATCAACC (F) TCAGACTGGGAGCACTCCAGACG (R)
TYMV	RT	GGTGGAAAGTGTCCTGATGAGCGG
	PCR	CGACAAAGACTCGCCCCAAG (F) GGTGGAAAGTGTCCTGATGAGCGG (R)
CaMV	PCR	ATCAACAAAGTTGATGG (F) GAAGGTATT TGATCTCCTG (R)
LMV	RT	CCAGACTAGCAACCTTCGAGG
	PCR	CACAGAACAGACTGTTTGAATG (F) GCTGAACCTACGCCCTTACG (R)
PPV	RT	CACCTTTGGCAGAGATAGTTTCG
	PCR	GACTACGGCGTCAATGCTCAAC (F) CACCTTTGGCAGAGATAGTTTCG (R)

^a (F) and (R) indicate forward and reverse.

Statistical analyses

In single infection experiments, Fisher's exact probability tests for 2×2 contingency tables (Sokal y Rohlf, 1995) were used to evaluate the effect of *A. thaliana* genotype (WT vs. 12-4) on the infectivity of each virus. In multiple inoculation experiments Fisher's exact probability tests for 2×3 contingency tables (Freeman y Halton, 1951) were used to evaluate the effect of *A. thaliana* genotype or inoculation scheme (pre- vs. co-inoculation) in TuMV infectivity in presence of the different companion viruses. The same test was also used to discard block effects in the case of the *A. thaliana* 12-4 plants. Infectivity data were also analyzed in a different way. An infection interference index was computed between pairs of co-infecting viruses as

$$S_{\text{TuMV},y} = p_{\text{TuMV},y} - p_{\text{TuMV}}p_y, \quad (\text{Eq. 1})$$

where $p_{\text{TuMV},y}$ was the observed frequency of plants simultaneously infected by TuMV and companion virus y and p_{TuMV} and p_y the observed frequencies of infection for TuMV and virus y in single inoculation experiments (Table 2). If the infectivity of TuMV is independent of the presence of the companion virus y , then observed and expected ($p_{\text{TuMV}}p_y$) frequencies will be equal and thus $S_{\text{TuMV},y} = 0$. Values of $S_{\text{TuMV},y}$ significantly deviating from this null expectation imply synergistic (positive) or antagonistic (negative) interference during infection. To evaluate the statistical significance of $S_{\text{TuMV},y}$ estimates, we proceeded as follows. First, the standard error of every p in Eq. 1 was calculated as $\sigma_p = \sqrt{p(1-p)/n}$ (Whitlock y Schluter, 2009), where n is the number of plants inoculated for a given trial. Second, we applied Fisher's delta method for error propagation to Eq. 1 to obtain the standard error of $S_{\text{TuMV},y}$, $\sigma_{S_{\text{TuMV},y}} = \sqrt{\sigma_{p_{\text{TuMV},y}}^2 + p_y^2 \sigma_{p_{\text{TuMV}}}^2 + p_{\text{TuMV}}^2 \sigma_{p_y}^2}$. Finally, statistical significance of $S_{\text{TuMV},y}$ was evaluated using the standard normal distribution. Other statistical tests are introduced when necessary. All analyses were performed using IBM SPSS (v. 21 Armonk, NY, USA).

RESULTS

Co-inoculation of the *A. thaliana* transgenic line 12-4 expressing the amiR159-HC-Pro with TuMV and a series of other viruses

The *A. thaliana* transgenic line 12-4 that expresses a high level of the antiviral amiR159-HC-Pro, which targets 21-nt in the TuMV cistron coding for HC-Pro (Fig. 1), is highly resistant to TuMV infection (Niu *et al.*, 2006; Lafforgue *et al.*, 2011a). To investigate the outcome of this resistance when the plants are challenged by two different viruses in mixed infections, plants were co-inoculated with infectious extracts of TuMV and other viruses belonging to the same or different taxonomic groups. We chose TMV (genus *Tobamovirus*) and TRV (genus *Tobravirus*), both belonging to the family *Virgaviridae*, CMV (family *Bromoviridae*), TYMV (family *Tymoviridae*), and CaMV (family *Caulimoviridae*) as representatives from phylogenetically unrelated families. We also chose two viruses belonging, like TuMV, to the genus *Potyvirus* (family *Potyviridae*): LMV and PPV. All these viruses and particularly the sequence variants used in this study were previously described to be highly infectious in the ecotype Col-0 of *A. thaliana*. Nonetheless, we checked their infectivity in our particular experimental conditions.

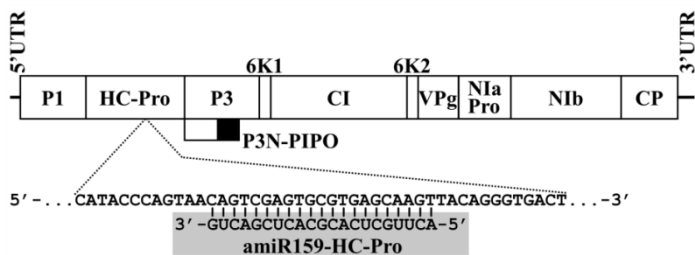


Fig. 1. Schematic representation of the TuMV genome with a fragment of the sequence in the HC-Pro cistron containing the 21-nt complementary target of the amiR159-HC-Pro (boxed on gray background) expressed in the *A. thaliana* transgenic line 12-4. The boxes P1, HC-Pro, P3, P3N-PIPO, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIaPro, NIB, and CP represent the cistrons coding for the different TuMV gene products. The lines 5'UTR and 3'UTR represent the 5' and 3' untranslated regions, respectively.

Using plasmids containing the DNA (CaMV) or the cDNAs (all the other) of the different viruses, we first infected a typical host plant for each virus. As soon as the

plants showed symptoms, the symptomatic tissues were harvested and frozen. Aliquots of these tissues were used to produce the different infectious extracts that were employed to mechanically inoculate WT and amiR159-HC-Pro-expressing (line 12-4) *A. thaliana* plants. Fourteen dpi, infection by the different viruses was diagnosed by PCR (CaMV) or RT-PCR (all the other viruses) and subsequent electrophoretic analysis of the amplification products. All extracts were highly infectious in WT *A. thaliana* plants (Table 2). All extracts, except TuMV ($p < 0.001$) were also highly infectious in 12-4 *A. thaliana* plants (Table 2).

Table 2. Infectivity of the different infectious extracts in plants of *A. thaliana* WT and the transgenic line 12-4 expressing high levels of the antiviral amiR159-HC-Pro.

	<i>A. thaliana</i> WT ^a	<i>A. thaliana</i> 12-4 ^a
TuMV	4/4	0/20
TMV	4/4	20/20
TRV	3/4	14/18
CMV	18/20	18/20
TYMV	4/4	20/20
CaMV	19/20	18/20
LMV	4/4	20/20
PPV	4/4	15/18

^a Number of infected plants (14 dpi) over the number of inoculated plants.

Next, we sought to evaluate if co-inoculation of plants with other viruses affected the infectivity of TuMV, in particular in the highly resistant 12-4 plants. To do so, we co-inoculated WT and 12-4 *A. thaliana* plants with TuMV and each one of the other viruses.

Fourteen dpi systemic tissues were harvested, total RNA or DNA purified and the virus infections diagnosed. Co-inoculation of the transgenic 12-4 plants was carried independently twice with two batches of 20 plants. Results of both replicates of the experiment were homogenous ($P = 1$ in all cases); therefore, we combined the results to calculate the ratios of infected plants. Fig. 2A shows the ratio of plants that

were co-infected with both viruses or singly infected with the other virus or with TuMV. In the co-inoculations with TMV, TRV and LMV, all WT plants were co-infected with both viruses, whereas most 12-4 plants were singly infected by TMV, TRV or LMV, and these differences in infectivity between plant genotypes were highly significant ($P < 0.001$ in all three cases). The results with CMV were similar, but in this case only 70% of the WT plants were co-infected and 67% of the 12-4 plants were infected by only CMV (test of equal infectivity between plant genotypes: $P < 0.001$). In the case of CaMV, results were more complex because 75% of the WT plants were doubly infected and the remaining 25% were infected just with TuMV, whereas 20% of the 12-4 plants were infected by only CaMV and the other 80% not infected at all (test of equal infectivity between plant genotypes: $P < 0.001$). In the co-inoculation with TuMV and TYMV, all WT and 12-4 plants were singly infected by TYMV. Finally, in the co-inoculation with TuMV and PPV, TuMV singly infected all WT plants whereas most 12-4 plants were infected only by PPV. In all the cases, not a single amiR159-HC-Pro-expressing 12-4 plant was infected by TuMV (Fig. 2A).

Table 3 shows the infectivity indexes $S_{\text{TuMV},y}$ estimated for TuMV and each one of the seven companion viruses obtained for the co-infection experiments. Interestingly, TYMV and PPV showed significant antagonism with TuMV in WT *A. thaliana* plants ($S_{\text{TuMV},y} < 0$). Since TuMV was not found in any of the co-inoculated 12-4 plants, $S_{\text{TuMV},y} = 0$ in all cases (Table 3).

In conclusion, while there appear to be interactions and interference between some of the viruses and TuMV when co-inoculated, we observed no impact of the co-inoculation with any one of the seven companion viruses on the ability of TuMV break the amiR159-HC-Pro mediated resistance of 12-4 plants.

Inoculation with TuMV of amiR159-HC-Pro-expressing *A. thaliana* plants already infected with another virus

To further investigate the resistance of the *A. thaliana* 12-4 line to TuMV in mixed infections, we performed experiments in which plants were pre-inoculated with the other viruses and then inoculated with TuMV at 7 dpi, once the infection by these

other viruses was established. Fourteen days after the second inoculation, DNA or RNA was purified from systemic tissues and the infection by the different viruses diagnosed by PCR or RT-PCR (Fig. 2B). Those plants that were diagnosed as non-infected by the first virus after the pre-inoculation were discarded from the analysis. Again, pre-inoculation of the transgenic 12-4 plants was carried independently twice with two batches of 20 plants. Results of both replicates of the experiment were also homogenous ($P \geq 0.229$ in all cases) and the counts combined to calculate ratios of infected plants.

The new experimental setup did not alter the results in the cases of TMV and LMV: all WT plants were co-infected with both viruses whereas all the 12-4 plants were singly infected by TMV or LMV (Fig. 2B). Surprisingly, the pre-inoculation approach in the case of TYMV gave the same result as TMV and LMV, and radically different from what was observed in the co-inoculation experiment: all WT plants were infected by both viruses whereas all 12-4 plants were infected only by TYMV (Fig. 2B). Identical results were obtained for plants pre-infected with PPV: all WT plants were co-infected by both viruses whereas all 12-4 plants were singly infected by PPV (Fig. 2B). This lack of effect of the inoculation method (co- or pre-inoculation) on TuMV infectivity was consistent with the non-significant result of Fisher's exact probability tests run for each of these viruses ($P = 1$ in all cases). However, pre-infection of the 12-4 plants with TRV, CMV and CaMV significantly helped TuMV break the resistance provided by the amiRNA in a variable extent. In the case of CaMV, all the WT plants were doubly infected by CaMV and TuMV, whereas approximately 36% of the infected 12-4 plants were doubly infected (Fig. 2B). Nonetheless, the effect of the inoculation method was not significant for CaMV in either plant genotype ($P = 0.182$ for WT and $P = 0.076$ for 12-4). Similarly, in the case of TRV, all the WT plants were doubly infected by TRV and TuMV, whereas approximately 29% of the 12-4 plants were co-infected by TRV and TuMV (Fig. 2B), with the difference of the inoculation method significant in the 12-4 plants ($P = 0.01$) but not in the WT plants ($P = 1$). Finally, the most remarkable results were obtained for CMV: all WT and approximately 94% of the 12-4 plants were doubly infected by both CMV and TuMV (Fig. 2B). The inoculation method has no effect

for the WT plants ($P = 1$) while it has a highly significant effect on the 12-4 plants ($P < 0.001$).

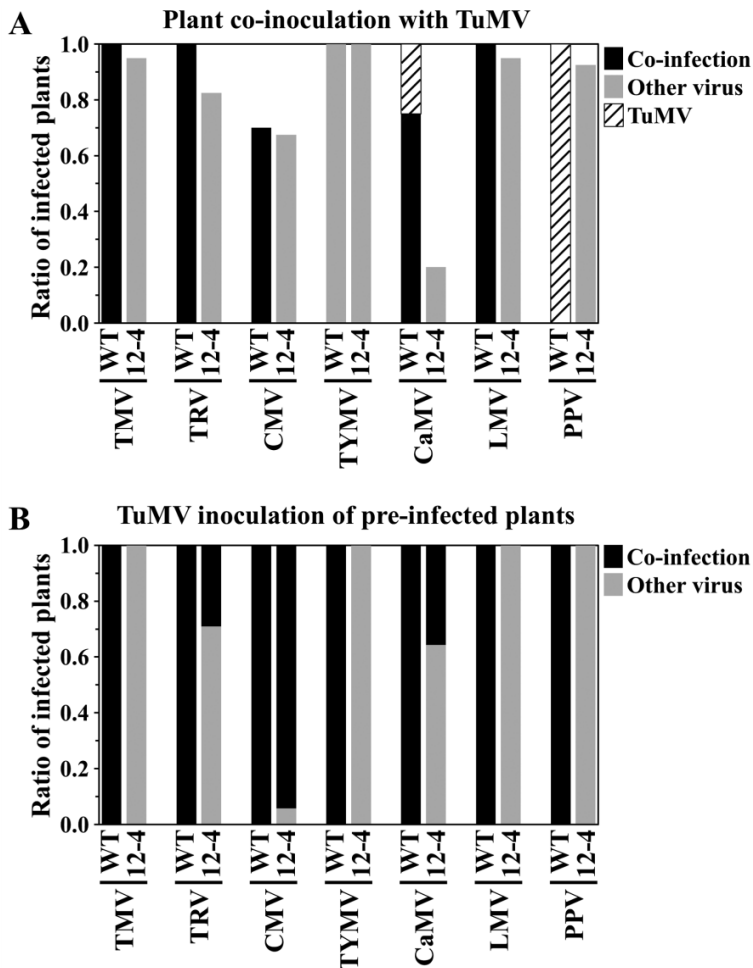


Fig. 2. Infectivity of TuMV in mixed inoculations with TMV, TRV, CMV, TYMV, CaMV, LMV, and PPV in WT and amiR159-HC-Pro-expressing 12-4 *A. thaliana* plants. (A) Plants were co-inoculated and the viruses diagnosed 14 dpi. (B) Plants were pre-infected with the other virus and inoculated with TuMV at 7 dpi. Plants were diagnosed 14 days after the second inoculation. Black, gray and striped columns indicate plants co-infected, singly infected by the other virus or singly infected by TuMV, respectively. Note that in (B), since only plants pre-infected by the other virus were inoculated with TuMV, no TuMV singly-infected plants (striped column) could exist.

Table 3 shows the infection interference indexes $S_{TuMV,y}$ computed for TuMV and each one of the seven companion viruses in the pre-inoculation experiments. In

agreement to the results described in the previous paragraph, the outcome of TuMV infection was independent on whether the companion virus was present or absent (no significant deviations from the independent action hypothesis) in WT plants. By contrast, TRV, CMV and CaMV show highly significant positive synergy with TuMV (Table 3) when pre-inoculated in the 12-4 plants.

In conclusion, we observed that pre-infection with TRV, CaMV, and particularly with CMV had a positive effect on the ability of TuMV to infect and accumulate in the 12-4 resistant plants.

Table 3. Infection interference index ($S_{\text{TuMV},y} \pm 1 \sigma_S$) computed for TuMV and each of the seven companion viruses (y) in both *A. thaliana* genotypes and using both inoculation schemes^a.

Companion virus	<i>A. thaliana</i> WT	<i>A. thaliana</i> 12-4
Co-inoculation experiments		
TMV	0	0
TRV	0.250 ± 0.217 ($P = 0.124$)	0
CMV	0.100 ± 0.067 ($P = 0.068$)	0
TYMV	-1	0
CaMV	-0.2 ± 0.146 ($P = 0.146$)	0
LMV	0	0
PPV	-1	0
Pre-inoculation experiments		
TMV	0	0
TRV	0	0.290 ± 0.082 ($P < 0.001$)
CMV	0.047 ± 0.118 ($P = 0.344$)	0.943 ± 0.039 ($P < 0.001$)
TYMV	0	0
CaMV	0 ± 0.097 ($P = 0.500$)	0.357 ± 0.091 ($P < 0.001$)
LMV	0	0
PPV	0	0

^aThe significance of the null hypothesis of no interference ($S_{\text{TuMV},y} = 0$) was evaluated using the standard normal distribution z test (provided in parenthesis).

Effect of virus infection on amiR159-HC-Pro concentration

After observing that pre-infection with some viruses helps TuMV break the resistance mediated by the amiR159-HC-Pro in the 12-4 *A. thaliana* plants, we measured the amiR159-HC-Pro concentration, in triplicate, in non-inoculated plants (control) and in plants pre-infected by each one of the seven companion viruses. The tissues assayed for amiR159-HC-Pro concentration were equivalent to those inoculated with TuMV in the pre-inoculation experiments. Fig. 3 shows that the amiR159-HC-Pro concentration increased in all infected plants compared to the non-inoculated control. The lowest accumulation corresponds to CaMV-infected plants (1.37 times more than the control) and the largest to plants infected with TYMV (2.5-fold increase relative to the control). A Kruskal-Wallis test found significant overall differences among experiments ($H = 15.760$, 7 d.f., $P = 0.027$) and a *post hoc* Tukey's HSD test identified two homogenous but overlapping groups (indicated by a and b in Fig. 3). Significant pairwise differences were only found between the negative control and TMV and TYMV. Interestingly, no obvious association exists between the level of amiR159-HC-Pro accumulation in plants infected with the other viruses and whether TuMV was able to accumulate.

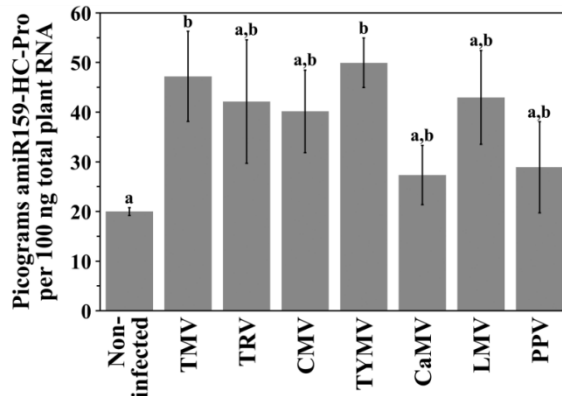


Fig. 3. Accumulation of the amiR159-HC-Pro in *A. thaliana* plants (line 12-4) non-infected and infected by TMV, TRV, CMV, TYMV, CaMV, LMV and PPV. Columns represent the average amount of amiRNA (picograms per 100 ng of total plant RNA) in fully-expanded rosette leaves of three plants. Error bars indicate $\pm 1 \sigma$. Letters a and b indicate homogeneous groups according to a Tukey's HSD *post hoc* test.

DISCUSSION

The amiRNA technology has provided some promising results towards the aim of obtaining a new generation of crop plants resistant to viruses (Niu *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007; Duan *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Fahim *et al.*, 2012; Kung *et al.*, 2012). In addition to a strong virus resistance achieved in some transgenic lines expressing high levels of one or more amiRNAs, the technology offers the advantages of little risk of off-target effects and negligible chance of recombination with other invading viral genomes, due to the small size of the mature amiRNAs. However, as advanced when the antiviral properties of the technology in plants were first demonstrated (García y Simón-Mateo, 2006), viruses and particularly RNA viruses, thanks to their amazing evolutionary potential, are able to cope with the resistance.

The *A. thaliana* transgenic line 12-4 that expresses a high level of the amiR159-HC-Pro (Fig. 1) is highly resistant to TuMV infection when the plants are inoculated with a virus population amplified by simply infecting a susceptible host plant with a particular TuMV cDNA containing the 21-nt target of the amiRNA (Niu *et al.*, 2006; Lafforgue *et al.*, 2011a). However, when the viral population is allowed to evolve by successive passaging from plant to plant, the amiRNA-mediated resistance is finally broken (Lafforgue *et al.*, 2011a). Nonetheless, the performance of this resistance trait was remarkable, because 25 independent lineages of TuMV took a median of 14 evolutionary passages from WT to WT *A. thaliana* to finally break resistance (Lafforgue *et al.*, 2011a). It is, therefore, worth exploring the potentiality and limitations of this technology as an antiviral strategy to manage it properly in a future and more biotechnological agriculture. For example, Duan *et al.* (2008) showed that the antiviral efficacy of amiRNAs depend on the local structures of the target RNAs. Also, Kung *et al.* (2012) showed that the levels of virus resistance are positively correlated with the amiRNA expression levels and that expression of more than one amiRNA has an additive effect. We have previously shown that plants expressing sub-inhibitory amounts of the antiviral amiRNA jeopardize the resistance, because the virus population infecting these plants contain

a higher frequency of alleles with mutations in the amiRNA target potentially able to break resistance (Lafforgue *et al.*, 2011a; Martínez *et al.*, 2012).

In this study, we analyzed the fate of the amiR159-HC-Pro-mediated resistance to TuMV of the *A. thaliana* transgenic line 12-4 in mixed viral infections, a frequent situation in nature. For this purpose, we screened the ability of TuMV to infect the *A. thaliana* transgenic line 12-4 when co-inoculated with another virus and when inoculated in plants that were already infected with another virus. In these experiments we used a total of seven different companion viruses: four (+)-strand RNA viruses (TMV, TRV, CMV, and TYMV) and one DNA virus (CaMV) belonging to four different families apart from the *Potyviridae*, and two RNA viruses (LMV and PPV), belonging to the same genus (*Potyvirus*) and family (*Potyviridae*) as TuMV. All seven viruses assayed in this study, or at least the sequence variants used here, were highly infectious in the ecotype Col-0 of *A. thaliana* and this high infectivity was not affected by the expression of the anti-TuMV amiR159-HC-Pro (Table 2).

The amiR159-HC-Pro protected the *A. thaliana* plants from TuMV infection in the co-inoculation experiments. Not a single plant belonging to the 12-4 line was infected by TuMV (Fig. 2A). In contrast, most of the WT plants were co-infected by TuMV and the companion virus. A notable exception to this observation was co-inoculation of WT plants with TYMV: not a single WT plant was infected by TuMV, suggesting an antagonistic effect of TYMV on TuMV infection ($S_{\text{TuMV,TYMV}} < 0$; Table 3). Another exception was PPV, all WT plants were singly infected by TuMV and all 12-4 plants were singly infected by PPV. In this case, the antagonistic effect is of TuMV on PPV infection of WT plants (Table 3). An antagonistic effect is also suggested by the results of the co-inoculation with CaMV. TuMV infected all the WT plants and most were co-infected by CaMV, but TuMV also singly infected some plants. In this case, the antagonistic effect is of TuMV on CaMV infection, although the effect was not strong enough as to reach statistical significance (Table 3). Interestingly, although TuMV did not infect a single *A. thaliana* 12-4 plant when co-inoculated with CaMV, this second virus was only able to infect a few (20%) of these plants (Fig. 2A). This result indicates that the antagonistic effect of TuMV on

CaMV infection might occur even though TuMV itself not being able to establish a systemic infection due to the presence of the anti-TuMV amiRNA. If this interpretation is correct, the amiRNA blockage to the TuMV infection would occur in a step of TuMV infection in which this virus would have already interfered with the CaMV infection.

The amiRNA-mediated protection of the *A. thaliana* plants against TuMV in the pre-inoculation experiments was also notable, but in this case some of the viruses definitively helped TuMV break the resistance (Fig. 2B). Pre-infection with TMV, TYMV, LMV, and PPV did not have any effect on TuMV ability to break resistance. Not a single 12-4 plant was infected by TuMV (inoculated at 7 days after the first virus) while all the WT plants were co-infected by TuMV and the second virus. It is interesting to note that while TYMV blocked TuMV infection and TuMV blocked PPV infection of the WT plants in the co-inoculation experiments, this effect was not observed in the pre-inoculation experiments, indicating that the antagonistic effect extends exclusively to the initial steps of infection. TRV and CaMV helped TuMV break the resistance provided by the amiRNA in the pre-inoculation experiments: some of the 12-4 plants were co-infected by TRV and TuMV, and CaMV and TuMV (Fig. 2B). The most remarkable case was, however, CMV. Most 12-4 plants pre-infected with CMV were also co-infected with TuMV (Fig. 2B).

Our experiments do not allow dissecting why TRV and CaMV, and particularly CMV, help TuMV break the amiRNA-mediated resistance, but we can speculate that the RNA silencing suppressors expressed by these viruses somehow interfere with the expression, maturation, stability or activity of the amiR159-HC-Pro, clearing the way to the TuMV infection. Quantification of the amiR159-HC-Pro in *A. thaliana* plants pre-infected with the seven viruses and in non-inoculated controls showed that in all cases infection with the companion viruses increases the concentration of the amiRNA in leaf tissues at 7 dpi (Fig. 3; the increase respect to the non-inoculated control was not statistically significant in CaMV and PPV). This result indicates that the TuMV resistance breakdown induced by CMV, CaMV and TRV is not caused by a reduction in the amiRNA concentration, but possibly by

affecting the functionality of the amiRNA. The CMV 2b protein has been shown to be a suppressor of RNA silencing (Brigneti *et al.*, 1998). Despite being a small protein, it interacts with many factors and pathways in the infected host (González *et al.*, 2012). However, two activities are considered crucial to interfere with the plant antiviral RNA silencing pathways: the siRNA binding activity (González *et al.*, 2010), and the Argonaute1 binding activity that inhibits slicing by RISC (Zhang *et al.*, 2006). Interestingly, CMV 2b has also been shown to bind miRNA *in vivo* (Hamera *et al.*, 2012). In the case of TRV, the RNA silencing suppressor activity has been associated to the 16-kDa protein (Martínez-Priego *et al.*, 2008). This is considered a weak suppressor not affecting the endogenous miRNA pathway, however in our pre-inoculation experiment pre-infection with TRV helped TuMV break the amiR159-HC-Pro-mediated resistance in 29% of the plants, suggesting some kind of interference with the amiRNA pathway. Finally, the P6 protein is the viral RNA silencing suppressor of CaMV (Love *et al.*, 2007). This protein interacts with the double-stranded RNA binding protein DRB4 that facilitates the activity of the major plant antiviral silencing factor Dicer-like4 (Haas *et al.*, 2008). Again, our results suggest some kind of interference of the CaMV infection with the amiRNA activity.

In our study we included two potyviruses, LMV and PPV. None of them helped TuMV break the resistance provided by the amiR159-HC-Pro neither in the co-inoculation nor in the pre-inoculation assay, indicating that HC-Pro (or the tandem P1/HC-Pro), the strong RNA silencing suppressor of potyviruses, does not interfere with amiRNA-mediated resistance. We did not anticipate this result because it was previously described that tandem expression of TuMV P1 and HC-Pro in *A. thaliana* plants interfered with the endogenous miRNA pathway producing developmental alterations (Kasschau *et al.*, 2003). In any case, this result may explain why the amiR159-HC-Pro is so effective at protecting the *A. thaliana* plants against a potyvirus like TuMV. Although in the initial steps of infection the virus was able to deploy its machinery of RNA silencing suppression, this would not affect the activity of the amiRNA. If this interpretation is correct, it would support, at least in the case of potyviruses, another of the advantages that has been associated to the

technology of the antiviral amiRNAs. In contrast to other host RNA silencing pathways, like that of the small interfering RNAs, host plants are not normally employing the miRNA pathway in antiviral roles, and therefore plant viruses have not evolved counter-measures to avoid the surveillance of the miRNA pathways.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the CSIC grant 2010TW0015 (to J.A.D and S.F.E), the Generalitat Valenciana grant PROMETEO/2010/019 (to S.F.E. and J.A.D.) and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad grants BIO2011-26741 (to J.A.D) and BFU2012-30805 (to S.F.E). F.M. was supported by a pre-doctoral fellowship from the Universidad Politécnica de Valencia.

LITERATURE CITED

Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., Eshed, Y. 2006. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**:1134-1151.

Ambros, V. 2008. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat. Med.* **14**:1036-1040.

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**:281-297.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., Baulcombe, D. C. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**:6739-6746.

Chen, C. C., Chao, C. H., Yeh, S. D., Tsai, H. T., Chang, C. A. 2003. Identification of *Turnip mosaic virus* isolates causing yellow stripe and spot on calla lily. *Plant Dis.* **87**:901-905.

Chen, C. C., Chen, T. C., Raja, J. A., Chang, C. A., Chen, L. W., Lin, S. S., Yeh, S. D. 2007. Effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by *Turnip mosaic virus* vector at five different insertion sites. *Virus Res.* **130**:210-227.

Chen, J., Watanabe, Y., Sako, N., Ohshima, K., Okada, Y. 1996. Complete nucleotide sequence and synthesis of infectious in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of a rakkyo strain of tobacco mosaic virus. *Arch. Virol.* **141**:885-900.

Dinesh-Kumar, S. P., Anandalakshmi, R., Marathe, R., Schiff, M., Liu, Y. 2003. Virus-induced gene silencing. *Meth. Mol. Biol.* **236**:287-294.

Ding, S. W., and Voinnet, O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**:413-426.

Duan, C. G., Wang, C. H., Fang, R. X., Guo, H. S. 2008. Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *J. Virol.* **82**:11084-11095.

Fahim, M., Millar, A. A., Wood, C. C., Larkin, P. J. 2012. Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnol. J.* **10**:150-163.

Freeman, G. H., and Halton, J. H. 1951. Note on an exact treatment of contingency, goodness of fit and other problems of significance. *Biometrika* **38**:141-149.

García, J. A., and Simón-Mateo, C. 2006. A micropunch against plant viruses. *Nat. Biotechnol.* **24**:1358-1359.

González, I., Martínez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P., Canto, T. 2010. Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**:294-303.

González, I., Rakitina, D., Semashko, M., Taliansky, M., Praveen, S., Palukaitis, P., Carr, J. P., Kalinina, N., 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.

Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Humber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., Voinnet, O. 2008. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J.* **27**:2102-2112.

Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., Fang, R. 2012. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* **69**:104-115.

- Jiang, F., Song, Y. Z., Han, Q. J., Zhu, C. X., Wen, F. J.** 2011. The choice of target site is crucial in artificial miRNA-mediated virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **76**:2-8.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., Carrington, J. C.** 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev. Cell* **4**:205-217.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A. S., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M., Le Gall, O.** 2005. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res.* **109**:175-180.
- Kung, Y. J., Lin, S. S., Huang, Y. L., Chen, T. C., Harish, S. S., Chua, N. H., Yeh, S. D.** 2012. Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. *Mol. Plant. Pathol.* **13**:303-317.
- Lafforgue, G., Martínez, F., Sardanyés, J., de la Iglesia, F., Niu, Q. W., Lin, S. S., Solé, R. V., Chua, N. H., Daròs, J. A., Elena, S. F.** 2011. Tempo and mode of plant RNA virus escape from RNA interference-mediated resistance. *J. Virol.* **85**:9686-9695.
- Li, F., and Ding, S. W.** 2006. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**:503-531.
- López-Moya, J. J., Fernández-Fernández, M. R., Cambra, M., García, J. A.** 2000. Biotechnological aspects of plum pox virus. *J. Biotechnol.* **76**:121-136.
- Love, A. J., Laird, J., Holt, J., Hamilton, A. J., Sadanandom, A., Milner, J. J.** 2007. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J. Gen. Virol.* **88**:3439-3444.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., Carrington, J. C.** 2002. Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**:1605-1619.
- Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., 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.
- Martínez, F., Lafforgue, G., Morelli, M. J., González-Candelas, F., Chua, N. H., Daròs, J. A., Elena, S. F.** 2012. Ultradeep sequencing analysis of population dynamics of virus escape mutants in RNAi-mediated resistant plants. *Mol. Biol. Evol.* **29**:3297-3307.

Nicaise, V., Gallois, J. L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O., German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**:1041-1046.

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

Parizotto, E. A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C., Voinnet, O. 2004. In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.* **18**:2237-2242.

Pflieger, S., Blanchet, S., Camborde, L., Drugeon, G., Rousseau, A., Noizet, M., Planchais, S., Jupin, I. 2008. Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. *Plant J.* **56**:678-690.

Qu, J., Ye, J., Fang, R. 2007. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J. Virol.* **81**:6690-6699.

Rizzo, T. M., and Palukaitis, P. 1989. Nucleotide sequence and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 1. *J. Gen. Virol.* **70**:1-11.

Schoelz, J. E., and Shepherd, R. J. 1988. Host range control of cauliflower mosaic-virus. *Virology* **162**:30-37.

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:1121-1133.

Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. 1995. Biometry, 3rd edition. W.H. Freeman & Co., New York, NY. Pp. 730-736.

Voinnet, O. 2009. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**:669-687.

Whitlock, M. C., and Schluter, D. 2009. The Analysis of Biological Data. Roberts & Co., Greenwood Village, CO. Pp. 156-157.

Zeng, Y., Wagner, E. J., Cullen, B. R. 2002. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* **9**:1327-1333.

Zhang, X., Li, H., Zhang, J., Zhang, C., Gong, P., Ziaf, K., Xiao, F., and Ye, Z. 2011. Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Res.* **20**:569-581.

Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., Chua, N. H. 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* **20**:3255-3268.

DISCUSIÓN GENERAL





El trabajo realizado en la presente Tesis persigue avanzar en el conocimiento de las características biológicas de los virus RNA de plantas, así como en los procesos y factores evolutivos que moldean las poblaciones virales. El primer capítulo de la Tesis se centra en el estudio de la dinámica de replicación del genoma de un virus típico de RNA de plantas, el potyvirus TuMV, durante un ciclo de infección celular. Para ello se cuantificó la acumulación de los RNAs + y - virales con el tiempo determinando si la replicación del genoma viral sigue un modelo *stamping machine* o de amplificación geométrica. Como sistema experimental se utilizaron protoplastos de *N. benthamiana* infectados con TuMV. La importancia de conocer el modo de replicación de un virus de RNA se debe a que, junto con su tasa de mutación y los mecanismos de selección, determina la acumulación de mutaciones en la población viral y con ello su variabilidad genética, sobre la que actuarán las fuerzas de cambio evolutivo. En el segundo capítulo de la Tesis se ha analizado como poblaciones del TuMV evolucionan ante la resistencia a la infección impuesta por la expresión transgénica de un amiRNA antiviral por parte de la planta huésped. Como sistema experimental se utilizaron plantas de *A. thaliana* que expresan el amiRNA a través de un transgén. Se observó cómo las poblaciones evolucionadas del virus son capaces de romper la resistencia y consiguen infectar las plantas transgénicas al aparecer alelos mutantes que evaden el mecanismo de silenciamiento mediado por el amiRNA. Se analizó la variabilidad de las poblaciones del TuMV, la dinámica de acumulación de los alelos mutantes que rompen la resistencia y el tipo de mutaciones que se originan durante el proceso evolutivo. Finalmente, en el tercer capítulo de la Tesis se analizó el efecto que tienen las infecciones mixtas sobre la resistencia contra el TuMV mediada por el amiRNA. Se observó cómo algunos virus pertenecientes a distintos grupos taxonómicos ayudan al TuMV a vencer la resistencia.

Caracterización del modo de replicación de un virus de plantas con genoma de ssRNA+.

Puesto que las RNA polimerasas de los virus de RNA no tienen corrección de errores de lectura y presentan una baja fidelidad de copia, para comprender la

frecuencia de mutación que presentan los virus es necesario determinar cómo tiene lugar el crecimiento de la población viral en el huésped. Durante la síntesis del RNA genómico viral las mutaciones producidas se acumularan en la progenie viral dependiendo directamente del modo de replicación empleado por el virus. Para los virus de ssRNA⁺ de plantas se asume que la replicación es asimétrica con una acumulación de cadenas de RNA ⁺ de varios ordenes de magnitud sobre las de polaridad ⁻, según las observaciones en plantas infectadas. Pero ninguno de estos estudios provee datos de la dinámica de acumulación para inferir el mecanismo de replicación (French y Stenger, 2003; Palani y Lin, 2007). Los resultados presentados en el primer capítulo concluyeron que el modo de replicación estimado para el potyvirus TuMV, según el modelo matemático ajustado a los datos de la cinética de acumulación de las cadenas de RNA ⁺ y ⁻ viral durante un ciclo de replicación en una sola célula, es que sigue una estrategia mixta donde ~ 90% de los genomas producidos proviene de una replicación *stamping machine* y ~ 10% son resultantes de una replicación geométrica. Se trata por tanto de un modo de replicación muy conservativo, por acercase prácticamente al modelo *stamping machine*. En una replicación puramente *stamping machine* se usan las cadenas de RNA ⁻ generadas en la primera ronda de replicación, que tendrán un número limitado de mutaciones, reiteradamente para producir la progenie viral teniendo como consecuencia una reducción de la frecuencia de mutación durante un ciclo de infección, y con ello la variabilidad en la población viral (Sardanyés *et al.*, 2009; Thébaud *et al.*, 2010). El modo de replicación cercano al *stamping machine* observado para el TuMV ha sido descrito también para otros virus de RNA como los bacteriófagos Φ6 (dsRNA) y Qβ (ssRNA ⁺) (Chao *et al.*, 2002; García-Villada y Drake, 2012), lo cual sugiere que la selección podría haber operado sobre distintos clases de virus de manera convergente optimizando un mismo mecanismo de replicación, que permite reducir la frecuencia mutación en la progenie viral pese a poseer altas tasas de mutación (Sardanyés *et al.*, 2009; Elena, 2012). Hasta la fecha son los únicos ejemplos disponibles, y este trabajo con el TuMV es del único descrito para virus de plantas que difieren bastante biológicamente de los virus de bacterias. Desde el punto de vista biológico, la replicación geométrica podría ser un mecanismo más rápido que

permitiría colonizar antes la célula huésped que el *stamping machine*. Sin embargo, esto dependerá de la concentración de la RdRp, del tiempo requerido para iniciar la polimerización y de la duración del ciclo de infección. Por ejemplo, si la concentración de RdRp es el factor limitante de la replicación, disponer de más cadenas molde, como es el caso de la replicación geométrica, no incrementará la velocidad de la reacción notablemente. Si el tiempo de replicación es corto la ventaja de una disponibilidad inmediata de cadenas molde podría prevalecer sobre la de la amplificación lineal. Además estudios teóricos sugieren que la replicación geométrica posee otras ventajas como ser un mecanismo con mayor robustez frente a la degradación del RNA viral. Posiblemente los virus han evolucionado optimizando sus estrategias replicativas hacia modelos mixtos como el descrito para el TuMV donde se maximice la robustez genética en la estructura poblacional y además la robustez en dinámica del crecimiento de esta poblacional viral (Sardanyés *et al.*, 2012). Por otro lado, debe considerarse que nuestro estudio describe únicamente la amplificación intracelular del virus. Teniendo en cuenta que los virus de RNA + de plantas deben infectar un organismo que es pluricelular, el crecimiento de la población viral en su conjunto será en cualquier caso geométrico debido a que el número de células aumenta de manera geométrica (varias células pueden verse infectadas a partir de una única célula previamente infectada). Esto puede justificar por qué se observa que la población viral puede alcanzar grandes tamaños en tiempos muy cortos de infección, aunque el mecanismo de la replicación en la célula vegetal sea prácticamente lineal.

Dinámica evolutiva de una población viral capaz de romper la resistencia mediada por un amiRNA.

La mayoría de estrategias de resistencia empleadas contra las infecciones por virus de plantas han sido eventualmente superadas por la aparición de nuevas cepas virales. Para redefinir o aplicar nuevas metodologías de control de las infecciones virales en plantas es necesario comprender los factores evolutivos que modulan la estructura genética de las poblaciones de los virus de plantas. El trabajo previo de nuestro grupo, supuso una primera evaluación de la viabilidad de la resistencia

mediada por la expresión transgénica de amiRNAs antivirales en plantas. Del trabajo se concluye que la durabilidad de esta resistencia antiviral es muy limitada en el tiempo, y que la resistencia con amiRNA antivirales mantiene ciertas limitaciones al igual que otras estrategias transgénicas de resistencia (Lafforgue *et al.*, 2011). Con la finalidad de comprender mejor la emergencia de alelos mutantes capaces de escapar a la resistencia, se llevó a cabo el análisis mediante ultrasecuenciación de la dinámica y diversidad polimórfica de estas poblaciones evolucionadas del TuMV, tanto en plantas silvestres susceptibles a la infección (*A. thaliana* ecotipo Col-0) como en plantas transgénicas parcialmente resistentes al virus (*A. thaliana* línea 10-4). Los resultados mostrados en el segundo capítulo de esta Tesis determinaron que la estructura de las poblaciones virales evolucionadas son muy estables a lo largo de su historia evolutiva ya que la frecuencia de los haplotipos con mutaciones que posiblemente escaparían a la resistencia o “haplotipos rompedores” es muy baja, siendo predominante en la población viral la secuencia ancestral de TuMV a lo largo de todos los pases evolutivos. Lo más interesante quizá es que esta variabilidad ya está presente en la población viral desde el primer pase y las frecuencias de los haplotipos más abundantes fluctúan en la población viral durante el proceso evolutivo. Por lo que el TuMV, pese a poseer una tasa de mutación equivalente a la de otros virus de plantas (de la Iglesia *et al.*, 2012) pero un orden de magnitud inferior a las que habitualmente se describen para virus animales (Sanjuán *et al.* 2010), en este huésped presenta una reducida acumulación de mutaciones. A la escasa variabilidad puede contribuir el hecho de que la replicación del virus sigue prácticamente un modelo *stamping machine*, que reduce la acumulación de mutaciones en la población viral (Sardanyés *et al.*, 2009), como se describe en el primer capítulo de la Tesis. Además, puesto que se observa como en cada pase evolutivo surgen nuevos haplotipos y otros han desaparecido, también se concluye: (1) La selección natural mantiene la población en un equilibrio donde la población es dominada por la secuencia del virus ancestral y eliminando rápidamente las mutaciones producidas, manteniendo la frecuencia de los haplotipos rompedores muy baja en la población viral. (2) A esta escasa variabilidad poblacional observada contribuye el efecto que ocasiona cada cuello de botella que se produce en cada

inoculación de planta a planta en los sucesivos pases evolutivos, donde probablemente se disminuye considerablemente el tamaño efectivo de la población viral y continuamente se eliminan variantes mutantes presentes en el pase anterior y se fijan otras nuevas en la población al azar. Por tanto la evolución de la población del TuMV en las plantas susceptibles transcurre en un equilibrio entre mutación y deriva genética, donde la variante que finalmente rompe la resistencia se encuentra desde el principio de la evolución siendo escogida al azar de entre las presentes. Estos resultados constatan que para el fenómeno de emergencia viral es necesaria una fuente de mutaciones beneficiosas que no sean totalmente eliminadas en los procesos estocásticos, como los cuellos de botella (Elena y Sanjuán, 2005b). Sin embargo en las poblaciones del TuMV evolucionadas en plantas transgénicas parcialmente resistentes la frecuencia de los haplotipos rompedores es más de un orden de magnitud mayor. En estas plantas debido a la presencia del amiRNA estos haplotipos poseen una mayor eficacia biológica dada su capacidad de evadir el amiRNA antiviral y conseguir replicarse con éxito, por lo que son seleccionados frente al virus ancestral. Por tanto, en la evolución del TuMV en las plantas parcialmente resistentes ocurre un balance entre mutación, selección y deriva genética, lo que explica que la rotura en las plantas resistentes ocurra con un número menor de pases evolutivos.

Cuando una población viral se encuentra en un ambiente constante, como sería las plantas silvestres susceptibles, la selección es negativa y purifica alelos deletorios presentes en la población, manteniéndola ésta en una eficacia biológica óptima, la misma que posee el virus ancestral. En el caso de las plantas transgénicas, la selección es positiva y direccional y las frecuencias de los haplotipos mutantes, donde las mutaciones son beneficiosas y contribuyen a aumentar la eficacia biológica, incrementan su frecuencia en la población. Por otro lado, estos resultados muestran como las poblaciones de virus de RNA de plantas en general presentan una escasa variabilidad en su huésped natural en contra de lo esperado por sus enormes tamaños poblacionales y sus altas tasas de mutación (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1991). Esto es ejemplo de la robustez genética que presentan los virus de RNA a

nivel poblacional. La mayoría de la variabilidad, siendo deletérea, parece ser rápidamente eliminada de la población en un ambiente estable; sin embargo si cambia el ambiente puede darse la adaptación mediante la rápida fijación de unas pocas variantes beneficiosas, como se describe en trabajos similares (Wang *et al.*, 2007; Bunnik *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2011).

Otra conclusión del trabajo es que no solo un único haplotipo mutante es el responsable de la rotura de la resistencia. La población viral analizada en las plantas resistentes 12-4, donde tiene lugar la rotura de la resistencia, presenta una variabilidad mayor que la población en los pases anteriores (tanto para poblaciones evolucionadas en plantas Col-0 como de la línea 10-4). Estas poblaciones generalmente contienen varios haplotipos mutantes, y además aparecen haplotipos con dobles mutaciones en la diana del amiRNA que se originan en la propia planta 12-4 después de romperse la resistencia. Analizando la variabilidad de los haplotipos mutantes que surgen durante el proceso evolutivo, se observa que todas las posiciones de la diana del amiRNA son mutadas, pero en la población que rompe la resistencia se acaban fijando ciertos haplotipos rompedores. Como claro ejemplo de convergencia evolutiva a nivel molecular, entre linajes independientes se fijaron de manera recurrente los mismos haplotipos rompedores (Lafforgue *et al.*, 2011). Esto ocurre porque las distintas poblaciones virales se enfrentaron con una misma presión de selección, la presencia del amiRNA en la célula, por lo que aquellos haplotipos capaces de evadir mejor la resistencia antiviral, acabaron fijándose antes en la población viral. Por tanto los haplotipos mutantes que poseen mutadas las posiciones centrales 11 y 12 fueron los más óptimos para escapar de la maquinaria de silenciamiento. Respecto del tipo de mutaciones, se fijaron cambios a nivel de nucleótido de RNA pero no de proteína, porque la proporción de mutaciones sinónimas y no sinónimas fueron equivalentes. Las poblaciones evolucionadas del TuMV presentaron principalmente sustituciones de nucleótido, tanto transiciones como transversiones. Pero al igual que se ha caracterizado para otro potyvirus, el TEV, y en otros virus de RNA, en el espectro de mutaciones son más frecuentes las transiciones (Haydon *et al.*, 1998; Burch *et al.*, 2007; Tromas y Elena, 2010).

Finalmente, del trabajo también se puede concluir que aunque la selección es una fuerza importante en el moldeado evolutivo de los virus, los procesos estocásticos tienen un efecto drástico en los procesos evolutivos y estructura genética de las poblaciones de virus de plantas. En las infecciones con virus de plantas en su entorno natural como campos de cultivo, estos procesos estocásticos probablemente sean mucho más severos, que los que tienen lugar en nuestras condiciones experimentales porque la transmisión principalmente es a través de vectores. Teniendo en cuenta que la probabilidad de transmisión de estos haplotipos rompedores se reduce, la durabilidad de la resistencia de estas plantas transgénicas puede aumentar sustancialmente.

Efecto de las infecciones mixtas sobre la estrategia de resistencia basada en la expresión de un amiRNA antiviral.

Previamente se ha observado en estrategias similares pero basadas en la resistencia por silenciamiento por RNA con transgenes, que mediante infecciones mixtas, el virus consigue evadir la resistencia antiviral. Plantas de *N. benthamiana* que expresan la CP del virus A de la patata (*Potato virus A*, PVA), previamente infectadas con otro potyvirus, el virus Y de la patata (*Potato virus Y*, PVY) resultaron ser susceptibles a PVA. En este caso además la rotura de la resistencia a PVA se demostró que se debía a la supresión del silenciamiento del transgén de la CP (Mitter *et al.*, 2001; Savenkov y Valkonen, 2001). Otro ejemplo del mismo fenómeno se observó en plantas de *N. benthamiana* resistentes a PPV, donde la infección con el cucumovirus CMV, silencia el transgén del PPV rompiendo la resistencia de las plantas. Sin embargo, lo que resultó interesante fue que infecciones con otro potyvirus como el TVMV no tuvieron ningún efecto (Simon-Mateo *et al.*, 2003).

Con el fin de determinar la posible rotura de resistencia de las plantas 12-4 con respecto al TuMV, se decidió llevar a cabo una serie de infecciones mixtas diversificando todo lo posible la interacción TuMV-virus heterólogo. Para ello se recopiló un total de siete especies de virus: cuatro virus de ssRNA+ [TMV, virus del

cascabeo de tabaco (*Tobacco rattle virus*, TRV), virus del mosaico del pepino CMV y TYMV] y un virus de dsDNA [virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)] todos ellos de familias diferentes al TuMV. También dos virus ssRNA+ [virus del mosaico de la lechuga (*Lettuce mosaic virus*, LMV) y PPV] del mismo género (*Potyvirus*) y familia (*Potyviridae*) que el TuMV. Además se analizaron dos maneras distintas de generar la infección mixta, en coinfección o en superinfección con el otro virus. Los resultados fueron muy interesantes no solo por la relevancia para redefinir la estrategia antiviral mediada por amiRNA, sino también por la diversidad de interacciones entre el TuMV y los distintos virus acompañantes durante las infecciones mixtas. En ninguno de los ensayos de coinoculación con estos virus se produjo una rotura de la resistencia porque ninguna planta 12-4 llegó a infectarse con TuMV. Sin embargo, mediante los ensayos de preinoculación para generar superinfecciones, se encontraron varias combinaciones en las que plantas 12-4 preinfectadas con otro virus fueron susceptibles al TuMV en mayor o menor medida. De manera interesante, las plantas resistentes preinfectadas en concreto con TRV, CaMV y CMV resultaron ser susceptibles a TuMV. Un total del 29% de las plantas infectadas con TRV analizadas, un 36% con CaMV y hasta un 94% con CMV resultaron estar infectadas también con TuMV. Por el contrario, la preinfección con TMV, TYMV, PPV y LMV, no tuvo ningún efecto, ya que el 100% de las plantas 12-4 analizadas se mostraron totalmente resistentes a TuMV. Estos resultados son muy significativos puesto que la herramienta biotecnológica para generar resistencia basada en amiRNAs muestra una clara fragilidad para su aplicación en los campos del cultivo con especies de interés agronómico, porque la mayoría de las infecciones virales que suelen ocurrir son mixtas. Por ejemplo TuMV se ha descrito estar acompañado de CaMV en muchas especies de cultivo y en particular en las del género *Brassica* (Hunter *et al.*, 2002; Spence *et al.*, 2007). También se han descrito infecciones mixtas de CMV con potyvirus como el virus del mosaico amarillo del calabacín (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV) y virus del mosaico de la sandía (*Watermelon mosaic virus*, WNV) en cucurbitáceas (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). La interacción que ocurre entre estos virus es crucial para el diseño de estrategias de control eficaces. Estas interacciones entre

virus de plantas generalmente se clasifican como sinérgicas o antagonistas. El término sinergia se utiliza cuando en estas dobles infecciones o infecciones mixtas se intensifican la severidad de los síntomas en la planta huésped y aumenta la replicación de uno o ambos virus, comparando con sus infecciones simples. Se han descrito numerosas combinaciones de potyvirus con virus de otros géneros, en los que se observa el fenómeno de sinergia. PVY, TVMV o TEV junto con el virus X de la patata (*Potato virus X*, PVX) del género *Potexvirus*; SMV con dos *Comovirus*, el virus de la mancha de la vaina de la alubia (*Bean pod mottle virus*, BPMV) y el virus del mosaico del chícharo (*Cowpea mosaic virus*, CPMV); PVY con el virus del enrollado de la hoja de la patata (*Potato leafroll virus*, PFV) del género *Polerovirus* y ZYMV con CMV (Rochow y Ross, 1955; Barker, 1987; Anjos *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2002). En muchos de estos casos la acumulación del otro virus se ve incrementada mientras que no se observa cambios en la del potyvirus. La interacción sinérgica mejor caracterizada es la del PVY y PVX en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Rochow y Ross, 1955; Vance, 1991). Se ha demostrado que no es necesaria la replicación del potyvirus en la planta, pues la sinergia ocurre igualmente en plantas transgénicas que expresan las proteínas P1/HC-Pro. Mutaciones en la proteína supresora potyviral HC-Pro anula el efecto sinérgico, por lo que el incremento de acumulación del PVX se explica por la función supresora del silenciamiento de la HC-Pro del PVY (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997). La proteína supresoras RNase3 del virus del enanismo clorótico del boniato (*Sweetpotato chlorotic stunt virus*, SPCSV) del género *Crinivirus*, también es la responsable de la sinergia con el virus del moteado plumoso del boniato (*Sweetpotato feathery mottle virus*, SPFMV) del género *Potyvirus* (Kreuze *et al.*, 2008; Cuellar *et al.*, 2009). Por tanto, la única explicación que actualmente se conoce para el fenómeno de sinergia se relaciona con la capacidad de los supresores del silenciamiento virales para interferir el silenciamiento génico de la planta y beneficiar la infección del otro virus. La sinergia, sin embargo, ocurre en determinadas combinaciones de virus, por lo que la naturaleza del fenómeno no es del todo comprendida. Además se ha descrito que depende también del tipo huésped en el que se encuentren los virus (González-Jara *et al.*, 2004).

En la interacción antagonica, la replicación de alguno de los virus se ve disminuida por la presencia del otro virus acompañante porque ambos virus son competidores. En nuestros ensayos hemos encontrado interacciones antagonistas muy significativas en plantas silvestres coinoculadas con los virus TYMV y PPV, junto con el TuMV. En el primer caso, la infección del tymovirus desplaza por completo al TuMV. Entre los dos potyvirus ocurre la misma interacción pero es el TuMV quien desplaza al PPV. Una interacción similar ha sido descrita también pero entre el PPV y el TEV en plantas de tabaco (Sáenz *et al.*, 2002). En las coinfecciones de CaMV y TuMV se observó que hasta un 25% de las plantas fueron únicamente infectadas con TuMV, lo que sugiere que TuMV podría ejercer un efecto antagonico sobre CaMV. Más aun, en las plantas transgénicas 12-4 esta misma interferencia debe estar ocurriendo pues la infectividad de CaMV se reduce sorprendentemente a un 20%, aunque TuMV no llegue a infectar las plantas sistémicamente. Una posible interpretación seria que TuMV se replicaría en las hojas inoculadas, evadiendo el amiRNA antiviral gracias a la presencia de CaMV, pero el avance de la infección de TuMV limitaría la replicación de CaMV dando finalmente como resultado un 80% de plantas no infectada sistémicamente por este último virus. Además, esto concuerda con que la preinfección de CaMV permite una rotura de la resistencia en un 36% de los casos. Previamente se ha descrito una relación similar durante coinfecciones entre ambos virus en plantas de *A. thaliana* Col-0 (Martina y Elena, 2009).

La resistencia esta ejercida por la presencia del amiRNA dirigido contra TuMV, que se expresa transgénicamente con un promotor constitutivo y madura a través de las distintas etapas de la ruta endógena de los miRNA de la planta. Todos los virus codifican sus propios supresores del silenciamiento para contrarrestar las defensas antivirales de la planta, y esta descrito en algunos casos que estos supresores también pueden alterar la ruta de los miRNA. La explicación más sencilla para entender esta rotura de la resistencia que hemos observado en infecciones mixtas con TRV, CaMV y CMV es que alteran la maduración, estabilidad o actividad del amiRNA159-HC-Pro. De hecho, durante la infección con los siete virus analizados, la concentración del amiRNA se ve alterada respecto de las plantas no inoculadas. Si

bien las proteínas supresoras del CaMV y CMV, P6 y 2b respectivamente, son fuertes supresores, la proteína 16K supresor del TRV es considerado un supresor débil (Zhang *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Martínez-Priego *et al.*, 2008). De entre ellos, solo se ha descrito que 2b tenga algún efecto sobre la ruta endógena de los miRNA, ya que interacciona con AGO1 inhibiendo la actividad de RISC y además muestra capacidad de unión a miRNAs *in vivo* (Zhang *et al.*, 2006; Hamera *et al.*, 2012). Más aun, la expresión transgénica de las proteínas P1 y HC-Pro en *A. thaliana* interfiere con la ruta endógena de los miRNAs (Kasschau *et al.*, 2003; Dunoyer *et al.*, 2004) y el supresor P69 del TYMV también tiene un fuerte impacto sobre la regulación de los miRNAs (Chen *et al.*, 2004). Sin embargo, ni TYMV, ni los potyvirus PPV y LMV, rompieron la resistencia mediada por el amiRNA. Además no existe una clara correlación entre la cantidad de amiRNA y la resistencia. Por lo tanto, la rotura debe producirse por una interacción bastante compleja entre los virus, en la que parecen ser clave varios elementos. Primero, la infección del virus acompañante debe de estar desplazada en el tiempo respecto de la de TuMV para que sea efectiva la inactividad del amiRNA. Este supuesto lo justifica el hecho que los casos de rotura se haya observado solo en superinfección, nunca en coinfecciones. Segundo, se precisa de una infección mixta entre el TuMV y el virus acompañante en la que ambos virus transiten por las mismas células siendo compatibles los recursos y factor celulares con ambos virus. No debe ocurrir un efecto antagónico o exclusión viral, como ocurre con PPV y TYMV. En el caso de CaMV, seguramente el efecto antagónico no es tan fuerte como para que TuMV desplace totalmente a CaMV, por lo que TuMV queda sustentado en las células por las cuales ha ido pasando CaMV. Es posible que en las infecciones mixtas (PPV-TuMV y LMV-TuMV) exista un fenómeno de exclusión celular por homología entre los potyvirus (Dietrich y Maiss, 2003). Y tercero, el virus acompañante debe interferir con la ruta de los miRNA endógena para que el amiRNA no sea efectivo. En los tres casos de rotura observados, el CMV es el virus que más beneficia a TuMV, probablemente por su capacidad para inactivar AGO1 y evitar que se reconozca la diana del amiRNA159-HC-Pro inhibiendo la infección del TuMV. Sin embargo, CaMV y TRV, que no se conocen que alteren la ruta de los miRNA,

también ayudan aunque en menor medida lo que sugiere que sus supresores probablemente sí interfieren en la ruta de los miRNAs de la planta.



CONCLUSIONES





Las investigaciones desarrolladas en esta Tesis Doctoral han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. El potyvirus TuMV, un típico virus de plantas con genoma de RNA de cadena +, utiliza una estrategia de replicación genómica mixta dominada por una amplificación de tipo *stamping machine*, que contribuye en aproximadamente un 93%, pero que incluye también una contribución de aproximadamente el 7% de amplificación geométrica.

2. La caracterización molecular de la secuencia diana del amiRNA159-HC-Pro antiviral en poblaciones evolucionadas del TuMV ha mostrado que la estructura genética es muy estable a lo largo de su historia evolutiva. La frecuencia de haplotipos rompedores que potencialmente escaparían a la resistencia es muy baja. El análisis de estas frecuencias refleja que los distintos haplotipos fluctúan a lo largo del proceso evolutivo, debido a los severos cuellos de botella que se producen durante los sucesivos pases evolutivos.

3. Las poblaciones virales estudiadas contienen haplotipos con mutaciones en todas las posiciones de los 21 nucleótidos que son diana del amiRNA. Principalmente estas mutaciones encontradas consisten en sustituciones de nucleótido, siendo más frecuentes las transiciones.

4. La población viral que ha sido evolucionada en plantas silvestres de *A. thaliana* Col-0 contiene estos haplotipos rompedores desde el primer pase evolutivo, y los pases siguientes de planta a planta no conllevan un aumento en la frecuencia de los alelos mutantes. El proceso de rotura de la resistencia en la plantas 12-4 parece ser el resultado de una elección al azar de uno o más haplotipos mutantes no reconocidos por el amiRNA, de entre los muchos alelos presentes en la población viral. Por lo tanto aparentemente, esta población viral se encuentra en un equilibrio entre mutación y deriva genética.

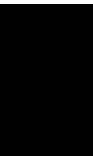
5. Sin embargo en las poblaciones virales evolucionadas en plantas parcialmente resistentes de *A. thaliana* línea 10-4, la frecuencia de los haplotipos rompedores es mucho mayor, lo que explica que la rotura de la resistencia ocurra con un número

menor de pases evolutivos. En este caso, la población viral se encuentra en un equilibrio entre mutación, deriva genética y selección.

6. Las infecciones mixtas pueden ser una causa de rotura de la resistencia antiviral mediada por microRNAs artificiales en plantas. Nuestras investigaciones mostraron que el tobavirus TRV, el caulimovirus CaMV y, especialmente, el cucumovirus CMV ayudan al TuMV a vencer la resistencia conferida por el amiR159-HC-Pro, pero solo cuando se encuentran preinfectando la planta en el momento de la inoculación del TuMV.

7. Sin embargo, otros virus como el tobamovirus TMV, el tymovirus TYMV así como los potyvirus PPV y LMV no tuvieron ningún efecto sobre la rotura de la resistencia mediada por el amiR159-HC-Pro, ni en experimentos de preinoculación ni de coinoculación con el TuMV.

BIBLIOGRAFÍA





Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., Beachy, R. N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic-virus coat protein gene. *Science* **232**: 738-743

Ai, T., Zhang, L., Gao, Z., Zhu, C. X., Guo, X. (2011) Highly efficient virus resistance mediated by artificial microRNAs that target the suppressor of PVX and PVY in plants. *Plant Biology* **13**: 304-316

Ali, A., Li, H., Schneider, W. L., Sherman, D. J., Gray, S., Smith, D., Roossinck, M. J. (2006) Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of Cucumber mosaic virus. *Journal of Virology* **80**: 8345-8350

Alvarez, J. P., Pekker, I., Goldshmidt, A., Blum, E., Amsellem, Z., Eshed, Y. (2006) Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* **18**: 1134-1151

Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., Vance, V. B. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13079-13084

Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., Daszak, P. (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535-544

Angell, S. M. and Baulcombe, D. C. (1997) Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO Journal* **16**: 3675-3684

Anjos, J. R., Jarlfors, U., Ghabrial, S. A. (1992) Soybean mosaic potyvirus enhances the titer of 2 comoviruses in dually infected soybean plants *Phytopathology* **82**: 1022-1027

Aragao, F. J. and Faria, J. C. (2009) First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology* **27**: 1086-1088

Atreya, C. D. and Pirone, T. P. (1993) Mutational analysis of the helper-component proteinase gene of a potyvirus: effects of amino-acid substitutions,

deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 11919-11923

Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., Braun, L., Bergdoll, M., Hakimi, M. A., Lagrange, T., Voinnet, O. (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* **24**: 904-915

Barker H. (1987) Invasion of non-phloem tissue in *Nicotiana clevelandii* by potato leafroll luteovirus is enhanced in plants also infected with potato Y virus. *Journal of General Virology* **68**: 1223-1227

Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297

Bazzini, A. A., Hopp, H. E., Beachy, R. N., Asurmendi, S. (2007) Infection and coaccumulation of tobacco mosaic virus proteins alter microRNA levels, correlating with symptom and plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12157-12162

Belshaw, R., Pybus, O. G., Rambaut, A. (2007) The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Research* **17**: 1496-1504

Belshaw, R., Pybus, O. G., Rambaut, A. (2008) The evolution of gene overlap in RNA viruses. *Infection Genetics and Evolution* **8**: S11-S11

Biebricher, C. K., Eigen, M. (2005) The error threshold. *Virus Research* **107**: 117-127

Blanc, S., Ammar, E.D., García-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T.P. (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology*. **79**, 3119–3122.

Blanc, S., López-Moya, J. J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D. W. and Pirone, T. P. (1997) A specific interaction between coat protein and helper

component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, **231**, 141–147.

Boden, D., Pusch, O., Lee, F., Tucker, L., Ramratnam, B. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *Journal of Virology* **77**: 11531-11535

Bonhoeffer, S. (2008) Evidence for positive epistasis in HIV-1 (vol 306, pg 1547, 2004). *Science* **320**: 746-746

Brosnan, C. A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N. A., Waterhouse, P. M., Carroll, B. J. (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14741-14746

Bucher, E., Lohuis, D., van Poppel, P. M. J. A., Geerts-Dimitriadou, C., Goldbach, R., Prins, M. (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology* **87**: 3697-3701

Bunnik, E. M., Swenson, L. C., Edo-Matas, D., Huang, W., Dong, W., Frantzell, A., Petropoulos, C. J., Coakley, E., Schuitemaker, H., Harrigan, P.R., van't Wout, A. B. (2011) Detection of Inferred CCR5-and CXCR4-Using HIV-1 Variants and Evolutionary Intermediates Using Ultra-Deep Pyrosequencing. *PLoS Pathogens* **7**

Burch, C. L., Guyader, S., Samarov, D., Shen, H. (2007) Experimental estimate of the abundance and effects of nearly neutral mutations in the RNA virus phi 6. *Genetics* **176**: 467-476

Burgyán, J., Havelda, Z. (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* **16**: 265-272

Cann, A. J. (2005) Principles of Molecular Virology, Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA

Carrington, J. C. and Dougherty, W. G. (1987) Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *Journal of Virology* **61**: 2540-2548

Carrington, J. C. and Freed, D. D. (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology* **64**: 1590-1597

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., Schaad, M. C. (1996) Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* **8**: 1669-1681

Codoñer, F. M., Daròs, J. A., Solé, R. V., Elena, S. F. (2006) The fittest versus the flattest: Experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathogens* **2**: 1187-1193

Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T. Y., Wang, A. M., Laliberté, J. F. (2009) Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome. *Journal of Virology* **83**: 10460-10471

Crotty, S., Cameron, C. E., Andino, R. (2001) RNA virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6895-6900

Cuellar, W. J., Kreuze, J. F., Rajamäki, M. L., Cruzado, K. R., Untiveros, M., Valkonen, J. P. T. (2009) Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 10354-10358

Curaba, J. and Chen, X. (2008) Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 3059-3066

Chao, L. (1990) Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**: 454-455

Chao, L., Rang, C. U., Wong, L. E. (2002) Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of the RNA bacteriophage phi6. *Journal of Virology* **76**: 3276-3281

Chen, J., Li, W. X., Xie, D. X., Peng, J. R., Ding, S. W. (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of MicroRNA in host gene expression. *Plant Cell* **16**: 1302-1313

Chung, B. Y. W., Miller, W. A., Atkins, J. F., Firth, A. E. (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 5897-5902

Dalmay, T., Hamilton, A., Rudd, S., Angell, S., Baulcombe, D. C. (2000) An RNA-Dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553

Daròs, J. A., Schaad, M. C., Carrington, J. C. (1999) Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology* **73**: 8732-8740

Das, A. T., Brummelkamp, T. R., Westerhout, E. M., Vink, M., Madiredjo, M., Bernards, R., Berkhout, B. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *Journal of Virology* **78**: 2601-2605

de Haan, P., Gielen, J. J. L., Prins, M., Wijkamp, I. G., van Schepen, A., Peters, D., van Grinsven, M., Goldbach, R. (1992) Characterization of RNA-mediated resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic tobacco plants *Bio-Technology* **10**: 1133-1137

de la Iglesia, F., Martínez, F., Hillung, J., Cuevas, J. M., Gerrish, P. J., Daròs, J. A., Elena, S. F. (2012) Luria-Delbrück Estimation of Turnip Mosaic Virus Mutation Rate In Vivo. *Journal of Virology* **86**: 3386-3388

de Visser, J., Hermisson, J., Wagner, G. P., Meyers, L. A., Bagheri, H. C., Blanchard, J. L., Chao, L., Cheverud, J. M., Elena, S. F., Fontana, W., Gibson, G., Hansen, T. F., Krakauer, D., Lewontin, R. C., Ofria, C., Rice, S. H., von Dassow, G., Wagner, A., Whitlock, M. C. (2003) Perspective: Evolution and detection of genetic robustness. *Evolution* **57**: 1959-1972

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., Voinnet, O. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**: 68-71

den Boon, J. A., Diaz, A., Ahlquist, P. (2010) Cytoplasmic viral replication complexes. *Cell Host & Microbe* **8**: 77-85

Denhardt, D. T. and Silver, R. B. (1966) An analysis of the clone size distribution of phi-X-174 mutants and recombinants. *Virology* **30**: 10-19

Dewanji, A., Luebeck, E. G., Moolgavkar, S. H. (2005) A generalized Luria-Delbruck model. *Mathematical Biosciences* **197**: 140-152

Díaz-Pendón, J. A., Ding, S. W. (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* **46**: 303-326.

Dietrich, C. and Maiss, E. (2003) Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology* **84**: 2871-2876

Ding, S. W., Voinnet, O. (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**: 413-426

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

Domingo-Calap, P.; Pereira-Gómez, M.; Sanjuán, R. (2010) Selection for thermostability can lead to the emergence of mutational robustness in an RNA virus. *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2453-2460

Domingo, E. (2010) Mechanisms of viral emergence. *Veterinary Research* **41**

Domingo, E. and Holland, J. J. (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* **51**: 151-178

Drake, J. W., Bebenek, A., Kissling, G. E., Peddada, S. (2005) Clusters of mutations from transient hypermutability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12849-12854

Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., Crow, J. F. (1998) Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**: 1667-1686

Drake, J. W. and Holland, J. J. (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13910-13913

Duan, C. G., Wang, C. H., Fang, R. X., Guo, H. S. (2008) Artificial microRNAs highly accessible to targets confer efficient virus resistance in plants. *Journal of Virology* **82**: 11084-11095

Dunoyer, P., Himber, C., Voinnet, O. (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* **37**: 1356-1360

Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C., Voinnet, O. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**: 1235-1250

Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., Voinnet, O. (2010) Small RNA Duplexes Function as Mobile Silencing Signals Between Plant Cells. *Science* **328**: 912-916

Edwards, R. A. and Rohwer, F. (2005) Viral metagenomics. *Nature Review Microbiology* **3**: 504-510

Eigen, M. (1996) On the nature of virus quasispecies. *Trends in Microbiology* **4**: 216-218

Eigen, M. (2002) Error catastrophe and antiviral strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13374-13376

Elena, S. F. (2012) RNA virus genetic robustness: possible causes and some consequences. *Current Opinion in Virology* **2**: 525-530

Elena, S. F., Agudelo-Romero, P., Carrasco P., Codoñer, F. M., Martín, S., Torres-Barceló, C., Sanjuán, R. (2008) Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity* **100**: 478-483

Elena, S. F. and Moya, A. (1999) Rate of deleterious mutation and the distribution of its effects on fitness in vesicular stomatitis virus. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 1078-1088

Elena, S. F., Sanjuán, R. (2005a) Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: Separating causes from consequences. *Journal of Virology* **79**: 11555-11558

Elena, S. F., Sanjuán, R. (2005b) RNA viruses as complex adaptive systems. *Biosystems* **81**: 31-41

Eskelin, K., Hafrén, A., Rantalainen, K. I., Mäkinen, K. (2011) Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation *in planta*. *Journal of Virology* **85**: 9210-9221

Fahim, M., Millar, A. A., Wood, C. C., Larkin, P. J. (2012) Resistance to *Wheat streak mosaic virus* generated by expression of an artificial polycistronic microRNA in wheat. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 150-163

Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2005) Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier/Academic Press, London*

Félix, M. A. and Wagner, A. (2008) Robustness and evolution: concepts, insights and challenges from a developmental model system. *Heredity* **100**: 132-140

Folimonova, S. Y. (2012) Superinfection Exclusion Is an Active Virus-Controlled Function That Requires a Specific Viral Protein. *Journal of Virology* **86**: 5554-5561

Forterre, P. (2010) Defining Life: The Virus Viewpoint. *Origins of Life and Evolution of Biosphere* **40**: 151-160

Foster, P. L. (2006) Methods for determining spontaneous mutation rates. In *DNA Repair, Pt B*, Campbell JL, Modrich P (eds), Vol. 409, pp 195-213.

Fraile, A., Eseriu, F., Aranda, M. A., Malpica, J. M., Gibbs, A. J., García-Arenal, F. (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *Journal of Virology* **71**: 8316-8320

French, R. and Stenger, D. C. (2003) Evolution of Wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology*. **41**:199-214

Furió, V., Moya, A., Sanjuán, R. (2005) The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10233-10237

Gago, S., Elena, S. F., Flores, R., Sanjuán, R. (2009) Extremely High Mutation Rate of a Hammerhead Viroid. *Science* **323**: 1308-1308

Gallie, D. R. (2001) Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of Virology* **75**: 12141-12152

Gallie, D. R., Browning, K. S. (2001) eIF4G functionally differs from eIF504G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36951-36960

García-Arenal, F., Fraile, A., Malpica, J. M. (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 157-186

García-Cano, E., Resende, R. O., Fernández-Muñoz, R., Moriones, E. (2006) Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* **96**: 1263-1269

García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Bremel, K. J., 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. *Plant Cell* **22**: 481-496

García-Villada, L. and Drake, J. W. (2012) The Three Faces of Riboviral Spontaneous Mutation: Spectrum, Mode of Genome Replication, and Mutation Rate. *PLoS Genetics* **8**

García, J. A. and Simón-Mateo, C. (2006) A micropunch against plant viruses. *Nature Biotechnology* **24**: 1358-1359

Gibbs, A. and Ohshima, K. (2010) Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 205-223

Giner, A., Lakatos, L., García-Chapa, M., López-Moya, J. J., Burgyán, J. (2010) Viral Protein Inhibits RISC Activity by Argonaute Binding through Conserved WG/GW Motifs. *PLoS Pathogens* **6**

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

Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V., Gafni, Y. (2009) Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein (vol 105, pg 157, 2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 4571-4571

Gómez de Cedrón, M., Osaba, L., López, L., García, J. A. (2006) Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Research* **116**: 136-145

Gómez, P., Sempere, R. N., Aranda, M. A. (2012) Pepino Mosaic Virus and Tomato Torrado Virus: Two Emerging Viruses Affecting Tomato Crops in the Mediterranean Basin. In *Viruses and Virus Diseases of Vegetables in the Mediterranean Basin*, Loebenstein G, Lecoq H (eds), Vol. 84, pp 505-532.

González-Jara, P., Fraile, A., Canto, T., García-Arenal, F. (2013) The Multiplicity of Infection of a Plant Virus Varies during Colonization of Its Eukaryotic Host (vol 83, pg 7487, 2009). *Journal of Virology* **87**: 2374-2374

González-Jara, P., Tenllado, F., Martínez-García, B., Atencio, F. A., Barajas, D., Vargas, M., Diaz-Ruiz, J., Díaz-Ruiz, J. R. (2004) Host-dependent differences during synergistic infection by Potyviruses with potato virus X. *Molecular Plant Pathology* **5**: 29-35

Gorbalenya, A. E., Enjuanes, L., Ziebuhr, J., Snijder, E. J. (2006) Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Research* **117**: 17-37

Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H. Q., Laliberté, J. F. (2012a) Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection. *Journal of Virology* **86**: 9255-9265

Grangeon, R., Jiang, J., Laliberté J. F. (2012b) Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Current Opinion in Virology* **2**: 683-690

Guerini, M. N. and Murphy, J. F. (1999) Resistance of *Capsicum annuum* 'Avelar' to pepper mottle potyvirus and alleviation of this resistance by co-infection with cucumber mosaic cucumovirus are associated with virus movement. *Journal of General Virology* **80**: 2785-2792

Guo, B., Lin, J., Ye, K. (2011) Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 21937-21943

Haas, G., Azevedo, J., Moissiard, G., Geldreich, A., Himber, C., Bureau, M., Fukuhara, T., Keller, M., Voinnet, O. (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J* **27**: 2102-2112

Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X., Fang, R. (2012) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant Journal* **69**: 104-115

Hammond, J., Lecoq, H., Raccach, B. (1999) Epidemiological risks from mixed virus infections and transgenic plants expressing viral genes. *Advances in Virus Research, Vol 54* **54**: 189-314

Haydon, D., Knowles, N., McCauley, J. (1998) Methods for the detection of non-random base substitution in virus genes: Models of synonymous nucleotide substitution in picornavirus genes. *Virus Genes* **16**: 253-266

Holmes, E. C. (2003) Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends in Microbiology* **11**: 543-546

Holmes, E. C. (2009) The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. In *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* Vol. 40, pp 353-372. Palo Alto: Annual Reviews

Holmes, E. C. and Moya, A. (2002) Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *Journal of Virology* **76**: 460-462

Hong, Y. and Hunt, A. G. (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**: 146-151

Huang, T. S., Wei, T., Laliberté, J. F., Wang, A. (2010) A host RNA helicase-like protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection. *Plant Physiology* **152**: 255-266

Hunter, P. J., Jones, J. E., Walsh, J. A. (2002) Involvement of Beet western yellows virus, Cauliflower mosaic virus, and Turnip mosaic virus in internal disorders of stored white cabbage. *Phytopathology* **92**: 816-826

Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A. F. S., Perry, K. L., Moffett, P. (2011) ARGONAUTE2 Mediates RNA-Silencing Antiviral Defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiology* **156**: 1556-1564

Jelly, N. S., Schellenbaum, P., Walter, B., Maillot, P. (2012) Transient expression of artificial microRNAs targeting Grapevine fanleaf virus and evidence for RNA silencing in grapevine somatic embryos. *Transgenic Research* **21**: 1319-1327

Jiang, F., Song, Y. Z., Han, Q. J., Zhu, C. X., Wen, F. J. (2011) The choice of target site is crucial in artificial miRNA-mediated virus resistance in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **76**: 2-8

Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Li, D., Deng, C., Jin, J., Wang, T. (2007) The HC-protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **20**: 1505-1511

Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**: 461-470

Kasschau, K. D. and Carrington, J. C. (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**: 71-81

Kasschau, K. D., Cronin, S., Carrington, J. C. (1997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**: 251-262

Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., Carrington, J. C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* **4**: 205-217

Ketting, R. F., Fischer, S. E. J., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., Plasterk, R. H. A. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C-elegans*. *Genes & Development* **15**: 2654-2659

Kirschner, M. and Gerhart, J. (1998) Evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 8420-8427

Kokkinos, C. D. and Clark, C. A. (2006) Interactions among Sweet potato chlorotic stunt virus and different potyviruses and potyvirus strains infecting sweetpotato in the United States. *Plant Disease* **90**: 1347-1352

Koonin, E. V. and Dolja, V. V. (1993) Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 375-430

Koonin, E. V., Wolf, Y. I., Nagasaki, K., Dolja, V. V. (2008) The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. *Nature Review Microbiology* **6**: 925-939

Krakauer, D. C. and Plotkin, J. B. (2002) Redundancy, antiredundancy, and the robustness of genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1405-1409

Kreuze, J. F., Klein, I. S., Lazaro, M. U., Chuquiyuri, W. J., Morgan, G. L., Mejia, P. G. C., Ghislain, M., Valkonen, J. P. T. (2008) RNA silencing-mediated resistance to a crinivirus (Closteroviridae) in cultivated sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) and development of sweetpotato virus disease following co-infection with a potyvirus. *Molecular Plant Pathology* **9**: 589-598

Kristensen, D. M., Mushegian, A. R., Dolja, V. V., Koonin, E. V. (2010) New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends in Microbiology* **18**: 11-19

Kung, Y. J., Lin, S. S., Huang, Y. L., Chen, T. C., Harish, S. S., Chua, N. H., Yeh, S. D. (2012) Multiple artificial microRNAs targeting conserved motifs of the replicase gene confer robust transgenic resistance to negative-sense single-stranded RNA plant virus. *Molecular Plant Pathology* **13**: 303-317

Lafforgue, G., Martínez, F., Sardanyés, J., de la Iglesia, F., Niu, Q. W., Lin, S. S., Solé, R. V., Chua, N. H., Daròs, J. A., Elena, S. F. (2011) Tempo and Mode of Plant RNA Virus Escape from RNA Interference-Mediated Resistance. *Journal of Virology* **85**: 9686-9695

Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., López-Moya, J. J., Burguán J (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO Journal* **25**: 2768-2780

Laliberté, J. F. and Sanfaçon, H. (2010) Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual Review of Phytopathology* **48**: 69-91

Lalić, J. and Elena, S. F. (2012) Magnitude and sign epistasis among deleterious mutations in a positive-sense plant RNA virus. *Heredity* **109**: 71-77

Li, F. and Ding, S. W. (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual Review of Microbiology* **60**: 503-531

Li, H. Y. and Roossinck, M. J. (2004) Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *Journal of Virology* **78**: 10582-10587

Lin, S. S., Wu, H. W., Elena, S. F., Chen, K. C., Niu, Q. W., Yeh, S. D., Chen, C. C., Chua, N. H. (2009) Molecular Evolution of a Viral Non-Coding Sequence under the Selective Pressure of amiRNA-Mediated Silencing. *PLoS Pathogens* **5**

Lindbo, J. A., Silvarosales, L., Proebsting, W. M., Dougherty, W. G. (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implication for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance *Plant Cell* **5**: 1749-1759

López-Moya, J. J., Wang, R. Y., Pirone, T. P. (1999) Context of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. *Journal of General Virology* **80**: 3281-3288

Lucas, W. J. and Gilbertson, R. L. (1994) Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissue *Annual Review of Phytopathology* **32**: 387-411

Lucas, W. J., Ham, L. K., Kim, J. Y. (2009) Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends in Cell Biology* **19**: 495-503

Luria, S. E. (1951) The frequency distribution of spontaneous bacteriophage mutants as evidence for the exponential rate of phage reproduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **16**: 463-470

Luria, S. E. and Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**: 491-511

Malpica, J. M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C. I., Drake, J. W., García-Arenal, F. (2002) The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* **162**: 1505-1511

Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., 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

Marco, C. F. and Aranda, M. A. (2005) Genetic diversity of a natural population of Cucurbit yellow stunting disorder virus. *Journal of General Virology* **86**: 815-822

Martín, S. and Elena, S. F. (2009) Application of game theory to the interaction between plant viruses during mixed infections. *Journal of General Virology* **90**: 2815-2820

Martínez-Priego, L., Donaire, L., Barajas, D., 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

McDonald, B. A. and Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 349-79

Melnyk, C. W., Molnar, A., Baulcombe, D. C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO Journal* **30**: 3553-3563

Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., Silhavy, D. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* **80**: 5747-5756

Minskaia, E., Hertzog, T., Gorbalenya, A. E., Campanacci, V., Cambillau, C., Canard, B., Ziebuhr, J. (2006) Discovery of an RNA virus 3' \rightarrow 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5108-5113

Miralles, R., Ferrer, R., Solé, R. V., Moya, A., Elena, S. F. (2001) Multiple infection dynamics has pronounced effects on the fitness of RNA viruses. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 654-662

Mitter, N., Sulistyowati, E., Graham, M. W., Dietzgen, R. G. (2001) Suppression of gene silencing: a threat to virus-resistant transgenic plants?. *Trends in Plant Science* **6**: 246-247

Molnar, A., Melnyk, C., Baulcombe, D. C. (2011) Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs. *Genome Biology* **12**

Morel, J. B., Godon, C., Mourrain, P., Beclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., Vaucheret, H. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**: 629-639

Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T. A., Vaucheret, H. (2000) Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542

Nejidat, A. and Beachy, R. N. (1990) Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**: 247-251

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

Novella, I. S., Quer, J., Domingo, E., Holland, J. J. (1999) Exponential fitness gains of RNA virus populations are limited by bottleneck effects. *Journal of Virology* **73**: 1668-1671

Opalka, N., Brugidou, C., Bonneau, C., Nicole, M., Beachy, R. N., Yeager, M., Fauquet, C. (1998) Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3323-3328

Palani, P. V. and Lin, N. S. (2007) Northern analysis of viral plus- and minus-strand RNAs. *Current protocols in microbiology* **Chapter 16**: Unit 16E.13-Unit 16E.13

Parizotto, E. A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C., Voinnet, O. (2004) In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes & Development* **18**: 2237-2242

Pathak, V. K. and Temin, H. M. (1992) 5-Azacytidine and RNA secondary structure increase the retrovirus mutation rate. *Journal of Virology* **66**: 3093-3100

Pita, J. S., de Miranda, J. R., Schneider, W. L., Roossinck, M. J. (2007) Environment determines fidelity for an RNA virus replicase. *Journal of Virology* **81**: 9072-9077

Prins, M., Dehaan, P., Luyten, R., van Veller, M., van Grinsven, M., Goldbach, R. (1995) Broad resistance to tospoviruses in transgenic tobacco plants expressing 3 tospoviral nucleoprotein gene-sequences *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 85-91

Pruss, G., Ge, X., Shi, X. M., Carrington, J. C., Vance, V. B. (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**: 859-868

Puustinen, P. and Mäkinen, K. (2004) Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 38103-38110

Qu, F., Ye, X., Morris, T. J. (2008) Arabidopsis DRB4, AG01, AG07, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14732-14737

Qu, J., Ye, J., Fang, R. (2007) Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *Journal of Virology* **81**: 6690-6699

Rao, A. L. N., Cooper, B., Deom, C. M. (1998) Defective movement of viruses in the family Bromoviridae is differentially complemented in *Nicotiana benthamiana* expressing tobamovirus or dianthovirus movement proteins. *Phytopathology* **88**: 666-672

Rochow, W. F. and Ross, A. F. (1955) Virus multiplication in plants doubly infected by potato virus X and virus Y. *Virology* **1**: 10-27

Rodríguez-Cerezo, E., Elena, S. F., Moya, A., García-Arenal, F. (1991) High genetic stability in natural populations of the plant RNA virus tobacco mild green mosaic virus. *Journal of Molecular Evolution* **32**: 328-332

Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., Lucas, W. J. (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**: 283-295

Roossinck, M. J. (2008) Mutant clouds and bottleneck events in plant virus evolution. *Origin and Evolution of Viruses* 2nd edition (Domingo, E., Parrish C.R and J.J. Holland, eds.), pp. 254, Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Roth, B. M., Pruss, G. J., Vance, V. B. (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* **102**: 97-108

Ryang, B. S., Kobori, T., Matsumoto, T., Kosaka, Y., Ohki, S. T. (2004) Cucumber mosaic virus 2b protein compensates for restricted systemic spread of Potato virus Y in doubly infected tobacco. *Journal of General Virology* **85**: 3405-3414

Sáenz, P., Salvador, B., Simón-Mateo, C., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., García, J. A. (2002) Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *Journal of Virology* **76**: 1922-1931

Sahana, N., Kaur, H., Basavaraj, Tena, F., Jain, R. K., Palukaitis, P., Canto, T., Praveen, S. (2012) Inhibition of the Host Proteasome Facilitates Papaya Ringspot Virus Accumulation and Proteosomal Catalytic Activity Is Modulated by Viral Factor HcPro. *PLoS One* **7**

Sanjuán, R., Agudelo-Romero, P., Elena, S. F. (2009) Upper-limit mutation rate estimation for a plant RNA virus. *Biology Letters* **5**: 394-396

Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Furió, V., Holmes, E. C., Moya, A. (2007) Selection for robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genetics* **3**: 939-946

Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Moya, A., Elena, S. F. (2005) Epistasis and the adaptability of an RNA virus. *Genetics* **170**: 1001-1008

Sanjuán, R., Moya, A., Elena, S. F. (2004a) The contribution of epistasis to the architecture of fitness in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15376-15379

Sanjuán, R., Moya, A., Elena, S. F. (2004b) The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8396-8401

Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., Belshaw, R. (2010) Viral mutation rates. *Journal of Virology* **84**: 9733-9748

Sardanyés, J., Martínez, F., Daròs, J. A., Elena, S. F. (2012) Dynamics of alternative modes of RNA replication for positive-sense RNA viruses. *Journal of the Royal Society Interface* **9**: 768-776

Sardanyés, J., Solé, R. V., Elena, S. F. (2009) Replication Mode and Landscape Topology Differentially Affect RNA Virus Mutational Load and Robustness. *Journal of Virology* **83**: 12579-12589

Savenkov, E. I. and Valkonen, J. P. T. (2001) Coat protein gene-mediated resistance to Potato virus A in transgenic plants is suppressed following infection with another potyvirus. *Journal of General Virology* **82**: 2275-2278

Schaad, M. C., Jensen, P. E., Carrington, J. C. (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO Journal* **16**: 4049-4059

Schuster, P. and Swetina, J. (1988) Stationary mutant distribution and evolutionary optimization *Bulletin of Mathematical Biology* **50**: 635-660

Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., Weigel, D. (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1121-1133

Schwach, F., Adam, G., Heinze, C. (2004) Expression of a modified nucleocapsid-protein of Tomato spotted wilt virus (TSWV) confers resistance against TSWV and Groundnut ringspot virus (GRSV) by blocking systemic spread. *Molecular Plant Pathology* **5**: 309-316

Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., Baulcombe, D. C. (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* **138**: 1842-1852

Schwind, N., Zwiebel, M., Itaya, A., Ding, B., Wang, M. B., Krczal, G., Wassenegger, M. (2009) RNAi-mediated resistance to Potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Molecular Plant Pathology* **10**: 459-469

Shi, X. M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J. C., Vance, V. B. (1997) Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* **231**: 35-42

Shimura, H. and Pantaleo, V. (2011) Viral induction and suppression of RNA silencing in plants. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **1809**: 601-612

Shukla, D. D., Ward, C. W., Bunt, A. A. (1994) The Potyviridae. C. A. B. International Wallingford, UK.

Simon-Loriere, E. and Holmes, E. C. (2011) Why do RNA viruses recombine? *Nature Review Microbiology* **9**: 617-626

Simón-Mateo, C. and García, J. A. (2006) MicroRNA-Guided processing impairs Plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology* **80**: 2429-2436

Simón-Mateo, C. and García, J. A. (2011) Antiviral strategies in plants based on RNA silencing. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* **1809**: 722-731

Simón-Mateo, C., López-Moya, J. J., Guo, H. S., González, E., García, J. A. (2003) Suppressor activity of potyviral and cucumoviral infections in potyvirus-induced transgene silencing. *Journal of General Virology* **84**: 2877-2883

Smith, N. A., Singh, S. P., Wang, M. B., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G., Waterhouse, P. M. (2000) Gene expression - Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320

Spence, N. J., Phiri, N. A., Hughes, S. L., Mwaniki, A., Simons, S., Oduor, G., Chacha, D., Kuria, A., Ndirangu, S., Kibata, G. N., Marris, G. C. (2007) Economic impact of Turnip mosaic virus, Cauliflower mosaic virus and Beet mosaic virus in three Kenyan vegetables. *Plant Pathology* **56**: 317-323

Summers, J. and Litwin, S. (2006) Examining the theory of error catastrophe. *Journal of Virology* **80**: 20-26

Syller, J. (2003) Molecular and biological features of umbraviruses, the unusual plant viruses lacking genetic information for a capsid protein. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 35-46

Takahashi, T., Sugawara, T., Yamatsuta, T., Isogai, M., Natsuaki, T., Yoshikawa, N. (2007) Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. *Phytopathology* **97**: 1200-1206

Tenllado, F., Llave, C., Díaz-Ruiz J. R. (2004) RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research* **102**: 85-96

Thébaud, G., Chadoeuf, J., Morelli, M. J., McCauley, J. W., Haydon, D. T. (2010) The relationship between mutation frequency and replication strategy in positive-sense single-stranded RNA viruses. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**: 809-817

Tomari, Y., Zamore, P. D. (2005) Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development* **19**: 517-529

Torres-Barceló, C., Daròs, J. A., Elena, S. F. (2010) HC-Pro hypo- and hypersuppressor mutants: differences in viral siRNA accumulation in vivo and siRNA binding activity in vitro. *Archives of Virology*. **155**:251-4

Tromas, N. (2013) Thesis. Evaluating fundamental life-history traits for TEV virus. Universitat de València.

Tromas, N. and Elena, S. F. (2010) The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus. *Genetics* **185**: 983-989

Ueki, S. and Citovsky, V. (2011) To Gate, or Not to Gate: Regulatory Mechanisms for Intercellular Protein Transport and Virus Movement in Plants. *Molecular Plant* **4**: 782-793

Untiveros, M., Fuentes, S., Salazar, L. F. (2007) Synergistic interaction of Sweet potato chlorotic stunt virus (Crinivirus) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Disease* **91**: 669-676

Urququi-Inchima, S., Haenni, A. L., Bernardi, F. (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* **74**: 157-175

Vance, V. B. (1991) Replication of potato virus X RNA is altered in coinfections with potato virus Y. *Virology* **182**: 486-494

Vance, V. B., Berger, P. H., Carrington, J. C., Hunt, A. G., Shi, X. M. (1995) 5' Proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**: 583-590

Várallyay, E., Válóczy, A., Agyi, A., Burgyán, J., Havelda, Z. (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO Journal* **29**: 3507-3519

Vazquez-Rovere, C., del Vas, M., Hopp, H. E. (2002) RNA-mediated virus resistance. *Current opinion in biotechnology* **13**: 167-172

Verchot, J., Driskel, B. A., Zhu, Y., Hunger, R. M., Littlefield, L. J. (2001) Evidence that soilborne wheat mosaic virus moves long distance through the xylem in wheat. *Protoplasts* **218**: 57-66

Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., Miller, W. A. (2012) Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathogens* **8**

Voinnet, O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* **17**: 449-459

Voinnet, O. (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Letters* **579**: 5858-5871

Voinnet, O. (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* **13**: 317-328

Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**: 669-687

Voinnet, O. and Baulcombe, D. C. (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**: 553-553

Wagner, G. P. and Altenberg, L. (1996) Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* **50**: 967-976

Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., Shafer, R. W. (2007) Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Research* **17**: 1195-1201

Wang, Y., Lee, K. C., Gaba, V., Wong, S. M., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2004) Breakage of resistance to Cucumber mosaic virus by co-infection with Zucchini yellow mosaic virus: enhancement of CMV accumulation independent of symptom expression. *Archives of Virology* **149**: 379-396

Wang, Y. Z., Gaba, V., Yang, J., Palukaitis, P., Gal-On, A. (2002) Characterization of synergy between Cucumber mosaic virus and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* **92**: 51-58

Waterhouse, P. M., Graham, H. W., Wang, M. B. (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13959-13964

Wei, T., Huang, T. S., McNeil, J., Laliberté, J. F., Hong, J., Nelson, R. S., Wang, A. (2010a) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology* **84**: 799-809

Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C., Wang, A. (2010b) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathogens* **6**

Westerhout, E. M. and Berkhout, B. (2007) A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference. *Nucleic Acids Research* **35**: 4322-4330

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

Wilke, C. O. and Adami, C. (2003) Evolution of mutational robustness. *Mutation Research-Fundamental Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **522**: 3-11

Wilke, C. O., Reissig, D. D., Novella, I. S. (2004) Replication at periodically changing multiplicity of infection promotes stable coexistence of competing viral populations. *Evolution* **58**: 900-905

Wilke, C. O. and Ronnewinkel, C. (2001) Dynamic fitness landscapes: expansions for small mutation rates. *Physica A* **290**: 475-490

Wilke, C. O., Wang, J. L., Ofria, C., Lenski, R. E., Adami, C. (2001) Evolution of digital organisms at high mutation rates leads to survival of the flattest. *Nature* **412**: 331-333

Wintermantel, W. M., Cortez, A. A., Anchieta, A. G., Gulati-Sakhuja, A., Hladky, L. L. (2008) Co-Infection by Two Criniviruses Alters Accumulation of

Each Virus in a Host-Specific Manner and Influences Efficiency of Virus Transmission. *Phytopathology* **98**: 1340-1345

Wright, C. F., Morelli, M. J., Thébaud, G., Knowles, N. J., Herzyk, P., Paton, D. J., Haydon, D. T., King, D. P. (2011) Beyond the Consensus: Dissecting Within-Host Viral Population Diversity of Foot-and-Mouth Disease Virus by Using Next-Generation Genome Sequencing. *Journal of Virology* **85**: 2266-2275

Wu-Scharf, D., Jeong, B. R., Zhang, C. M., Cerutti, H. (2000) Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-Box RNA helicase. *Science* **290**: 1159-1162

Wu, Q., Wang, X., Ding, S. W. (2010) Viral Suppressors of RNA-Based Viral Immunity: Host Targets. *Cell Host & Microbe* **8**: 12-15

Yoo, S. D., Cho, Y. H., Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* **2**: 1565-1572

Yuste, E., López-Galíndez, C., Domingo, E. (2000) Unusual distribution of mutations associated with serial bottleneck passages of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **74**: 9546-9552

Zaitlin, M. and Palukaitis, P. (2000) Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 117-143

Zeenko, V. and Gallie, D. R. (2005) Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 26813-26824

Zeng, Y., Wagner, E. J., Cullen, B. R. (2002) Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell* **9**: 1327-1333

Zhang, X., Li, H., Zhang, J., Zhang, C., Gong, P., Ziaf, K., Xiao, F., Ye, Z. (2011) Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Research* **20**: 569-581

Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J., Chua, N. H. (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* **20**: 3255-3268

Ziebell, H., Carr, J. P. (2010) Cross-Protection: A Century of Mystery. In *Natural and Engineered Resistance to Plant Viruses, Pt II*, Carr JP, Loebenstein G (eds), Vol. 76, pp 211-264.

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

