



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

FUNCIÓN DEL FACTOR DE INICIO DE LA
TRADUCCIÓN eIF(iso)4E EN EL MOVIMIENTO DEL
VIRUS DEL JASPEADO DEL TABACO (TEV)

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**CARLOS ALBERTO
CONTRERAS PAREDES**

Tutor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

MARZO/2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova en el laboratorio 103 del departamento de Bioquímica de plantas en el conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, con financiamiento de los proyectos: CONACYT 46339 y 81708; PAPIIT 204309 y 210912, de la beca 176906 para estudios doctorales otorgada por CONACYT y como becario de proyecto CONACYT 81708.

La co-tutoría de este trabajo estuvo a cargo de: la Dra. Laura Silva Rosales del departamento de Ingeniería Genética del Cinvestav-Irapuato, Guanajuato y la Dra. Susana López Charreton del departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular de Instituto de Biotecnología de la UNAM.

El plásmido p35TEV con el aislamiento US_TEV-7DA_ DQ986288 (TEV-7DA) fue amablemente proporcionado por el Dr. José-Antonio Daròs Arnau del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia, España.

RESUMEN

El éxito que tienen los virus para colonizar a su hospedero se debe a las interacciones entre proteínas virales y de la planta. Entre estas se ha encontrado que la familia de factores de inicio de la traducción eIF4E juega un papel importante durante la infección por miembros de la familia *Potyviridae*. En *Arabidopsis thaliana* la presencia de eIF(iso)4E es necesaria para la susceptibilidad a los virus del mosaico de la lechuga (LMV), del mosaico del nabo (TuMV) y del jaspeado de tabaco (TEV). Adicionalmente, se ha encontrado que en el ecotipo Col-0 de *A. thaliana* la diseminación sistémica de los virus TEV, LMV y el virus de la enfermedad del ciruelo (PPV) es restringida por un mecanismo llamado RTM (por sus siglas en inglés Restriction of TEV Movement).

En este trabajo se describe un aislamiento mexicano de TEV (TEV-TAMPS) capaz de sobrepasar el mecanismo de resistencia RTM de *A. thaliana* Col-0, permitiendo su diseminación sistémica solo en presencia de eIF(iso)4E. Para poder explicar la función de eIF(iso)4E durante la infección por TEV-TAMPS, se cuantificaron los niveles de RNA viral acumulado en hojas locales y sistémicas, la síntesis de RNA viral antisentido como intermediario de la replicación y los niveles de RNA viral en fracciones polisomales como una aproximación a la traducción del genoma viral en plantas silvestres y mutantes de eIF(iso)4E. Los datos experimentales indican que la ausencia o sobreexpresión de eIF(iso)4E no afectan la traducción y replicación de TEV-TAMPS; sin embargo, la diseminación sistémica fue abatida en plantas mutantes nulas de eIF(iso)4E. Finalmente, en experimentos de co-inmunoprecipitación se encontró a la proteína unida al genoma viral (VPg) asociada con eIF4E y eIF(iso)4E, mientras que la proteína de cápside (CP) solo estaba en complejo con eIF(iso)4E. CP y VPg son necesarias para la diseminación de TEV, por lo que se propone que la interacción de eIF(iso)4E con dichas proteínas podría facilitar el movimiento sistémico de TEV-TAMPS en *A. thaliana* ecotipo Col-0.

ABSTRACT

The successful host colonization by virus is due to interactions between viral proteins and plant factors. Among the latter, the family of translation initiation factors eIF4E plays an important role during viral infection by the *Potyviridae* family members. In *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E is required for susceptibility to *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV) and *tobacco etch virus* (TEV). Moreover it has been found that in *A. thaliana* wild type Col-0 ecotype there is a system to control the systemic spread of TEV, LMV and *Plum Pox virus* (PPV), named RTM by Restriction of TEV Movement.

In this work we describe a mexican TEV isolate (TEV-TAMPS) able to overcome the RTM mechanism in *A. thaliana* Col-0 ecotype, allowing the systemic spread of the virus only in the presence of eIF(iso)4E factor. To explain eIF(iso)4E function during TEV-TAMPS infection, the levels of viral RNA were quantified in local and systemic leaves, as well as an antisense viral RNA as an intermediate of viral replication, and the sense RNA levels in polysomal fractions as translation activity approximation in wild type and eIF(iso)4E mutant plants. The experimental data indicate that neither the absence or the overexpression of eIF(iso)4E affect the viral translation and replication, yet the systemic spread of TEV-TAMPS is dejected in eIF(iso)4E null mutant plants. Finally in co-immunoprecipitation experiments the *viral genome linked protein* (VPg) was found to associate with both eIF4E and eIF(iso)4E factors, whereas the capsid protein (CP) was found to make a complex only with eIF(iso)4E. Since both, CP and VPg are needed for TEV systemic spread, it is proposed that the interaction of eIF(iso)4E with these proteins facilitates the systemic movement of TEV-TAMPS in *A. thaliana* ecotype Col-0.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS.....	vi
Función del factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E en el movimiento del <i>Virus del Jaspeado del Tabaco</i> (TEV).....	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Mecanismos de propagación viral en plantas.	4
2.1.1 Movimiento viral de célula a célula.	5
2.1.2 Movimiento viral sistémico.	12
2.2 Mecanismos de resistencia contra virus en plantas.....	14
2.2.1 Mecanismos de resistencia no asociada al hospedero.....	15
2.2.2 Mecanismos de resistencia asociada al hospedero.	16
2.3 El género <i>Potyvirus</i>	17
2.3.1 Resistencia dominante a <i>Potyvirus</i>	18
2.3.2 Resistencia recesiva a <i>Potyvirus</i>	19
2.4 Mecanismo del inicio de la traducción en eucariontes.	20
2.5 Papel de los factores de inicio de la traducción eIF4E en la infección por <i>Potyvirus</i>	20
2.6 Antecedentes directos.....	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
5. OBJETIVOS PARTICULARES	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Material biológico.....	25
6.2 Obtención de viriones.	25
6.3 Inoculación viral	26
6.4 Extracción de RNA total de <i>A. thaliana</i>	26
6.5 Obtención de RNA polisomal a partir de hojas de <i>A. thaliana</i>	26
6.6 Amplificación de RNA mediante ensayos de RT-PCR y RT seguido de qPCR.	28
6.7 Obtención y análisis de la secuencia del aislamiento mexicano TEV-TAMPS.....	29
6.8 Extracción de proteína total y análisis mediante ensayos de western blot y ELISA.	30
6.9 Ensayos de co-inmunoprecipitación.....	32

7. RESULTADOS	33
7.1 Un aislamiento mexicano de <i>virus del jaspeado del tabaco</i> (TEV-TAMPS) evita la respuesta de resistencia RTM en <i>A. thaliana</i> ecotipo Col-0, pero requiere de eIF(iso)4E para su diseminación sistémica.	33
7.2 Análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas VPg y CP de TEV-TAMPS.	34
7.3 eIF(iso)4E no es requerido para la acumulación de TEV-TAMPS en <i>A. thaliana</i> Col-0.	38
7.4 Evaluación de la eficiencia de traducción del RNA de TEV-TAMPS en ausencia de eIF(iso)4E en <i>A. thaliana</i>	43
7.5 VPg y CP de TEV-TAMPS se asocian en complejos con eIF(iso)4E <i>in planta</i>	47
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. LITERATURA CITADA	56
Anexo 1	68

ABREVIATURAS

Cap: Estructura presente en el extremo 5' de un mRNA eucarionte (7mGpppN, donde N es cualquier nucleótido)

BASTA: Glufosinato de amonio

BCIP: sal de p-toluidina 5-Bromo-4-chloro-3'-indoliphosfato

BCMNV: *Bean Common Mosaic Necrotic Virus* (virus del mosaico común necrótico del frijol)

BCMV: *Bean Common Mosaic Virus* (Virus del mosaico común del frijol)

BDMV: *Bean Dwarf Mosaic Virus* (virus del mosaico enano del frijol)

BSMV: *Barley Stripe Mosaic Virus* (Virus del mosaico rayado de la cebada)

CCMV: *Cowpea Chlorotic Mottle Virus* (Virus del moteado clorótico del caupí)

cDNA: *complementary desoxirribonucleic Acid* (Ácido desoxiribonucleico complementario)

CIYVV: *Clover Yellow Vein Virus* (Virus del amarilleo de las venas del trébol)

CI: Proteína de la inclusión cilíndrica

CMV: *Cucumber Mosaic Virus* (Virus del mosaico del pepino)

CP: *Capsid protein* (Proteína de cápside)

DEPC: Dietil-piromcarbonato

DNA: *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido desoxiribonucleico)

dpi: días post-inoculación

eEF1: Factor eucariótico de elongación de la traducción 1

eEF1 α : Subunidad alfa del eEF1

eIF(iso)4E: Isoforma del factor de inicio de la traducción 4E

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)

EMS: Metanosulfonato de etilo

GFP: *Green fluorescent protein* (Proteína verde fluorescente)

GRV: *Groundnut Rosette Virus* (Virus de la roseta del cacahuate)

GUS: β -glucuronidasa

HC-Pro: Componente auxiliar de la proteasa viral

HR: *Hypersensitive response* (Respuesta hipersensible)

IP: Inmunoprecipitación

LFY: Proteína LEAFY

LMV: *Lettuce Mosaic Virus* (Virus del mosaico de la lechuga)

MATH: *Meprin and TRAF homology* (proteína con dominio de meprina y homólogo a TRAF)

MP: *Movement protein* (Proteína de movimiento)

NBT: Nitroazul de tetrazolio

nCBP: Proteína novedosa de unión a *cap*

Nla: *Nuclear Inclusion Protein A* (Proteína de inclusión nuclear A)

Nib: *Nuclear Inclusion Protein B* (Proteína de inclusión nuclear B)

nm: Nanómetros

ORF: *Open Reading Frame* (Marco de lectura abierto)

PABP: *Poly(A)⁺ Binding Protein* (proteína que se une a la cola de Poli(A)⁺)

pb: Pares de bases

PBS: Solución salina de fosfatos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDCB: Familia de proteínas de unión a calosa

PDLP1-8: Proteínas parecidas a receptores

PEG: Polietilén glicol

PIPO: Pretty Interesting *Potyviridae* ORF (ORF de *Potyviridae* bastante interesante)

PLRV: *Potato Leafrolling Mosaic Virus* (*Virus del enrollamiento de la hoja de la papa*)

PPV: *Plum Pox Virus* (virus de la enfermedad del ciruelo)

PTE: Polioxietileno 10 tridecil éter

PVX: *Potato X Virus* (*Virus X de la papa*)

PVY: *Potato Y Virus* (*Virus Y de la papa*)

qPCR: Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa

RCNMV: *Red Clover Necrotic Mosaic Virus* (*Virus del mosaico necrótico del trébol rojo*)

RGP2: Polipeptido de glicosilación reversible asociado al aparato de Golgi y plasmodesmo

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RT: Reacción de reverso transcripción

RTM: *Restriction of Tobacco Etch Virus Movement* (Restricción del movimiento sistémico del *Virus del jaspeado del tabaco*)

SAR: *Systemic acquired resistance* (Resistencia sistémica adquirida)

SLCV: *Squash Leaf Curl Virus* (*Virus del enrollamiento la hoja del calabacín*)

Spec: Espectinomicina

TBRV: *Tomato Black Ring Virus* (*Virus del anillo negro de jitomate*)

TCV: *Turnip crinkle virus* (*Virus del marchitamiento del nabo*)

TEV: *Tobacco Etch Virus* (*Virus del jaspeado del tabaco*)

TGB: Bloque triple de genes

TMV: *Tobacco Mosaic virus* (*Virus del mosaico del tabaco*)

TuMV: *Turnip Mosaic Virus* (*Virus del mosaico del nabo*)

TRAF: *Tumor necrosis factor receptor associated factor* (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral)

UTR: región no traducible

VPg: *Viral genome linked protein* (Proteína unida al genoma viral)

WCIMV: *White Clover Mosaic Virus* (*Virus del mosaico del trébol blanco*)

Función del factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E en el movimiento del *Virus del Jaspeado del Tabaco (TEV)*.

1. INTRODUCCIÓN

El éxito que tienen los virus de plantas para colonizar a un hospedero se debe a las interacciones que se llevan a cabo entre proteínas del hospedero y proteínas provenientes del virus desde el establecimiento de la infección hasta su diseminación sistémica por toda la planta (Ventelon-Debout, Delalande et al. 2004, Serva y Nagy 2006, Roudet-Tavert, Michon et al. 2007).

La dispersión sistémica viral puede ocurrir en diferentes estadios de la infección (Talianky, Torrance et al. 2008), por lo que las estrategias de movimiento viral involucran el tránsito a través de muchos tipos celulares y tejidos (Carrington, Kasschau et al. 1996). Se ha sugerido que este proceso es mediado por proteínas virales específicas denominadas proteínas del movimiento (MPs). Dichas proteínas interactúan con el genoma viral o partículas virales ensambladas para facilitar el movimiento viral (Carrington y Whitham 1998). Inicialmente, los virus en forma de viriones o como complejos de proteínas y ácidos nucleicos son movidos desde los sitios de infección temprana hacia los plasmodesmos (canales que atraviesan la pared celular y permiten la comunicación simplástica entre células adyacentes). De éste modo, el virus llega a las células del floema y puede ser transportado a otros tejidos. Rutas similares son empleadas por las plantas hospederas para llevar a cabo el tráfico intercelular de macromoléculas, lo que ha sugerido que los virus como oportunistas, utilizan los sistemas de transporte del hospedero para su movimiento y posterior dispersión en la planta (Heinlein 2002, Hofmann, Sambade et al. 2007, Talianky, Torrance et al. 2008, Harries y Ding 2011, Niehl y Heinlein 2011).

Un gran número de investigaciones han identificado diversos genes involucrados en la resistencia contra virus de RNA. Algunos actúan de manera dominante mediante la inducción de una barrera basal para uno o más estadios de la infección viral. Ejemplo de estos genes son las proteínas RTM (por restricción del movimiento sistémico de TEV) encontrados en *A. thaliana* silvestre ecotipo Col-0. De éstas proteínas se han identificado tres conocidas como RTM1 (una cadena α de una jacalina, involucrada en el plegamiento de proteínas), RTM2 (ésta posee

un dominio amino terminal parecido a una proteína de choque térmico) y RTM3 (pertenece a una familia no descrita de 29 miembros caracterizada por un N-terminal con dominio de meprina y homólogo a TRAF y en la parte C-terminal un dominio Coiled-coil). Aunque no se conoce el mecanismo, éstas proteínas limitan el movimiento sistémico de TEV restringiéndolo solo a la hoja infectada (Mahajan, Chisholm et al. 1998, Chisholm, Mahajan et al. 2000, Whitham, Anderberg et al. 2000, Chisholm, Parra et al. 2001, Cosson, Sofer et al. 2010).

Otro tipo de resistencia es la de tipo recesiva la cual es generada por mutaciones puntuales o polimorfismos en proteínas de la planta hospedera repercutiendo en la pérdida de interacción con elementos virales, ejemplo de esto es la resistencia mediada por factores del inicio de la traducción miembros de la familia eIF4E (Robaglia y Caranta 2006, Nicaise, Gallois et al. 2007, Hwang, Li et al. 2009, Carr, Lewsey et al. 2010, Piron, Nicolai et al. 2010, Ashby, Stevenson et al. 2011).

Los miembros de la familia eIF4E se caracterizan por su capacidad de interaccionar con el *cap* de los mRNA eucariontes. A diferencia de los mRNA celulares, los genomas de virus de RNA pueden presentar varias modificaciones en sus extremos 5' o 3'. En el caso de los *Potyvirus* su genoma está constituido por RNA de cadena sencilla positiva quien en vez de *cap*, tiene unida covalentemente en el extremo 5' a la proteína VPg de origen viral (Carrington y Freed 1990).

Una mutante nula para eIF(iso)4E en *A. thaliana* ecotipo Col-0 mostró resistencia a los Potyvirus, virus del mosaico del nabo (TuMV) y virus del mosaico de la lechuga (LMV), pero fue susceptible al virus del anillo negro de tomate (TBRV) y al virus del mosaico del pepino (CMV) pertenecientes a géneros distintos (Duprat, Caranta et al. 2002). Curiosamente, esta mutante mostraba mayores niveles de expresión de eIF4E, lo cual sugirió que virus diferentes podrían utilizar de manera preferencial distintas isoformas de eIF4E durante su ciclo de infección en este hospedero. Trabajos realizados con diferentes plantas como hospederos de distintos virus han revelado que efectivamente existe una especificidad entre virus-isoforma eIF4E-hospedero (Robaglia, 2006; Wang & Krishnaswamy, 2012).

Por otra parte en estudios realizados in vitro se ha observado que eIF4E y eIF(iso)4E son capaces de interaccionar con la proteína VPg de Potyvirus, siendo

esta interacción un elemento crítico durante la infección viral (Leonard, Plante et al. 2000), por lo que se han sugerido los siguientes mecanismos durante la infección por *Potyvirus*: (1) participando en la traducción del genoma viral; (2) protegiendo el genoma viral contra la degradación; (3) facilitando la movilización del virus dentro del hospedero; (4) participando en un mecanismo de inhibición de la traducción de mRNAs celulares; (5) contrarrestando el mecanismo de defensa que la planta establece mediante silenciamiento por RNAi. Mientras que los primeros tres mecanismos fueron sugeridos por Lellis et al, (2002), la inhibición de la traducción celular se apoya por los trabajos de Eskelin et al. (2011) y Khan et al. (2008), y el quinto mecanismo fue sugerido recientemente por Wang y Krishnaswamy (2012). Datos del laboratorio no publicados han evidenciado que la ausencia de eIF(iso)4E en *A. thaliana* afecta la dispersión sistémica de un aislado mexicano de TEV; aunque no se ha estudiado a nivel molecular la función de este factor en el ciclo de infección viral.

En este trabajo se obtuvo la secuencia del genoma de un aislamiento de TEV proveniente del estado de Tamaulipas (TEV-TAMPS), capaz de sobrepasar la resistencia RTM de *A. thaliana* Col-0. Análisis filogenéticos realizados con las secuencias VPg y CP revelaron divergencia entre aislamientos que son afectados por el mecanismo de defensa RTM y TEV-TAMPS. Dado que VPg y CP son proteínas involucradas en el movimiento viral, cambios en algunos aminoácidos en las regiones central y N-terminal respectivamente podrían ser responsables de la capacidad de TEV-TAMPS para sobrepasar este mecanismo de resistencia. Por otra parte, se observó, que eIF(iso)4E es dispensable para la replicación y traducción viral en *A. thaliana*, pero no para el movimiento sistémico de TEV-TAMPS. Además, mediante experimentos de co-inmunoprecipitación se encontró que eIF(iso)4E se asocia in vivo con proteínas virales importantes para el movimiento local y sistémico como son CP y NIa (precursor de VPg), apoyando la hipótesis de que este factor juega un papel en el transporte del RNA viral en el sistema *A. thaliana*-TEV.

2. ANTECEDENTES

Los síntomas de las infecciones virales tales como desarrollo anormal, clorosis y necrosis, además de alteraciones fisiológicas como decremento en la fotosíntesis, incremento en la respiración, acumulación de compuestos nitrogenados e incremento en procesos oxidativos son el resultado de las interacciones que promueven la propagación viral (Culver y Padmanabhan 2007), en los siguientes párrafos se describen algunos mecanismos que emplean los virus para propagarse a través del hospedero así como estrategias que éstos han desarrollado para contrarrestar el proceso de infección viral.

2.1 Mecanismos de propagación viral en plantas.

Los virus de plantas se propagan desde las células inicialmente infectadas hacia el resto de la planta (Talianky, Torrance et al. 2008). La infección viral sistémica es usualmente limitada a ciertas especies hospederas. Por otro lado algunos hospederos pueden restringir al virus a la hoja inoculada o bien a las células inicialmente inoculadas y en algunos casos, donde la infección sistémica tiene éxito, el virus puede no ser capaz de infectar todos los tejidos. Descrito de una manera breve, una vez que un virus ha entrado en una célula, con ayuda de las MPs éste es diseminado de una célula a otra a través de los plasmodesmos para crear un foco de infección local hasta alcanzar los tejidos de la vasculatura por los cuales es cargado a tejidos distales de manera similar como lo hacen los fotoasimilatos (Figura 1) (Niehl y Heinlein 2011).

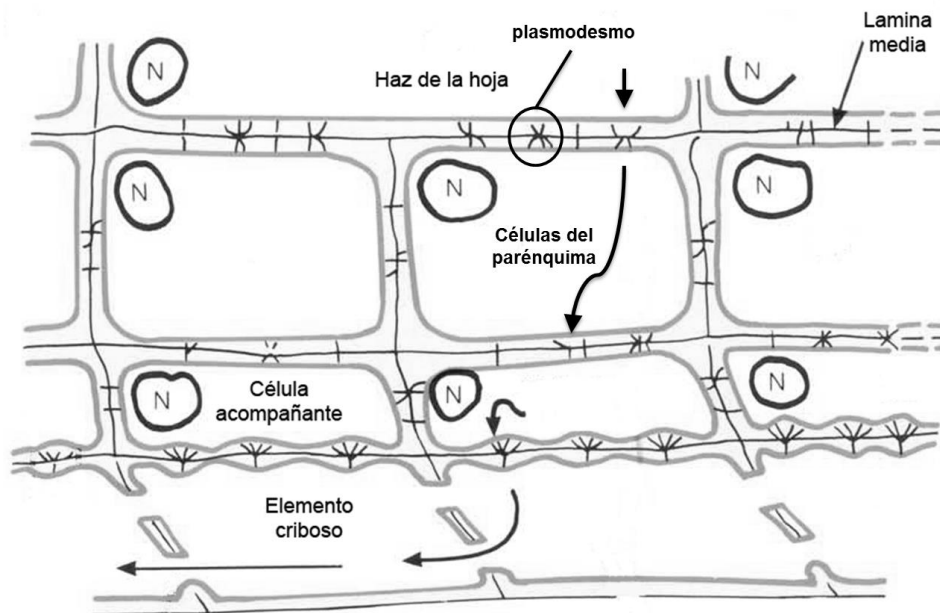


Figura 1. Esquema que representa un corte longitudinal de una hoja. Las flechas indican el flujo de moléculas para su carga al floema pasando por distintos tipos celulares comunicados por plasmodesmos (tomado de Lucas y Wolf, 1993).

2.1.1 Movimiento viral de célula a célula.

En plantas existen dos rutas de transporte intercelular de moléculas: la ruta apoplástica que comunica mediante interacciones receptor-ligando, y la ruta simplástica que permite el intercambio directo de macromoléculas intercelular a través de los plasmodesmos (Heinlein y Epel 2004, Boller 2005).

Los plasmodesmos son canales membranosos que permiten la conexión de células adyacentes estableciendo una dinámica de rutas de entrega de nutrientes y moléculas mensajeras tales como hormonas, proteínas reguladoras y RNAs (Cilia y Jackson 2004, Kim 2005, Lucas, Ham et al. 2009). Estos canales se forman durante la citocinesis cuando una parte del retículo endoplásmico queda atrapado en el desarrollo del fragmoplasto. El retículo endoplásmico forma un canal membranosos axial central conocido como desmotúbulo (Figura 2). El pequeño espacio entre la membrana plasmática y el desmotúbulo es una conexión citoplasmática la cual se ha visto interrumpida por cuerpos proteicos para formar una red de microcanales. Algunas moléculas pequeñas pueden ser transportadas por difusión. El dominio de pared celular que rodea al plasmodesmo es también

característico, habiendo depósitos de calosa cerca de la abertura del cuello y de las áreas ricas en pectina en la región central (Figura 2). Los plasmodesmos están presentes en las interfaces de todas las células simplásticamente conectadas, sin embargo, son modificados estructural y funcionalmente durante el desarrollo para crear dominios simplásticos específicos afectando la conductividad del plasmodesmo (Oparka y Turgeon 1999, Lucas y Lee 2004).

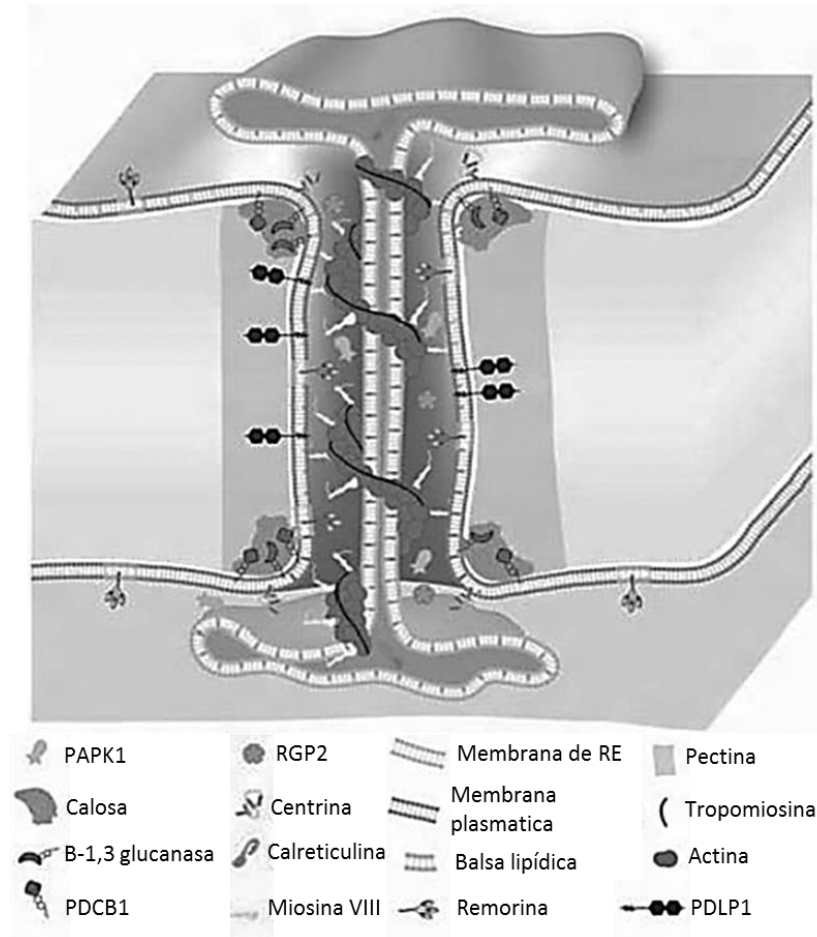


Figura 2. Esquema de un plasmodesmo simple que muestra la organización general y propuesta de la localización de algunas proteínas que se han encontrado asociadas a ésta estructura (Tomado de Benitez-Alfonso, 2010).

Se han encontrado un gran número de proteínas localizadas en el plasmodesmo, de las cuales no se ha discernido si están asociadas al mismo de manera transitoria o indirecta. Considerando una función análoga al complejo del poro nuclear, se ha especulado que podría haber decenas o centenares de proteínas asociadas a la estructura y función del plasmodesmo. Referencias experimentales dan evidencia de componentes del citoesqueleto asociados directamente a ésta estructura por ejemplo: actina, miosina VIII, centrina y tropomiosina (Faulkner,

Blackman et al. 2009), una familia de proteínas parecidas a receptores (PDLP1-8) (Thomas, Bayer et al. 2008), la β -1,3-glucanasa, una familia de proteínas de unión a calosa (PDCB) (Simpson, Thomas et al. 2009), un polipéptido de glicosidación reversible asociado al aparato de Golgi y plasmodesmo (RGP2), remorinas asociadas a balsas lipídicas (Raffaele, Bayer et al. 2009) y calreticulina asociada a retículo endoplásmico (Maule 2008).

La regulación del flujo molecular a través del plasmodesmo y los roles de sus componentes permanecen sin esclarecer, sin embargo muchos esfuerzos han sido enfocados en el estudio de los mecanismos de cierre físico de la apertura del plasmodesmo por deposición de calosa en la parte cercana a la pared. En este mecanismo, se ha planteado que la actina está posiblemente rodeando al desmotúbulo, causando tensión y contrayendo la estructura del plasmodesmo para controlar el flujo molecular y así afectar el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo (Ding, Kwon et al. 1996, Benitez-Alfonso, Faulkner et al. 2010, Su, Liu et al. 2010, Zavaliev, Ueki et al. 2011).

Mientras que en tejidos demanda el plasmodesmo tiene una simple estructura primaria y un límite de exclusión bastante grande permitiendo la libre difusión de macromoléculas, por ejemplo la proteína verde fluorescente (GFP), los plasmodesmos en tejidos fuente tienen una compleja estructura secundaria ramificada y un límite de tamaño de exclusión restringido (Oparka, Roberts et al. 1999).

El tráfico a través del plasmodesmo puede ser clasificado en dos tipos: no dirigido y dirigido. El primero ha sido demostrado para pequeñas proteínas citoplasmáticas las cuales se pueden mover entre células por simple difusión dependiendo de su abundancia y peso molecular. Un ejemplo de éste tipo de tráfico es el de la proteína LEAFY (LFY) en *A. thaliana* la cual ha sido reportada capaz de moverse entre células adyacentes con el fin de activar genes homeóticos (Sessions, Yanofsky et al. 2000). Por otra parte, el tráfico dirigido está caracterizado por el transporte de proteínas conducido por proteínas de movimiento. Un ejemplo claro de este tipo de movimiento es el tráfico de genomas virales a través del plasmodesmo, en éste mecanismo se ha caracterizado un sistema de MPs que interactúan con el plasmodesmo incrementando el límite de tamaño de exclusión. También se han identificado algunas proteínas y estructuras subcelulares que

podrían estar involucradas en el movimiento viral. Por mencionar algunas, se ha encontrado que la chaperona HSP70 (Aoki, Kragler et al. 2002), la actina y miosina del citoesqueleto, el retículo endoplasmico (Heinlein, Epel et al. 1995, Reichel, Mas et al. 1999), proteína cinasas dependientes e independientes de calcio (Yoshioka, Matsushita et al. 2004, Lee, Taoka et al. 2005, Trutnyeva, Bachmaier et al. 2005), metil esterasas de pectina (Chen, Sheng et al. 2000) y muchas proteínas con funciones desconocidas se asocian con el plasmodesmo y en algunos casos interactúan con las proteínas virales del movimiento teniendo un papel en el trafico intercelular (Alfonso, Cantrill et al. 2006).

Los virus en forma de viriones o en complejos de proteínas y ácidos nucleicos son movidos de los sitios de replicación hacia los plasmodesmos a través de rutas similares empleadas por las plantas hospederas para llevar a cabo el trafico intercelular de macromoléculas. Es generalmente aceptado que los plasmodesmos tienen la capacidad de permitir la salida y/o la entrada de proteínas endógenas y complejos ribonucleoprotéicos para ejercer control en el proceso de desarrollo de células no autónomas (Lucas y Wolf 1993, Nakajima, Sena et al. 2001). Algunos estudios han demostrado que este sistema permite la translocación de algunos RNAs celulares a larga distancia, lo que ha sugerido que los virus por medio de sus proteínas secuestran a los sistemas de transporte del hospedero para su movimiento (Ruiz-Medrano, Xoconostle-Cazares et al. 1999, Taliansky, Torrance et al. 2008).

Las proteínas virales son requeridas para la replicación, movimiento intercelular, supresión del silenciamiento, la encapsidación y en algunas ocasiones pueden poseer más de una función. Por ejemplo en el genoma del *virus del mosaico del tabaco* (TMV) se encuentran codificadas dos subunidades de la replicasa viral (126 KDa y 183 KDa), una MP de 30 KDa y CP de 17.5 KDa (Heinlein 2002). La replicasa es requerida para llevar a cabo la replicación del RNA viral y existen evidencias de que se puede asociar al movimiento viral (Hirashima y Watanabe 2001). La falta de MP es dispensable para la replicación viral pero afecta el movimiento célula a célula y la diseminación sistémica. La CP es requerida para la encapsidación del RNA viral, estabilidad y transmisión mecánica del virus. Análisis de mutantes de TMV carentes de la región que codifica para CP indican que estos mutantes se encuentran afectadas en la capacidad de moverse sistémicamente pero no para llevar a cabo el movimiento célula a célula, lo que ha sugerido que

éste último movimiento del virus es en forma no encapsidada (Holt y Beachy 1991).

Los virus de plantas pueden ser clasificados en cinco tipos dependiendo el ciclo viral y las proteínas que requieren para llevar a cabo el movimiento célula-célula: 1) los que utilizan sistemas de tráfico viral que requieren únicamente la MP; 2) sistemas virales en los que se requieren dos proteínas para el movimiento local; 3) sistema particular para begomovirus que emplea una MP y una proteína de acarreamiento nuclear; 4) sistemas donde es necesaria la expresión de múltiples proteínas; y 5) sistemas de tráfico de proteínas endógenas en células no autónomas y complejos ribonucleoprotéicos (tabla 1) (Lucas 2006).

Tabla 1. Clasificación de virus de DNA y RNA acorde a las proteínas requeridas en el movimiento célula a célula. Tomada de Lucas (2006).

Grupo	Género	Especie	MP(s)	Proteínas auxiliares
1	<i>Tobamovirus</i>	TMV	30 kDa	
	<i>Dianthovirus</i>	RCNMV	30 kDa	
	<i>Umbravirus</i>	GRV	ORF 4	
2	<i>Bromovirus</i>	CCMV	3a	
	<i>Cucumovirus</i>	CMV	3a	CP
3	<i>Begomovirus</i>	BDMV/SLCV	BCI	BV1
4	<i>Potyvirus</i>	TEV/BCMNV/LMV	HC-Pro + CP	CI
	<i>Hordei-like virus</i>	BSMV	TGBp 1	TGBp2 +TGBp3
	<i>Potex-like virus</i>	PVX/WCIMV	TGBp 1	TGBp2 +TGBp3 + CP

Para el grupo 1 se ha propuesto que MP de TMV causa incremento en la permeabilidad y el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo facilitando el paso de la partícula ribonucleoprotéica viral a través del canal pero provocando al mismo tiempo alteración en el transporte de carbohidratos, RNAs pequeños y algunas proteínas afectando la localización de recursos celulares y las señales de comunicación entre células. Este mecanismo de movimiento es independiente de la proteína de la cápside. Además, se ha demostrado que TMV no requiere estar

en forma de virión para poder moverse de una célula a otra (Citovsky, Knorr et al. 1990, Citovsky, Wong et al. 1992, Scholthof 2005, Culver y Padmanabhan 2007).

En el caso de los virus incluidos en el grupo 2, se sabe que requieren de una MP para permitir el movimiento célula a célula del virus, sin embargo, en algunos casos, la CP es requerida para el paso a través de los plasmodesmos. En tales casos CP cumple la función de una proteína auxiliar de MP. El género *Cucumovirus* provee un claro ejemplo de este mecanismo. Se sabe que para el que se lleve a cabo el movimiento célula a célula de CMV se requiere la asociación de su MP con el RNA viral formando una partícula ribonucleoproteica, que al igual que la MP de TMV induce un cambio en el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo. Sin embargo, la formación de la partícula no es suficiente para inducir el movimiento. Curiosamente al expresar proteínas MP truncadas en el extremo carboxilo, la interacción de MP con el RNA viral en los complejos ribonucleoprotéicos es más fuerte y viable para moverse, sugiriendo un modelo en el que la CP de CMV induce un cambio conformacional en MP para formar complejos ribonucleoprotéicos competentes para el movimiento (Palukaitis y Garcia-Arenal 2003, Kim, Kalinina et al. 2004, Taliansky, Torrance et al. 2008).

El grupo 3 incluye a begomovirus perteneciente a la familia *Geminiviridae*. Estos virus tienen genoma de DNA de cadena sencilla (ssDNA), son multipartitas y presentan secuencias que codifican proteínas MP. Se ha estudiado ampliamente el mecanismo de movimiento de la MP BC1. Esta proteína interacciona únicamente con DNA de manera específica, reflejando el estado de replicación viral. El DNA de estos virus es replicado dentro del núcleo y la exportación de la progenie en forma de cadena doble o sencilla es mediada por la proteína BV1 de acarreamiento nuclear. La interacción entre BV1 y BC1 es esencial para que en complejo pueda llevarse a cabo el movimiento a través de los plasmodesmos (Gilbertson, Sudarshana et al. 2003).

Para el grupo 4 se ha documentado el requerimiento de MP y dos proteínas adicionales necesarias para efectuar el movimiento célula a célula. Dentro de este grupo, el género *Potyvirus* es un caso interesante ya que en su genoma no parece haber un marco de lectura que codifique una proteína MP. En éste género viral se han optimizado las funciones de las proteínas existentes para poder cumplir con las funciones de proteínas de movimiento (Revers, Le Gall et al. 1999).

Experimentos de microinyección de proteínas de LMV y del *virus común de la necrosis en mosaico del fríjol* (BCMNV) revelaron que las proteínas CP y el componente auxiliar de la proteinasa (HC-Pro) pueden a) inducir incremento en el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo, b) transitar a través del plasmodesmo y c) facilitar el movimiento de célula a célula del RNA viral (Rojas, Zerbini et al. 1997). Interesantemente, HC-Pro de BCMNV es más eficiente que CP para inducir el cambio en el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo y el tráfico de célula a célula. Se ha sugerido que HC-Pro y CP podrían actuar cooperativamente mediando el tráfico del RNA viral (Roudet-Tavert, German-Retana et al. 2002). El resto de las proteínas codificadas por el genoma del *Potyvirus* al parecer no interaccionan o producen cambios en las propiedades de los plasmodesmos, sin embargo, se ha probado que la RNA helicasa CI es requerida para hacer eficiente la dispersión viral de célula a célula en etapas tempranas de la infección. Debido a esto, se ha planteado que CI es una proteína auxiliar del proceso de movimiento (Rojas, Zerbini et al. 1997, Carrington, Jensen et al. 1998, Roberts, Wang et al. 1998).

Finalmente los virus del grupo 5 usan un sistema mediado por la expresión de un bloque triple de genes (TGB), que codifica para las proteínas TGBp1, TGBp2 y TGBp3, todas ellas esenciales para el movimiento viral de célula a célula. La proteína TGBp1 de los sistemas de movimiento viral parecidos a los *Hordeivirus* contiene múltiples sitios de interacción con RNA con una fuerte actividad de unión cooperativa. Estas propiedades pueden explicar por qué los virus pertenecientes a este grupo no requieren de la proteína CP (Morozov y Solovyev 2003). Consistente con el argumento anterior, se han podido aislar de tejidos infectados complejos de RNA viral asociado con TGBp1. Otra característica de TGBp1 es que presenta actividad de helicasa ATP-dependiente; mediante mutaciones en el dominio de helicasa se ha podido averiguar que esta función es indispensable para llevar a cabo el movimiento célula a célula aunque no se conoce si la actividad de helicasa de TGBp1 tiene una función similar a la proteína CI de *Potyvirus* (Zamyatnin, Solovyev et al. 2004). Por otra parte, TGBp1 parece carecer de la capacidad para modificar el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo. En este sentido las proteínas auxiliares TGBp2 y TGBp3 son esenciales para el movimiento de complejos formados por RNA viral y TGBp1 hacia plasmodesmos (Erhardt, Stussi-Garaud et al. 1999, Erhardt, Morant et al. 2000).

El grupo 5 incluye virus parecidos a miembros del género *Potexvirus* (Tabla 1), los cuales codifican a una proteína conservada TGBp1. Esta proteína es esencial para el movimiento célula-célula. Adicionalmente los virus de este grupo requieren de la proteína CP, además de otras cuatro proteínas virales, para llevar a cabo la dispersión célula a célula. Un gran número de trabajos han planteado que la proteína TGB1 de este tipo de virus induce cambios en el límite del tamaño de exclusión del plasmodesmo para poder mediar el movimiento viral. Aunque no ha sido entendida completamente la función de ésta proteína, se ha sugerido un papel importante en la compartimentalización de productos génicos virales mediante la remodelación de las fibras de actina y membrana del retículo endoplásmico, ejerciendo control del transporte viral intracelular (Yang, Ding et al. 2000, Howard, Heppler et al. 2004, Tilsner, Linnik et al. 2012).

2.1.2 Movimiento viral sistémico.

El movimiento de célula-célula y el movimiento sistémico o a distancia son procesos diferentes en los cuales son usadas distintas proteínas virales. A la fecha no se han esclarecido los mecanismos por los cuales los virus pueden entrar, moverse y salir del sistema vascular. Este sistema está rodeado por células del haz de la hoja y contiene distintos tipos celulares como células del parénquima, células acompañantes y elementos cribosos. El transporte de un virus dentro del tejido vascular implica el movimiento desde células del mesófilo hacia las células del haz vascular de la hoja, desde células del haz vascular de la hoja hacia células del parénquima vascular o células acompañantes, y la subsecuente entrada a los elementos cribosos (Oparka y Turgeon 1999). Se ha sugerido que la salida del tejido vascular involucra los mismos pasos en orden inverso aunque con algunas excepciones (Swanson, Barker et al. 2002).

Los elementos cribosos y células acompañantes se originan a partir de las mismas células precursoras, pero durante la diferenciación, los elementos cribosos pierden organelos (núcleo y mitocondrias), así como ribosomas, y se vuelven dependientes de las células acompañantes en términos de suministro de biomoléculas esenciales. La interface entre el haz vascular y las células del parénquima vascular, o parénquima vascular y las células acompañantes, a menudo constituye el principal obstáculo que bloquea la entrada de los virus en

elementos cribosos e impide el movimiento viral a larga distancia (Shun Ding, Carter et al. 1998, Thompson y García-Arenal 1998).

La invasión de las venas en una hoja inoculada es un prerequisite para la rápida diseminación de los virus a través del hospedero. Dependiendo de la combinación virus-hospedero se establecen diferencias en el modo en el que los virus son cargados y descargados del sistema vascular. Por mencionar un par de ejemplos, el TMV es cargado al floema en todas las venas de las hojas inoculadas de *Nicotiana benthamiana*, mientras que los *Potyvirus* se cargan a través de las venas más pequeñas del tejido fuente. Sin embargo, la descarga de ambos tipos virales desde el floema es a través de las venas más grandes del tejido demanda (Shun Ding, Carter et al. 1998, Cheng, Su et al. 2000, Rajamaki y Valkonen 2002).

La punta de una hoja es la parte más vieja y la primera en pasar de ser de tejido demanda a tejido fuente. Posteriormente, el límite de transición se mueve gradualmente hacia la parte basal de la hoja durante su maduración. A nivel de toda la planta, la transición comienza en las hojas más viejas y conforme la planta madura, más hojas de la parte superior adquieren la condición de tejido fuente. Considerando esto, se piensa que el proceso de inicio de la infección hasta la carga del virus al floema es más corto cuando el virus se inocula en una hoja fuente o en el tejido fuente de una hoja (Vuorinen, Kelloniemi et al. 2011).

En los tejidos demanda, los virus son descargados desde los elementos cribosos a través del mismo tipo de células por las que se lleva a cabo la carga al floema, pero en orden inverso. Los plasmodesmos son más dilatados en los tejidos jóvenes y, por lo tanto, más permisivos en tejidos demanda que en tejidos fuente (Crawford y Zambryski 2001, Kim, Cho et al. 2005).

Los virus pueden moverse sistémicamente en elementos cribosos como partículas de virus (Simón-Buela y García-Arenal 1999), o en complejos con proteínas. En muchos casos no es clara la forma en la que se lleva a cabo el movimiento de los virus a través del sistema vascular. Por ejemplo, se ha observado que mutaciones en la parte central de la proteína CP de *Potyvirus*, interfieren con el ensamblaje del virión comprometiendo el movimiento a larga distancia, lo que sugiere que los *Potyvirus* podrían moverse sistémicamente en forma de viriones (Dolja, Haldeman

et al. 1994, Dolja, Haldeman-Cahill et al. 1995, Varrelmann y Maiss 2000, Arazi, Shibolet et al. 2001).

Se sabe que para el transporte a larga distancia de muchas especies virales, la presencia de la proteína CP es indispensable. En los raros casos donde esta proteína es dispensable para la diseminación viral, el tiempo en el que se lleva a cabo el movimiento se ve incrementado. Muchos virus codifican proteínas que proveen funciones necesarias para la dispersión sistémica de la infección. Un ejemplo interesante es el de los virus limitados al floema, como el *virus del enrollamiento de la hoja de la papa* (PLRV), miembro del género *Polerovirus*. Para este virus el movimiento en tejidos de parénquima es limitado y la dispersión sistémica está soportada por el movimiento a larga distancia a través del floema. Interesantemente, la MP de PLRV (17 kDa), posee propiedades similares a la MP de TMV y funciona en el movimiento de célula a célula. Sin embargo, a pesar de esta similitud la MP de PLRV no es capaz de mediar el movimiento fuera del tejido vascular, restringiendo su función solo al movimiento entre células de los tejidos del floema. Se presume que PLRV podría usar una estrategia independiente de MP para moverse en el floema, donde CP y el producto de su traducción alterna estrían involucrados en la dispersión sistémica (Tacke, Prufer et al. 1991, Taliansky, Mayo et al. 2003).

Los miembros del género *Umbravirus* representan un caso particular, ya que no codifican una CP, pero pueden acumularse y diseminarse sistémicamente con mucha eficiencia en plantas infectadas (Talianky y Robinson 2003). Análisis genéticos del *virus de la roseta del maní* (GRV) y otros umbravirus, han mostrado que las proteínas codificadas por el marco de lectura abierto 3, es esencial para el movimiento a larga distancia y puede reemplazar funcionalmente a la CP de TMV para promover el movimiento a distancia. Estudios de localización han mostrado que la proteína producto de este marco se acumula en gránulos de partículas ribonucleoprotéicas filamentosos en el citoplasma que contienen el RNA viral. Estos gránulos fueron detectados en todos los tipos celulares y fueron abundantes en células asociadas al floema, lo que ha sugerido que podrían proteger al RNA viral y quizás promover su transporte a través del floema (Talianky, Roberts et al. 2003, Taliansky y Robinson 2003, Taliansky, Torrance et al. 2008).

2.2 Mecanismos de resistencia contra virus en plantas.

Para que el proceso de infección viral ocurra, los productos génicos de la planta hospedera y de los virus, deben cooperar para conferir susceptibilidad y en la ausencia de los factores apropiados, conferir la resistencia (Truniger y Aranda 2009).

La resistencia a enfermedades de plantas ha sido principalmente dividida en tres grandes categorías: la resistencia no asociada al hospedero, la resistencia asociada al hospedero y la resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés: *systemic acquired resistance*) (Kang, Yeaman et al. 2005). La resistencia tipo SAR fue inicialmente identificada en plantas de *Nicotiana tabacum* en estudios con el TMV. Esta respuesta puede ser activada en algunas especies de plantas atacadas por diversos patógenos que causan muerte necrótica celular (Ross 1961), resultando en la disminución de la susceptibilidad al posterior ataque de un patógeno.

Aunque la capacidad de los virus para invadir las plantas y causar infección sistémica es dependiente de factores virales y celulares, también debe considerarse la influencia que tienen las defensas antivirales de las plantas y la capacidad de los virus para suprimirlas, evadirlas o superarlas por evolución. Una estrategia de defensa antiviral importante en las plantas es el reconocimiento de proteínas efectoras virales por parte de productos génicos de resistencia y la subsecuente iniciación de una respuesta hipersensible (HR por su nombre en inglés: *hypersensitive response*) la cual conduce a la muerte celular. Ésta respuesta restringe la infección a las células inicialmente infectadas. Sin embargo, como un segundo nivel de defensa producido por la respuesta HR, una señal autónoma no celular conduce a la SAR que proporciona protección no específica contra un amplio espectro de patógenos (Durrant y Dong 2004). Otro mecanismo de defensa autónomo no celular es el silenciamiento de RNA el cual puede ser propagado célula a célula a través de los plasmodesmos y degradar RNAs virales (Baulcombe 2004). El acceso de los virus a tejidos meristemáticos no vascularizados es posible, sin embargo, es restringido o limitado por éste último sistema de defensa del hospedero (Martin-Hernandez y Baulcombe 2008).

2.2.1 Mecanismos de resistencia no asociada al hospedero.

La resistencia no asociada al hospedero, abarca el caso en el que todos los genotipos dentro de una especie de planta muestran resistencia a no ser infectados por un virus en particular. En la resistencia no asociada al hospedero, un patógeno no puede causar enfermedad en una planta no hospedera dado que la entrada del patógeno a la planta está limitada por una barrera, impidiendo la propagación de la enfermedad. Este tipo de resistencia se divide en dos tipos, (1) aquella en la que no aparecen lesiones visibles en el tejido tales como necrosis y tienden a ser mecanismos pasivos mediados por barreras tales como paredes celulares, compuestos antimicrobianos u otros metabolitos secundarios (Kobayashi, Kobayashi et al. 1992, Osbourn 1996) y (2) un tipo de respuesta más sofisticada que la anterior, puesto que se induce la subsecuente reacción al estímulo provocado por enzimas detoxificadoras producidas por los patógenos para poder vencer barreras que impiden su entrada a la célula, en otras palabras, la respuesta a moléculas elicitoras, las cuales son reconocidas por la planta y activan mecanismos de defensa y la respuesta HR para contener al patógeno en un punto de necrosis muy localizado. Poco se ha hecho durante los últimos años para identificar los componentes clave de la resistencia a las enfermedades no ligada al hospedero, sin embargo, se sabe que la alteración en componentes de este sistema conduce a la pérdida de la resistencia (Mysore y Ryu 2004).

2.2.2 Mecanismos de resistencia asociada al hospedero.

Este tipo de resistencia ha sido el más investigado, en gran medida, porque a diferencia de la resistencia no asociada al hospedero, es genéticamente accesible. De manera general, este tipo de resistencia, conocido también como resistencia específica o resistencia genotípica, ocurre cuando un polimorfismo genético para la susceptibilidad es observado en un taxón. En individuos resistentes los virus podrían o no multiplicarse en un área, pero la dispersión del patógeno a través de la planta es restringida en comparación con individuos susceptibles, y los síntomas de virosis generalmente son altamente localizados o no evidentes. Es importante distinguir entre resistencia a los patógenos y resistencia a las enfermedades. La resistencia al patógeno generalmente conduce a resistencia a la enfermedad, sin embargo, en las respuestas de resistencia que implican necrosis el resultado a veces puede ser muy dramático, incluso letal, como en el caso de la resistencia mediada por el gen *N* en tabaco a TMV (Dijkstra, Bruin et al. 1977), o el gen *I* de *Phaseolus vulgaris* que provee resistencia contra el *virus del mosaico común del*

frijol (BCMV) (Collmer, Marston et al. 2000). En el caso de resistencia a los síntomas de las enfermedades o tolerancia a la enfermedad, los virus pueden moverse a través del hospedero de manera indistinguible como en un hospedero susceptible, pero los síntomas no son observables. Si la respuesta es heredable, se dice entonces que estas plantas son resistentes a la enfermedad, aunque sean susceptibles al patógeno (Kang, Yeaman et al. 2005).

El repertorio de productos génicos virales es típicamente pequeño debido al limitado tamaño del genoma codificando de 4 a 10 proteínas que coordinan el complejo bioquímico e interacciones moleculares requeridas para la infección viral. Por esta razón los virus utilizan factores y procesos en el hospedero para completar los pasos del ciclo viral. La ausencia o modificación de los factores en las plantas requeridos por los virus pueden conferir una resistencia a la infección. La categorización de resistencia es compleja, dado que en muchas ocasiones involucra más de un gen y la magnitud del efecto de cada gen puede ser diferente. El modelo denominado *gen por gen*, propuesto originalmente por Harold Flor (Flor, 1942) se postula que la resistencia de una planta a un patógeno ocurre cuando la planta posee un gen dominante de resistencia llamado *R* y el patógeno expresa un gen complementario dominante de avirulencia llamado *Avr*. En otras palabras, la infección sólo ocurre cuando la planta o el patógeno (o ambos al mismo tiempo) carecen del alelo dominante del gen *R* o *Avr*, respectivamente. En términos genéticos, los factores de susceptibilidad del hospedero son codificados por alelos recesivos (ambos alelos del gen deben encontrarse modificados para que se produzca resistencia) y los factores de resistencia son alelos dominantes (la presencia de un solo alelo es suficiente para conferir resistencia). La mayoría de las resistencias a virus en plantas se heredan de manera recesiva (Fraser 1990, Fraser 1992, Truniger y Aranda 2009). Es decir, son pérdidas de función para un factor del hospedero que le confería susceptibilidad a la planta hacia el virus.

2.3 El género *Potyvirus*

El género *Potyvirus* perteneciente a la familia *Potyviridae*, infecta un amplio número de especies vegetales, monocotiledóneas y dicotiledóneas, por lo que es causante de grandes pérdidas en diversos cultivos de importancia agrícola. Estos virus son transmitidos principalmente por áfidos. La partícula viral tiene forma de una varilla flexible de aproximadamente 680 a 900 nm de longitud y de 11 a 15 nm de ancho. Posee un genoma monopartita constituido por una molécula de RNA de

cadena sencilla con sentido positivo de aproximadamente 10 kb cubiertos por aproximadamente 2000 unidades de CP formando una partícula con forma de varilla flexible. En el extremo 5' del RNA tienen unida covalentemente mediante un residuo de tirosina a la proteína VPg de aproximadamente 25 KDa que participa en la traducción y replicación del genoma viral, mientras que en el extremo 3' presenta una cola de adeninas. El mRNA de los *Potyvirus* tiene un marco abierto de lectura que al ser traducido produce una poliproteína de aproximadamente 340 a 370 KDa procesada por proteasas virales para dar lugar a las diferentes proteínas virales (Figura 3). Debido a esta característica, se ha agrupado a los *Potyvirus* dentro del supergrupo de los *Picornavirus* (Urcuqui-Inchima, Haenni et al. 2001, Dreher y Miller 2006, Robaglia y Caranta 2006). En un marco de lectura alterno (+2) se ha encontrado codificada una pequeña proteína nombrada PIPO por su nombre en inglés *Pretty Interesting Potyviridae ORF* (Chung, Miller et al. 2008).

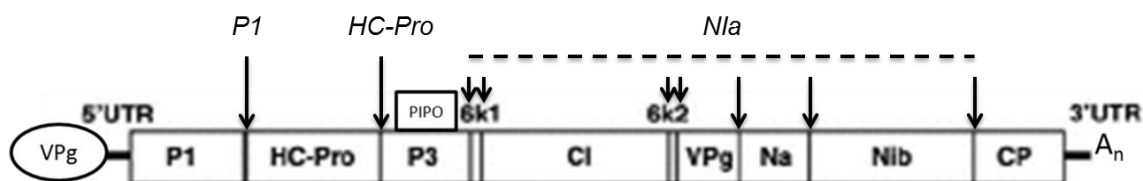


Figura 3. Esquema que muestra la organización del genoma de *Potyvirus*. Se muestra en las cajas el nombre de cada proteína codificada en el marco de lectura del genoma viral, excepto PIPO que se indica sobre P3 quien es traducida en un marco de lectura +2. Se indica la proteína VPg unida covalentemente al extremo 5' del RNA viral y la cola de poliA en el extremo 3'. En itálicas se ilustran las proteasas virales indicando con flechas los sitios de corte una vez que se ha sintetizado la poliproteína (tomado de Urcuqui-Inchima et al., 2001).

2.3.1 Resistencia dominante a *Potyvirus*.

En la búsqueda de genes de resistencia a *Potyvirus* en diversos ecotipos de *A. thaliana* se encontró una diferencia en la infectividad sistémica del virus TEV. Un análisis mutagénico en el ecotipo Columbia-0 (Col-0) reveló la presencia de tres componentes involucrados en la restricción del movimiento a distancia de TEV denominados RTM1, RTM2 y RTM3 por “restriction of TEV movement” en este ecotipo en particular, pero no en otros como Landsberg erecta (Ler) y C24 (Mahajan, Chisholm et al. 1998, Chisholm, Mahajan et al. 2000, Whitham, Anderberg et al. 2000). A pesar de la identificación de estos factores de

resistencia, a la fecha no se conoce el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el impedimento del movimiento de este virus. Sin embargo, se ha encontrado que las proteínas RTM1 y RTM2 son preferencialmente expresadas en floema (Chisholm, Parra et al. 2001). Se sabe que estas proteínas contribuyen al bloqueo de la dispersión sistémica de TEV, LMV y el *virus de la enfermedad del ciruelo* (PPV) y que los tres virus pueden establecer la infección sistémica solo cuando alguno de los genes RTM ha sido mutado (Mahajan, Chisholm et al. 1998, Decroocq, Sicard et al. 2006).

2.3.2 Resistencia recesiva a *Potyvirus*.

Entre los genes asociados a resistencia recesiva para *Potyvirus* en plantas se ha identificado con alta frecuencia a eIF4E, eIF(iso)4E, eIF4G o eIF(iso)4G (Robaglia y Caranta 2006, Truniger y Aranda 2009). Este tipo de resistencia corresponde a mutaciones o pérdida de función del componente del hospedero requerida en algún paso del ciclo viral (Tabla 2) (Robaglia y Caranta 2006). Sin embargo, la pérdida de función para el ciclo viral no necesariamente implica una afectación de la función de la proteína en la planta, por lo que el o los mecanismos por los que los factores de inicio de la traducción participan en la infección viral no son claros. Por otra parte, el requerimiento de cierto factor de la planta por determinado *Potyvirus* depende fuertemente del hospedero (Tabla 2).

Tabla 2. Factores de inicio de la traducción requeridos durante el ciclo de infección de virus de RNA en plantas (tomado de Nicaise et al., 2007; Robaglia y Caranta, 2006).

Genero	Virus	Planta	Factor de traducción
<i>Potyvirus</i>	TuMV	<i>Arabidopsis</i>	eIF(iso)4E
	TuMV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1 y eIFiso4G2
	TEV	<i>Arabidopsis</i>	eIF(iso)4E
	LMV	<i>Arabidopsis</i>	eIF(iso)4E
	CIYVV	<i>Arabidopsis</i>	eI4E
	PVY, TEV	<i>Capsicum spp.</i>	eIF4E
	PVMV	<i>Capsicum spp.</i>	eIF(iso)4E
	LMV	<i>Lactuca spp.</i>	eIF4E
	PSbMV	<i>Pisum sativum</i>	eIF4E
	PVY, TEV	<i>Lycopersicon spp.</i>	eIF4E

	LMV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1
	PPV	<i>Arabidopsis</i>	eIFiso4G1
<i>Cucumovirus</i>	CMV	<i>Arabidopsis</i>	eIF4G y eIF4E
<i>Carmovirus</i>	TCV	<i>Arabidopsis</i>	eIF4G
	MNSV	<i>Cucumis melo</i>	eIF4E
<i>Bymovirus</i>	BaYMV, BaMMV	<i>Hordeum vulgare</i>	eIF4E

2.4 Mecanismo del inicio de la traducción en eucariontes.

En el inicio de la traducción se requieren diversos factores de iniciación (eIFs) para el ensamblaje de la maquinaria traduccional. Este paso dentro de la síntesis de proteínas se encuentra altamente regulado. Las proteínas pertenecientes a la familia eIF4E reconocen la estructura *cap* de los mRNA al mismo tiempo que se asocian a eIF4G para formar el complejo eIF4F. Este complejo, mediante la proteína eIF4G, se asocia a eIF4A, una helicasa dependiente de ATP, quien junto con eIF4B se encarga de remover estructuras secundarias presentes en la región 5' no traducible (5'UTR) del mRNA. Por otro lado, la subunidad ribosomal 40S se asocia con eIF3, un factor compuesto por múltiples subunidades, que sirve como andamio y con el complejo ternario formado por eIF2-GTP y tRNAⁱ-metionina para formar así el complejo de pre-inicio 43S. El complejo eIF4F-mRNA se asocia a 43S mediante la interacción entre eIF4G y eIF3 formando el complejo de inicio 48S. Este complejo recorre la región 5' UTR hasta encontrar el codón de inicio de la traducción, en contexto adecuado, donde se une la subunidad ribosomal 60S provocando la hidrólisis de GTP unido a eIF2. Una vez iniciada la traducción, el complejo eIF4F puede seguir asociado a la estructura *cap* para proporcionar estabilidad al mRNA y eficiencia en el re-inicio de su traducción, a través de la interacción que se lleva a cabo entre eIF4G y las proteínas que se unen a la cola de PoliA (PABP) quienes tienen afinidad por la cola de PoliA del extremo 3' del mRNA. Estas interacciones causan la circularización del mRNA permitiendo que los ribosomas que terminan la traducción del mensajero queden cerca del complejo de inicio de la traducción y sean nuevamente reclutados (Jackson, Hellen et al. 2010).

2.5 Papel de eIF4E en la infección por *Potyvirus*.

En plantas se han encontrado tres miembros de la familia eIF4E denominados eIF4E, eIF(iso)4E y nCBP (Browning, 1996; Ruud, 1998 #736) los cuales interaccionan con el *cap* presente en el extremo 5' de los mRNAs y promueven el inicio de la traducción (Mayberry, Allen et al. 2011). En *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) se obtuvo una línea mutante para eIF(iso)4E (Duprat et al., 2002) mediante la inserción del transposon Spm de maíz en el segundo exón del gen *AteIF(iso)4E* (At5g35620). La inserción del elemento dSpm de 3000 pb altera el marco de lectura de *AteIF(iso)4E* y contiene como elementos de selección el gen de fosfinotricina (BAR), que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio (BASTA) y el gen de resistencia a espectinomicina (Spec). Aunque esta mutante no produce mRNA ni proteína de eIF(iso)4E, el fenotipo de las plantas no es muy diferente al de plantas silvestres bajo condiciones de laboratorio (Duprat et al., 2002; Martínez-Silva et al., 2012). Al observar que en la línea mutante eIF4E se encuentra incrementada, se pensó que eIF4E y eIF(iso)4E presentan funciones parcialmente redundantes en la planta. Por otro lado, las plantas mutantes son resistentes a los *Potyvirus* TuMV y LMV, pero son susceptibles al *virus del anillo negro de tomate* (TBRV) y al virus CMV pertenecientes a géneros distintos (Duprat, Caranta et al. 2002).

En otro trabajo mediante mutagénesis inducida por etil metanosulfonato (EMS) se buscaron mutantes del ecotipo C24 de *A. thaliana* con diferente grado de resistencia a enfermedades virales (Lellis, Kasschau et al. 2002). Se seleccionaron mutantes resistentes a la infección por los *Potyvirus* TuMV y TEV, pero susceptibles a infecciones por el *virus del marchitamiento del nabo* (TCV) perteneciente al género *Carmovirus*. El locus que brindó a las plantas el decremento en la susceptibilidad a estos *Potyvirus* fue nombrado *lsp1* y mediante mapeo genético se identificó como el gen codificante para eIF(iso)4E.

Después de estos reportes iniciales, en un gran cúmulo de trabajos se ha asociado a los genes *eIF(iso)4E* y *eIF4E* con pérdidas de susceptibilidad a *Potyvirus* por ejemplo en *A. thaliana* (Sato, Nakahara et al. 2005, Jenner, Nellist et al. 2010), *pvr1*, *pvr2* y *pvr6* en chile, *pot-1* en jitomate (Ruffel, Dussault et al. 2002, Kang, Yeam et al. 2005, Ruffel, Gallois et al. 2005, Hwang, Li et al. 2009), *sbm1*, *wlv* y *cyv2* en chícharo (Gao, Johansen et al. 2004), *mo1* en lechuga (Nicaise, German-Retana et al. 2003), *nsv* en melón (Wang y Krishnaswamy 2012) y *bc-3* frijol (Naderpour, Lund et al. 2010). Aunque en menor cantidad, también hay

estudios que abordan los posibles mecanismos mediante los cuales estos factores podrían ejercer un rol importante en el ciclo viral infectivo (Lellis, Kasschau et al. 2002, Eskelin, Hafren et al. 2011). Entre estos últimos, el hallazgo más importante fue la demostración de que eIF(iso)4E o eIF4E puede establecer interacción directa con la proteína VPg de algunos *Potyvirus* (Leonard, Plante et al. 2000). Dada la función celular de eIF4E/eIF(iso)4E y la ubicación de VPg en el extremo 5' del genoma viral, se ha propuesto que la interacción entre estas proteínas podría promover la traducción del mensajero viral, evitar su degradación, participar en la movilización del RNA viral, y/o abatir el mecanismo de silenciamiento por RNAi para defensa de la planta a virus (Figura 4).

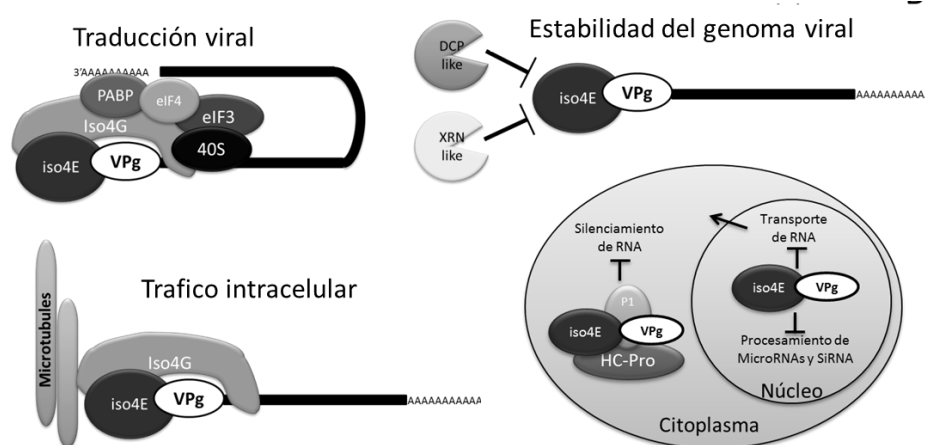


Figura 4. Roles potenciales de eIF(iso)4E durante la infección por *Potyvirus* propuestos por Lellis et al., 2002 y Wang, A. y S. Krishnaswamy, (2012).

En estudios con eIF4E y eIF(iso)4E recombinantes de *A. thaliana* y *Triticum aestivum* se observó que la proteína VPg-Pro (un precursor de VPg) del virus TuMV puede llevar a cabo una eficiente interacción con eIF(iso)4E de Arabidopsis y de trigo, y con menor eficiencia, con eIF4E de estas especies. Esto indica que VPg puede unirse a cualquier isoforma y podría existir competencia entre VPg y los mRNA celulares por unirse a los factores eIF4E. Por otro lado, se mapeó el sitio de interacción de VPg con eIF4E, encontrando que una secuencia de 35 aminoácidos conservada en proteínas VPg de diferentes *Potyvirus*, es la responsable de dicha interacción. Al sustituir el ácido aspártico en la posición 77, así como la fenilalanina de la posición 59, la interacción es inhibida (Leonard, Plante et al. 2000). Otros estudios *in vitro* demuestran que existe competencia entre VPg y el análogo de cap 7mGTP por eIF(iso)4E de *A. thaliana* predominando la interacción entre VPg y eIF(iso)4E. Además se observó que esta interacción es viable para formar el complejo VPg-eIF(iso)4E-eIFiso4G, lo que sugiere que este

complejo podría participar en la traducción del genoma viral (Miyoshi, Suehiro et al. 2006).

Por otra parte, en ensayos de traducción *in vitro* del gen reportero codificante para la β -glucuronidasa (GUS) utilizando la región 5'UTR de TEV se demostró que esta región puede promover la traducción independiente de *cap* (Carrington y Freed 1990). Se ha sugerido que los 143 nucleótidos del extremo 5' del RNA genómico de TEV mantienen un plegamiento formando dos dominios compuestos por pseudonudos (PK1, PK2 y PK3), los cuales pueden promover la traducción *cap*-independiente dado que existe complementariedad entre el pseudonudo PK1 con una región conservada en el RNA ribosomal 18S de muchos eucariontes (Zeenko y Gallie 2005). Al medir *in vitro* la interacción entre el pseudonudo PK1 y eIF4G o eIF(iso)4G provenientes de extractos de germen de trigo, se evidenció que la afinidad de eIF4G por PK1 es ~30 veces mayor que la de eIF(iso)4G. En ambos casos la afinidad se incrementa al usar los complejos eIF4F o eIF(iso)4F, pero la de eIF4F sigue siendo más fuerte (~3.5 veces) que la de eIF(iso)4F (Ray, Yumak et al. 2006).

Los antecedentes anteriores indican que eIF(iso)4E es importante durante el proceso de infección por *Potyvirus* en algunas especies de plantas. Sin embargo, aún no es claro si la función de este factor en el ciclo viral es relevante a nivel de traducción, replicación, estabilidad, o movimiento del RNA viral.

2.6 Antecedentes directos

Avances previos de este trabajo mostraron, mediante estudios *in planta*, que un aislamiento mexicano del virus TEV (TEV-TAMPS) es capaz de sobrepasar el mecanismo de resistencia mediado por RTM en *A. thaliana* ecotipo Col-0, pero que requiere a eIF(iso)4E para su dispersión sistémica. Análisis preliminares indicaron que eIF(iso)4E no es indispensable para la estabilidad y traducción del RNA viral (Contreras-Paredes, 2008). Por otra parte, se desconoce si éste factor está involucrado en la replicación, el movimiento viral de célula a célula y/o en el movimiento a larga distancia. Acorde con los antecedentes arriba descritos, la interacción VPg-eIF(iso)4E es importante para su función durante la infección por *Potyvirus*, pero no se conocen las base moleculares de la participación de esta interacción en el movimiento viral.

3. HIPÓTESIS

Dado que un aislamiento mexicano del *virus del jaspeado del tabaco* (TEV-TAMPS) proveniente del Estado de Tamaulipas es capaz de dispersarse sistémicamente en plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 solamente en presencia de eIF(iso)4E, proponemos que: 1) TEV-TAMPS presenta cambios en la secuencia de alguna proteína viral involucrada en movimiento que le permite sobrepasar al mecanismo de resistencia RTM; 2) eIF(iso)4E tiene una función específica en el movimiento de RNA viral, ya sea a nivel de célula-célula y/o a larga distancia.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar la secuencia de TEV-TAMPS y estudiar a nivel molecular la participación de eIF(iso)4E en el ciclo infectivo de este aislamiento viral en *A. thaliana* ecotipo Col-0.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

5.1 Obtener la secuencia genómica del aislamiento viral TEV-TAMPS y compararla con el aislamiento TEV7DA (susceptible a RTM) y otros aislamientos cuya secuencia está previamente reportada.

5.2 Analizar la participación de eIF(iso)4E en la acumulación y replicación del genoma de TEV-TAMPS en *A. thaliana* Col-0.

5.3 Analizar la participación de eIF(iso)4E en la traducción de TEV-TAMPS a nivel local en *A. thaliana* Col-0.

5.4 Evaluar *in planta* la formación de complejos entre eIF(iso)4E y proteínas de TEV-TAMPS involucradas en el movimiento durante la infección de tejido local de *A. thaliana* ecotipo Col-0.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico.

En este trabajo se utilizaron plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Col-0, una línea mutante homocigota nula para *eIF(iso)4E* (*AtelF(iso)4E-1*) (Duprat, Caranta et al. 2002) y una línea sobreexpresora de *eIF(iso)4E* fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el promotor viral 35S (*AtelF(iso)4E-2*) (Martinez-Silva, Aguirre-Martinez et al. 2012) generadas en el mismo ecotipo Col-0. También se utilizaron plantas silvestres del ecotipo C24 como control en el que la diseminación sistémica de TEV no es restringida por el mecanismo RTM (Mahajan, Chisholm et al. 1998). Las plantas fueron mantenidas a 22°C, con fotoperiodo de 8 horas luz por 16 horas oscuridad. En este estudio se utilizó un aislamiento mexicano de TEV (TEV-TAMPS), proveniente plantas de *Capsicum annum* de Tampico Madero, Tamaulipas México, proporcionado por la Dra. Laura Silva-Rosales, del departamento de Ingeniería Genética del Cinvestav-Irapuato. El inóculo viral fue propagado en plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. El aislamiento de TEV US_7DA _DQ986288 (TEV-7DA) fue obtenido a partir del plásmido p35TEV proporcionado por el Dr. José-Antonio Daròs Arnau del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad de Valencia, España. El plásmido p35TEV fue expresado en plantas de *N. tabacum* var. Xanthi como indica la descripción realizada por Bedoya y Daròs (2010).

6.2 Obtención de viriones.

Para análisis cuantitativos, los viriones de los aislamientos de TEV fueron parcialmente purificados a partir de 5 g de tejido de tabaco infectado (con síntomas) los cuales fueron molidos con nitrógeno líquido y homogeneizados con 10 volúmenes de 10 mM NaOAc pH 5.2 y la mezcla fue incubada en hielo por 1 h. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 12 000 g a 4°C por 15 min. Se desechó el sobrenadante por decantación y se adicionó un cuarto de volumen inicial de solución 40% polietilén glicol 8 000 (PEG 8000) con 1 M NaCl, se mezcló suavemente y se incubó a 4°C toda la noche, Los viriones fueron precipitados por centrifugación a 12 000 g a 4°C por 20 min. Las partículas virales precipitadas fueron resuspendidas en 5 mL de solución 10 mM NaOAc pH 5.2. (Gopalan 2007). La cantidad de los viriones purificados fue estimada por ELISA empleando el

anticuerpo α -CP (AGDIA Incorporated Elkhart; Indiana, USA) y la infectividad de las partículas fue probada comparando el tiempo de aparición de síntomas en plantas de *N. tabacum* var. Xanthi inoculadas con diferentes diluciones de partículas virales o extracto crudo de plantas infectadas, y mediante la detección de RNA viral en hojas sistémicas de plantas de *A. thaliana* inoculadas con partículas virales.

6.3 Inoculación viral

Los viriones purificados o el macerado de tejido de plantas infectadas con TEV-TAMPS o TEV-7DA fueron depositados sobre hojas jóvenes de plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestres, *Atelf(iso)4E-1*, *Atelf(iso)4E-2* y C24 silvestres a los 30 días de crecimiento en maceta, procurando dejar una herida sobre la hoja. El punto de inoculación fue lavado con agua destilada después de 2 horas y las plantas fueron mantenidas a 22°C con un fotoperiodo de 8 horas luz por 16 de oscuridad. Las hojas inoculadas (locales) fueron colectadas a 0 y 4 días postinoculación (dpi), y la primera hoja posterior a la inoculada u hojas sistémicas jóvenes fueron colectadas a 4 y 15 dpi respectivamente.

6.4 Extracción de RNA total de *A. thaliana*.

El RNA total se extrajo a partir de 0.15 g de tejido vegetal fresco usando el reactivo Trizol (Invitrogen Corporation; California, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA extraído se sometió a separación electroforética en un gel de agarosa (1%) para comprobar su integridad y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.5 Obtención de RNA polisomal a partir de hojas de *A. thaliana*.

La separación de fracciones polisomales se realizó de acuerdo a (Davies y Abe 1995). Se colectó 1 g de las hojas locales de *A. thaliana* silvestres, *Atelf(iso)4E-1*, *Atelf(iso)4E-2* y C24 (a 4dpi), infectadas con TEV-TAMPS y el tejido se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino que se transfirió a tubos de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de solución amortiguadora de extracción (200 mM Tris- HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 100 µg/mL Heparina, 2% polioxietileno 10 tridecil éter (PTE), 1% Igepal y 0.5 mg/mL cicloheximida), y se

agitó con vórtex. La mezcla se centrifugó a 18 000 *g* por 20 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado, aforado a 4 mL y colocado en un tubo de policarbonato sobre 1 mL de una solución de sacarosa al 60% (40 mM Tris-HCl pH 8.5, 40 mM KAc, 20 mM MgAc, 1.5 M sacarosa, 0.5 mg/mL cicloheximida). Seguidamente, los tubos se centrifugaron a 275 000 *g* en una ultracentrífuga Beckman, rotor 75Ti, por 3 horas a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado fue disgregado en 400 µL de solución amortiguadora de resuspensión (40 mM Tris-HCl pH 8.5, 40 mM KAc, 20 mM MgAc y 0.5 mg/mL Cicloheximida). Esta muestra contenía fracciones ribosomales concentradas que fueron utilizadas en la separación mediante gradiente de densidad. En el caso de experimentos de disociación, se realizó un tratamiento con puromicina al concentrado de ribosomas, agregando solución amortiguadora de GTP (20 mM Tris-HCl pH 8, 400 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 0.5 mM de puromicina) a la pastilla obtenida tras la ultracentrifugación en el colchón de sacarosa al 60% incubando por 45 min a 37°C.

Se preparó un gradiente con dos soluciones de sacarosa (60% y 15% en 40 mM Tris-HCl pH8.5, 40 mM KAc, 20 mM MgAc). Las soluciones fueron colocadas en un tubo, primero la de 60% y enseguida la de 15%, el tubo se selló y se rotó 90° durante 2 horas a temperatura ambiente para permitir la formación de un gradiente continuo. Los 400 µL de concentrado de ribosomas se colocaron sobre el gradiente y se centrifugaron a 250 000 *g* por 1h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman, rotor SW55Ti. Las fracciones del gradiente se colectaron utilizando un fraccionador Auto Densi-flow (Labconco; USA), conectado a un detector de absorbancia a 260 nm Econo UV Monitor Modelo EM-1 (BioRad; USA), acoplado a un graficador LKB 2210 (Pharmacia, Suecia). Las fracciones polisomales se recuperaron mediante un colector de fracciones modelo 2110 (BioRad; USA). Se recuperaron 20 fracciones polisomales de aproximadamente 500 µL que se sometieron a separación electroforética en geles de agarosa (1%). El RNA de cada fracción fue purificado agregando 25 µL de solución de SDS (10%) y 1 µL de proteinasa K (10 mg/mL), esta mezcla se agitó e incubó a 37°C durante 30 min. La mezcla se desproteinizó con 250 µL de fenol saturado con solución amortiguadora TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) y 250 µL de cloroformo-isoamílico (49 : 1), agitando vigorosamente por 15 segundos y centrifugando a 13 000 *g* durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se repitió la extracción fenólica. A la fracción acuosa final se le agregaron 70 µL de LiCl (10 M) y 470 µL de isopropanol

frío, se mezcló e incubó a -20°C por 60 minutos. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 18 000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó por dos ocasiones con etanol al 70% centrifugando a 18 000 g por 5 min a 4°C. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µL de agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC). La integridad del RNA polisomal obtenido se verificó electroforéticamente y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6.6 Amplificación de RNA mediante ensayos de RT-PCR y RT seguido de qPCR.

Previo a las reacciones de reverso transcripción (RT), 5 µg de RNA total fueron tratados con DNasa RQ1 (Promega Corporation Madison, USA) acorde a las indicaciones del fabricante. Las reacciones de RT fueron realizadas a partir de 1 µg de RNA total. La síntesis de cDNA fue llevada a cabo con la enzima M-MLV (Invitrogen Corporation; California, USA), siguiendo las instrucciones del productor y empleando oligo dT como cebador para la síntesis de del cDNA (Tabla 3). En la Tabla 3 se enlistan los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la obtención de cDNA correspondiente a RNA viral con sentido negativo que se genera solo durante la replicación del virus, se empleó el oligonucleótido directo TEV3' en lugar de oligo dT. Las reacciones de PCR fueron realizadas con 100 ng del cDNA obtenido utilizando la enzima Taq-DNA polimerasa (Invitrogen Corporation; California, USA), acorde a las instrucciones del fabricante.

Para las reacciones de PCR cuantitativo (qPCR) se emplearon oligonucleótidos específicos dirigidos a la región 3' del genoma de TEV (qTEVFW y qTEVRV) diseñados mediante la opción "Primer Tools" del programa Geneious (Tabla 3). El factor eEF1α fue usado como un gen control de normalización de la reacción. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo con el kit SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington UK) siguiendo las indicaciones del productor, y analizadas en un aparato 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington UK). La expresión relativa viral fue calculada después de la normalización con el gen de referencia empleando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, representado como veces de cambio con respecto a la cantidad de RNA viral presente en la hoja inoculada dos horas después de la inoculación y lavado correspondiente (0 dpi). La cuantificación del RNA viral distribuido en cada fracción obtenida en

gradientes de sacarosa, fue realizada acorde a Dinkova et al. (2005) y Martínez-Silva (2012), determinando el porcentaje del RNA viral en cada fracción.

6.7 Obtención y análisis de la secuencia del aislamiento mexicano TEV-TAMPS.

Con la finalidad de conocer la secuencia genómica del aislamiento TEV-TAMPS empleado en este estudio, se emplearon oligonucleótidos para amplificar mediante RT-PCR 10 fragmentos del aislamiento TEV-TAMPS (Tabla 3). Los fragmentos amplificados fueron ligados al vector pGEM-TEasy (Promega Corporation Madison, USA) y secuenciados. Las secuencias fueron revisadas mediante los programas de software BioEdit Sequence Alignment Editor para Windows ver. 7.0.9.0, ClustalX2 (Larkin, Blackshields et al. 2007) y <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, bajo los parámetros por omisión de cada programa.

Tabla 3. En *itálicas* se muestran los oligonucleótidos empleados en la obtención del genoma de TEV-TAMPS y en las amplificaciones de RT-PCR y qRT-PCR.

Oligonucleotido	Secuencia 5' → 3'	Fragmento amplificado
<i>TEVVPg5'</i>	CACCATGGGAGGGAAGAAGAATCAG	VPg - Nla 943 pb
<i>TEV13'</i>	CTGACACCATGCTAGACATGC	
<i>TEV25'</i>	GCATGTCTAGCATGGTGTCAG	Nia – Nib 958 pb
<i>TEV23'</i>	AGAGTGTCTATTGGTGCTGC	
<i>TEV35'</i>	CACCAATAGACACTCTTCTTGCTGG	Nib 980 pb
<i>TEV33'</i>	AGCATCCACAGTGCCACTCT	
<i>TEVCP5'</i>	TTTCAGAGTGGCACTGTGGATGC	CP- UTR3' 984 pb
<i>TEVUTR3'</i>	CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC	
<i>TEV55'</i>	AAATGGTTGCCACTGAAGCTGC	CI - 6K2 TEV 968 pb
<i>TEV53'</i>	CGCCTCTCTCATCTTAAGCTTGTG	
<i>TEV65'</i>	TTCTCCGCAATCAGGCATTC	CI TEV 990 pb
<i>TEV63'</i>	ATCCAACAGCACCTCTCAC	
<i>TEV75'</i>	TTCTCCGCAATCAGGCATTC	P3 - CI TEV 943 pb
<i>TEV73'</i>	ATCCAACAGCACCTCTCAC	
<i>TEV85'</i>	CTGGCGATTCAAAGTACC	HC-Pro - P3 979 pb
<i>TEV83'</i>	CGCCCAAATTTCAAGAGC	

TEV95'	CGTTCGCTGTTTGTCACTC	P1 - HC-Pro 1028 pb
TEV93'	GAGAACTGGAAGGTCTAG	
TEV105'	CGAATCTCAAGCAATCAAGC	
TEV103'	GGGAGATTCCATCTGGTCTC	UTR5'-P1 1098 pb
qTEV Fw	ACGGCACACAGCGCACGA	CP-UTR3' 89 pb
qTEV Rv	AGCGGAAAGCAAAGACACGCAGA	
eEF1a Fw	CACATCAACATTGTGGTCATTGG	
eEF1a Rv	GCAGTAGTACTTGGTGGTCTC	eEF1α 243 pb
18S Fw	GGAAACTTACCAGGTCCAGACATAG	18S rRNA 240 pb
18S Rv	GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC	
Oligo dT	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	

Las secuencias codificantes para las proteínas VPg y CP del aislamiento TEV-TAMPS fueron traducidas *in silico* para realizar análisis filogenéticos usando secuencias de diferentes aislamientos de TEV disponibles en GenBank. Para algunos de estos aislamientos se conocía la susceptibilidad al mecanismo RTM en *A. thaliana* Col-0: DQ986288, M11458 (llamado TEV-HAT por ser altamente transmitido por áfidos), NC_001555, M15239, L38714, EU334787, mientras que para otros no se sabía se eran susceptibles a RTM (EU334790, EU334791, EU334792, EU334793, EU334794, EU334788, EU334789). Los análisis filogenéticos fueron hecho con el software MrBayes v3.1.2 disponible en Internet empleando el modelo de sustitución de aminoácidos JTT (Jones, Taylor et al. 1992), se ejecutaron 2,000,000 de generaciones, una frecuencia de muestreo de 50 y 2 cadenas para cada árbol. La convergencia fue considerada cuando el valor de desviación estándar de división de frecuencias se mantuvo por debajo de 0.01.

6.8 Extracción de proteína total y análisis mediante ensayos de western blot y ELISA.

Extractos proteínicos totales fueron preparados a partir de 500 mg de tejido vegetal fresco, se molió con mortero y pistilo agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El que fue transferido a tubos de 1.5 mL donde se agregó 1 mL de solución amortiguadora de extracción (200 mM tris- HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2% PTE, 1% Igepal, 1 mM DTT, y 1 mM ortovanadato), se agitó vigorosamente por 15 segundos y el homogeneizado fue

centrifugado por 5 minutos a 12 000 *g* a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y la concentración de proteína fue determinada por ensayos de Bradford (Bio-Rad) usando albúmina sérica de bovino como estándar. Cinco microgramos de proteína total fueron resueltos en geles de SDS-PAGE 12% y teñidos con azul de Coomassie.

Para el análisis por western blot, las proteínas separadas en geles SDS-PAGE fueron transferidas a una membrana PVDF Immobilon-P-Transfer (Millipore Corporation; Bedford MA, USA). La membrana fue re-hidratada en metanol por 10 segundos. Posteriormente fue bloqueada con una solución de PBS 1X que contenía 5% de leche y 0.1% Tween 20 durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó rápidamente por dos ocasiones con Buffer PBS 1X, 0.1% Tween 20 y se agregó el primer anticuerpo con el que se mantuvo en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos α -eIF4E y α -eIF(iso)4E de *A. thaliana* fueron donados por la Dra. Karen Browning del departamento de Química y Bioquímica de la Universidad de Austin, Texas; ambos fueron usados en una dilución 1:10 000. El anticuerpo α -eEF1B β (Agrisera AB; Vannas, Sweden) fue empleado a dilución 1:5 000, el anticuerpo α -Nla (Dr. W. Dougherty) se empleó en una dilución 1:15 000 y el anticuerpo α -CP de TEV (AGDIA) se usó en una dilución 1:10 000. Posteriormente se retiró el primer anticuerpo y la membrana fue lavada tres veces por 15 minutos con PBS 1X, 0.1% Tween 20. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado mediante el anticuerpo secundario α -conejo acoplado con peroxidasa con el que se incubó en agitación por 1 h a temperatura ambiente. Se retiró el segundo anticuerpo y la membrana se lavó tres veces por 15 minutos con PBS 1X, 0.1% Tween 20. Finalmente la membrana fue revelada con quimioluminiscencia (Immobilon Western Millipore; Bedford MA, USA) y expuesta a placas fotográficas Kodak.

Para los ensayos de ELISA, 100 μ g de proteína total obtenida de hojas sistémicas de plantas de *A. thaliana* inoculadas con TEV-TAMPS o TEV-7DA (15 dpi) fueron incubados con el anticuerpo de inmunocaptura α -CP (AGDIA) en una dilución 1:5 000, durante 8 horas a 4°C. Como anticuerpo secundario se usó el α -conejo IgG acoplado a la fosfatasa alcalina en una dilución 1:1 000. La actividad de la fosfatasa alcalina fue estimada a 450 nm empleando NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) y BCIP (sal de p-toluidina 5-Bromo-4-chloro-3'-indoliphosfato) en solución

amortiguadora de carbonato (0.1 M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂ pH 9.8) como sustrato.

6.9 Experimentos de co-inmunoprecipitación.

Con la finalidad de determinar interacciones entre el factor de inicio de la traducción eIF(iso)4E y proteínas virales, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación. Se tomaron 3 g de hojas locales de plantas infectadas con TEV-TAMPS a 4 dpi, los cuales fueron pulverizados en nitrógeno líquido y mezclados con solución amortiguadora de extracción (200 mM Tris- HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 100 µg/mL heparina, 2% PTE, 1% Igepal y 5 µg/mL cicloheximida, 1 mM DTT and 1 mM ortovanadato). Los ensayos de inmunoprecipitación fueron llevados a cabo acorde a Peritz et al. (2006) usando Proteína A – Agarosa (Millipore, Bedford MA, USA), y los anticuerpos αeIF(iso)4E, α-CP-TEV o α-eIF4E a una dilución 1:1 000. Los extractos de proteína total y los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados por ensayos de western blot con anticuerpos contra diferentes proteínas.

7. RESULTADOS

7.1 Un aislamiento mexicano de *virus del jaspeado del tabaco* (TEV-TAMPS) evita la respuesta de resistencia RTM en *A. thaliana* ecotipo Col-0, pero requiere de eIF(iso)4E para su diseminación sistémica.

En éste trabajo se utilizó un aislamiento mexicano de TEV (TEV-TAMPS) para el cual se había determinado previamente que era capaz de sobrepasar el mecanismo de resistencia RTM (Contreras-Paredes 2008) reportado para *A. thaliana* ecotipo Col-0 (Mahajan, Chisholm et al. 1998, Chisholm, Parra et al. 2001, Cosson, Sofer et al. 2010). Para confirmar estos resultados se realizó la detección de RNA viral en hojas locales a 0 y 4 dpi, así como a 4 y 15 dpi en hojas sistémicas de *A. thaliana* Col-0 silvestre, mutante nula [(iso)4E1], sobreexpresora [(iso)4E2] de eIF(iso)4E y del ecotipo C24 inoculadas con extracto crudo de *N. tabacum* infectada (Figura 5A). Los resultados indicaron que TEV-TAMPS es capaz de diseminarse sistémicamente en Col-0 de forma similar que en C24, pero no en la mutante (iso)4E1, donde solo se detectó en la hoja inoculada a 4 dpi. Como control de carga se amplificó un fragmento de la unidad α del factor de elongación de la traducción 1 (eEF1 α). El resultado anterior fue consistente con la detección de CP por ensayos de ELISA en hojas sistémicas de *A. thaliana* Col-0 a 15 dpi (Figura 5B), encontrándose a TEV-TAMPS en más de un 95% de plantas inoculadas. Por otra parte, el aislamiento TEV-7DA, cuya capacidad de diseminación sistémica es restringida por RTM en el ecotipo Col-0, se detectó en hojas sistémicas solo en un 5% de las plantas que fueron inoculadas.

Estos resultados sugieren una diferencia en la capacidad de respuesta viral ante el mecanismo de resistencia RTM descrito para *A. thaliana* ecotipo Col-0 por parte del aislamiento TEV-TAMPS y proponen un rol para eIF(iso)4E en la infección por TEV.

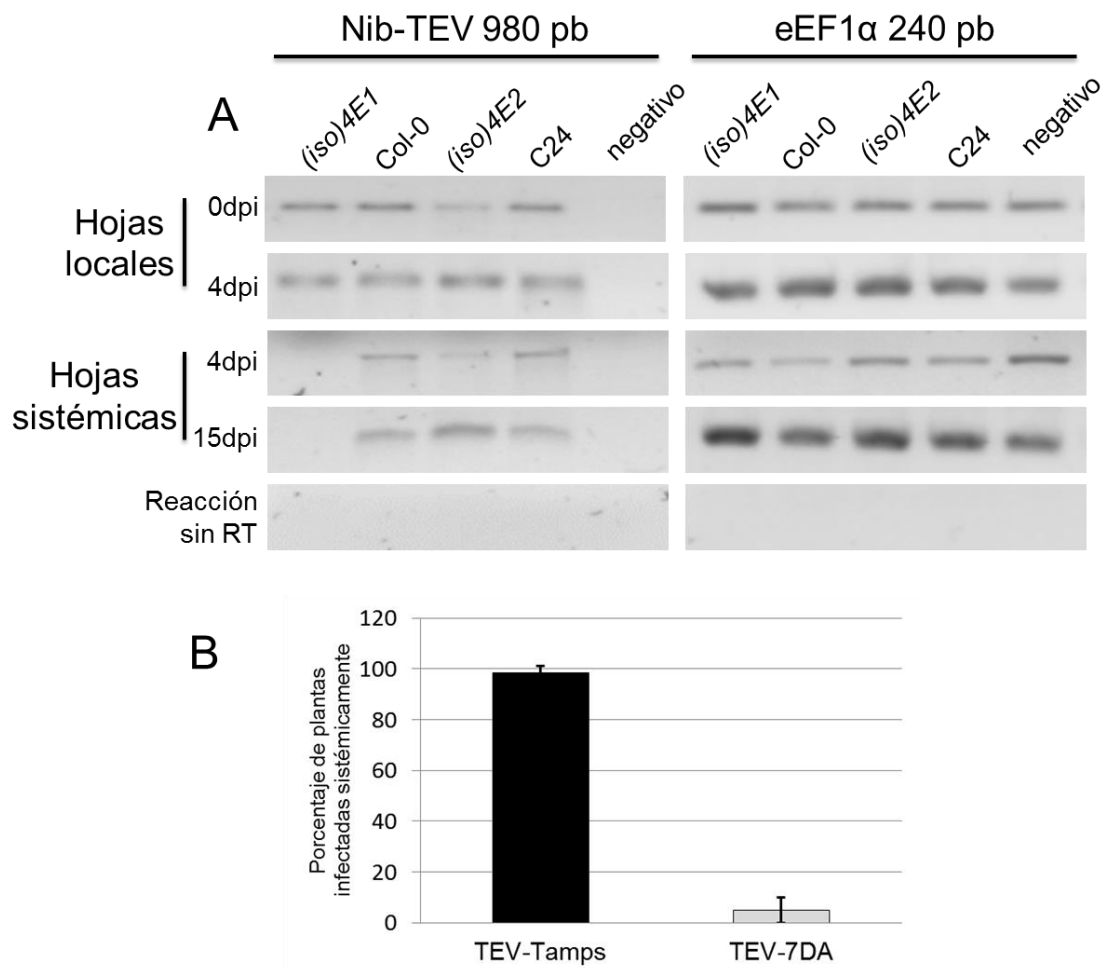


Figura 5. A) Detección de TEV-TAMPS mediante RT-PCR en hojas locales (0 y 4 dpi) y hojas sistémicas (4 y 15 dpi) de *A. thaliana* Col-0 silvestres, líneas [(iso)4E1], [(iso)4E2], y ecotipo C24. Se amplificó la unidad α del factor de elongación de la traducción 1 (eEF1 α) como control de carga. B) Porcentaje de plantas Col-0 sistémicamente infectadas con los aislamientos de TEV-TAMPS y TEV-7DA acorde a ensayo de ELISA contra CP de TEV. Se realizaron tres replicas biológicas con lotes de 20 plantas.

7.2 Análisis de las secuencias de aminoácidos de las proteínas VPg y CP de TEV-TAMPS.

Dado que la secuencia del genoma del aislamiento TEV-TAMPS no se conocía, en este trabajo se amplificaron y clonaron diez fragmentos de su genoma que incluyeron 107 nucleótidos de la región 5' UTR, el marco de lectura abierto de TEV y 164 nucleótidos de la región 3' UTR, los cuales se secuenciaron, revisaron, ordenaron y compararon a nivel de aminoácidos y nucleótidos en el GeneBank. El porcentaje de similitud y de identidad encontrados fueron mayores al 90% con los

aislamientos US_7DA _DQ986288 (TEV-7DA), US_HAT_M11458 (TEV-HAT) y US_NW_L38714 con valores de expectativa de 0.

Las secuencias de VPg y CP de TEV-TAMPS fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso MX_JX512812_TAMPS y MX_JX512813_TAMPS respectivamente.

Se ha reportado que el mecanismo de restricción del movimiento de TEV mediado por las proteínas RTM puede ser superado por la pérdida de interacción entre las proteínas RTM o cambios en algún componente viral comprometido en el movimiento (Decroocq, Salvador et al. 2009). Dado que por una parte se ha reportado que las proteínas VPg y CP son necesarias para la diseminación viral, y por otra son las proteínas de TEV para las cuales se cuenta con mayor número de secuencias depositadas en GenBank correspondientes a diferentes aislamientos, se realizaron comparaciones de secuencia de aminoácidos para VPg y CP como un primer acercamiento para entender por qué el aislamiento TEV-TAMPS puede sobrepasar la resistencia RTM.

El alineamiento múltiple realizado con las secuencias VPg mostró una identidad superior al 94% de la secuencia de aminoácidos de TEV-TAMPS con respecto a las secuencias de otros aislamientos, siendo la región carboxilo terminal la más variable (Figura 6). Este alineamiento muestra muy conservada la región con la que se lleva a cabo la interacción con los miembros de la familia eIF4E, 4 cambios en los aminoácidos de la región 107 a 120 que se comparten con los aislamientos mexicanos MX_MEX1_EU334789, MX_MEX3_EU334788 y que son distintos con respecto a los aislamientos cuyo movimiento es afectado por el mecanismo de resistencia viral mediante RTM de *A. thaliana* ecotipo Col-0. También se encontraron en TEV-TAMPS 4 cambios en la región 174 a 186 con respecto a TEV-7DA.

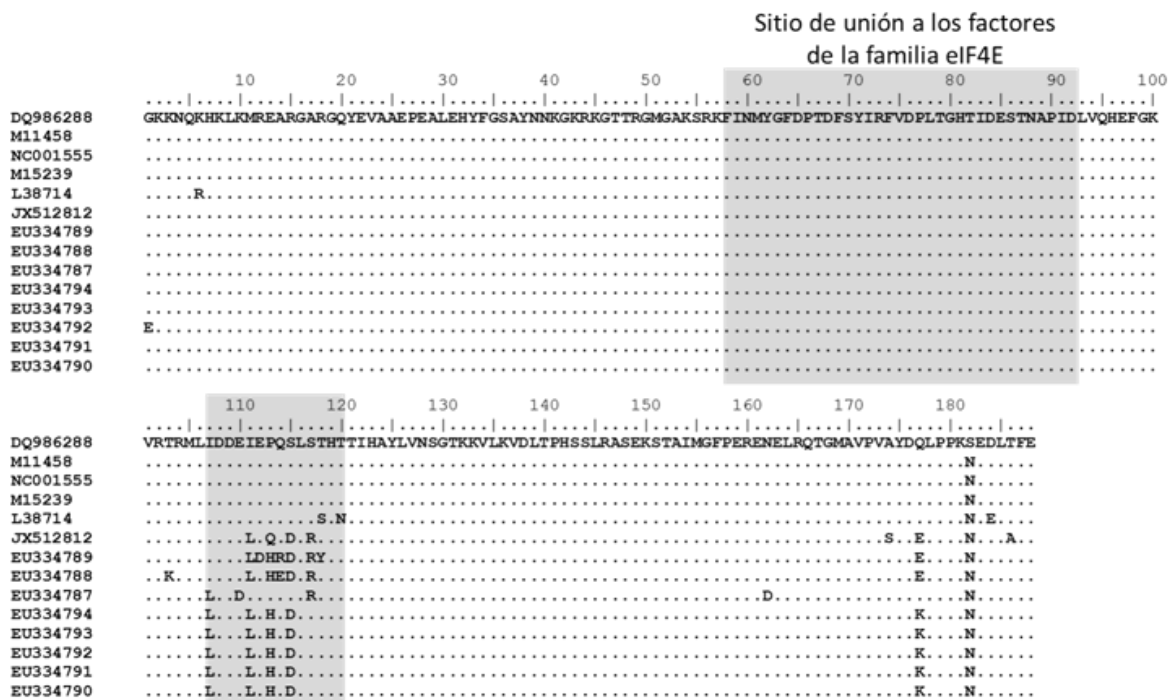


Figura 6. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de la proteína VPg de diferentes aislamientos de TEV. En recuadros grises se muestra la región conservada de interacción con miembros de la familia eIF4E y la región más variable entre las proteínas de los distintos aislamientos. JX512812 corresponde al acceso de TEV-TAMPS, mientras que DQ986288 corresponde a TEV-7DA.

Por otra parte, el alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos correspondientes a proteínas CP de aislamientos de TEV disponibles mostró un 90% de identidad entre las diferentes secuencias (Figura 7), presentando mayor variabilidad en la región amino terminal, cerca del motivo DAG indispensable para la transmisión por áfidos y el movimiento célula a célula.

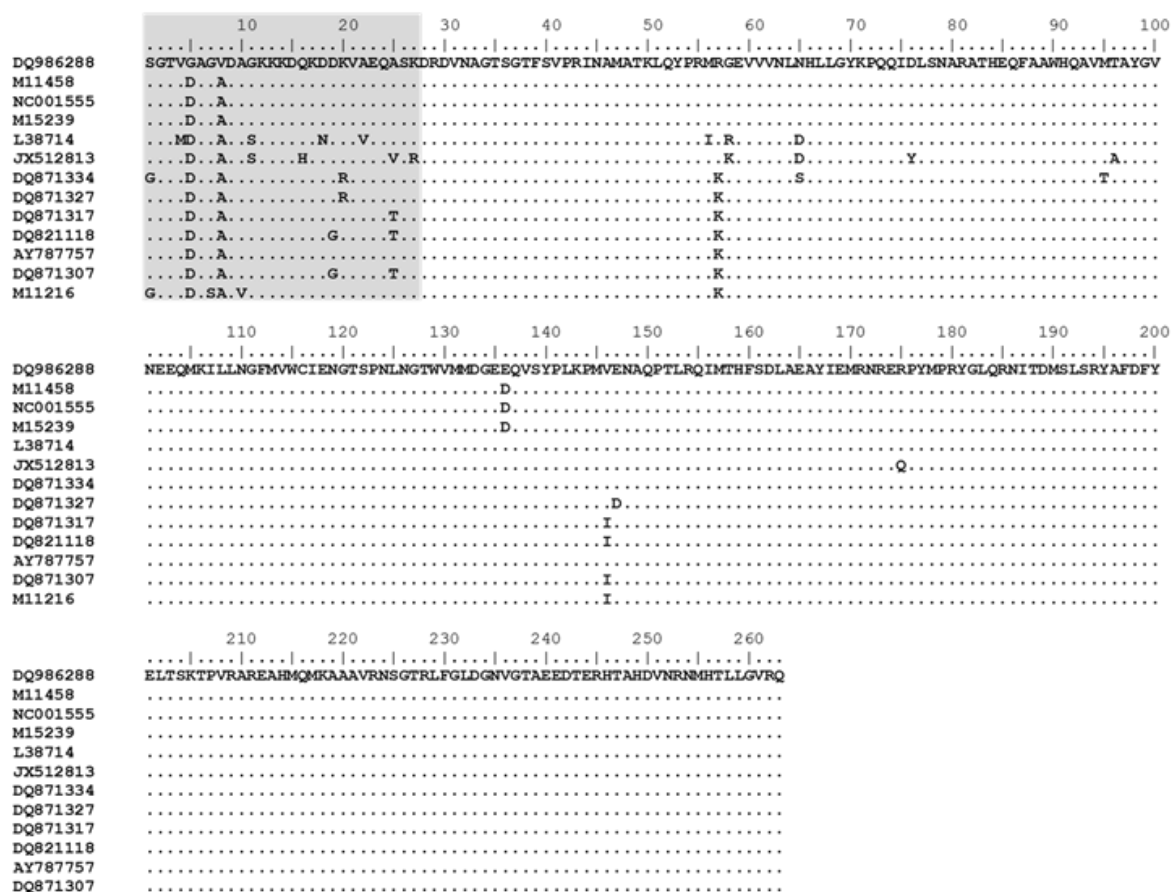


Figura 7. Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas CP de diferentes aislamientos de TEV; la zona sombreada muestra la región más variable entre las secuencias.

Con la finalidad de apreciar la divergencia existente entre los aislamientos comparados en los alineamientos múltiples mostrados anteriormente, se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias CP y VPg.

La topología del árbol hecho con las secuencias VPg (Figura 8A), mostró la formación de tres grupos; TEV-TAMPS se ubicó en el grupo 1 junto con los aislamientos mexicanos MX_MEX1_EU334789 y MX_MEX3_EU334788, mientras que el aislamiento TEV-7DA se agrupó en el grupo 3 junto con aislamientos reportados como susceptibles al mecanismo de resistencia por RTM. En el árbol se muestra un grupo que incluye otros aislamientos mexicanos para los cuales no se ha evaluado la capacidad de diseminarse sistémicamente en *A. thaliana* Col-0 (grupo 2).

Por otra parte, en el árbol construido en base a las secuencias de aminoácidos de CP (Figura 8B), se observó una gran consistencia el agrupamiento de los aislamientos que son afectados por el mecanismo de restricción del movimiento RTM (grupo 2) con respecto al árbol basado en las secuencias de VPg. La topología del árbol inferido con las secuencias CP muestra al aislamiento TEV-TAMPS en una rama separada de los aislamientos afectados por RTM en el ecotipo Col-0, aunque sugiere su agrupamiento con el aislamiento US_NW_L38714 que en los árboles hechos con las secuencias VPg se agrupa con los aislamientos afectados por el mecanismo RTM.

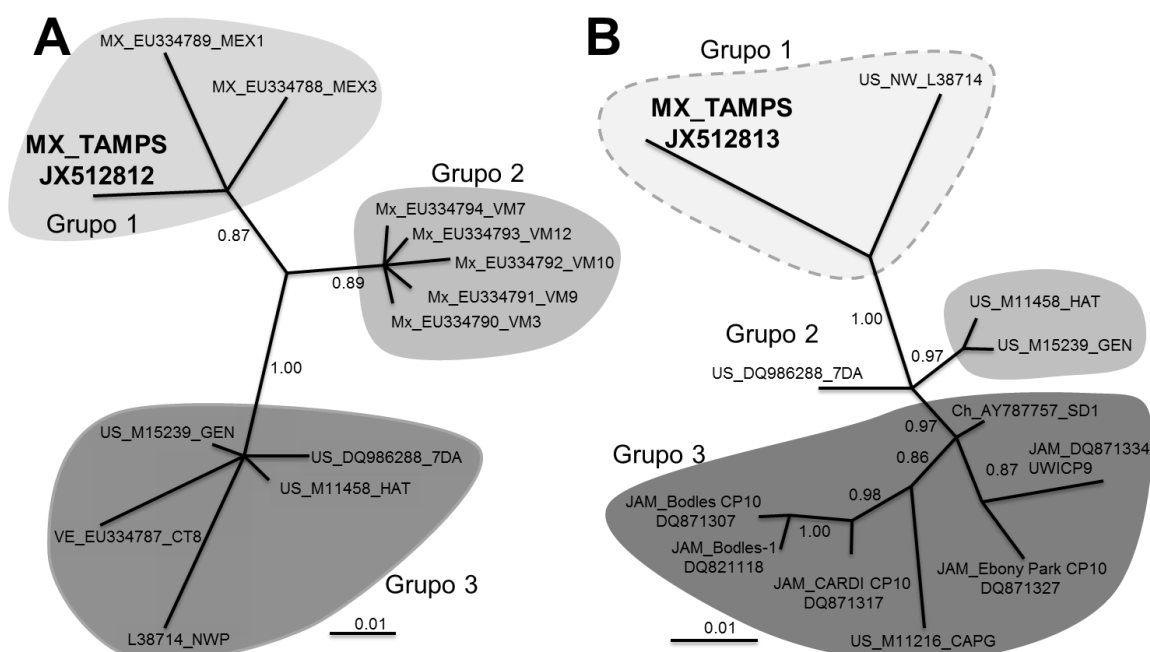


Figura 8. Árboles filogenéticos construidos a partir de secuencias VPg (A) y CP (B) de diversos aislamientos de TEV. En ambos se muestra a TEV-TAMP alejado de los aislamientos que sin afectados por el mecanismo de resistencia RTM.

7.3 eIF(iso)4E no es requerido para la acumulación de TEV-TAMPS en *A. thaliana* Col-0.

eIF(iso)4E ha sido considerado como un factor de resistencia viral recesiva. Aunque no se ha podido dilucidar su función específica en el ciclo viral, se han planteado algunos roles hipotéticos durante la infección viral tales como su participación en la estabilidad del RNA viral, la asistencia en el movimiento viral y

en la traducción del mensajero viral (Duprat, Caranta et al. 2002, Lellis, Kasschau et al. 2002, Robaglia y Caranta 2006, Rantalainen, Eskelin et al. 2011). En este estudio se analizó el efecto que podría tener la ausencia de eIF(iso)4E durante la infección por TEV en el sistema *Arabidopsis* Col-0 - TEV-TAMPS.

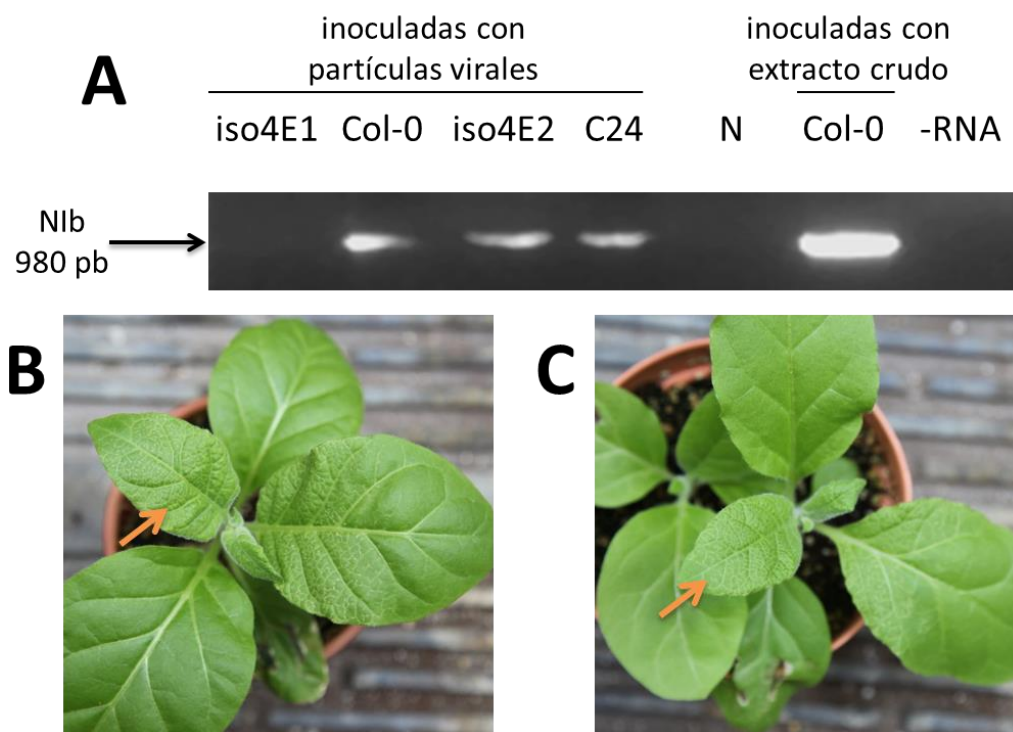


Figura 9. A) Detección de TEV-TAMPS por RT-PCR en hojas sistémicas de *A. thaliana* inoculadas con viriones purificados (4dpi) en plantas Col-0 silvestres, (*iso*)4E1 (mutante nula), (*iso*)4E2 (sobrexpresora) y C24. Para el control negativo (N), se tomaron hojas de plantas inoculadas con solución amortiguadora de resuspensión de partículas virales y para el positivo, plantas Col-0 silvestres inoculadas con extracto crudo de plantas de tabaco infectadas. Se amplificó mediante RT-PCR un fragmento codificante para la proteína Nlb de TEV-TAMPS. Síntomas producidos por la infección de B) TEV-7DA y C) TEV-TAMPS en *N. tabacum* var. Xanthi a 8 dpi.

Se purificaron parcialmente viriones de TEV-TAMPS y se corroboró que las partículas obtenidas fuesen infecciosas, se inocularon 5 plantas de tabaco, de las cuales 3/5 mostraron síntomas característicos de infección por TEV a 8 dpi (Figura 9B y C). Paralelamente se inocularon plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestres, mutantes *eIF(iso)4E1*, *eIF(iso)4E2* y C24 silvestres. A 4 dpi se extrajo el RNA total de hojas sistémicas y mediante RT-PCR se detectó la presencia de RNA viral en

las líneas silvestres Col-0, C24 y que sobreexpresan eIF(iso)4E pero no en plantas *eIF(iso)4E-1* que no expresan eIF(iso)4E (Figura 9A).

Tomando en cuenta el resultado anterior, se inoculó con viriones purificados plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestres, *(iso)4E1* (mutante nula) *(iso)4E2* (sobreexpresora) y se extrajo RNA total de hojas locales a 0 y 4 dpi y de hojas sistémicas a 4 y 15 dpi. Mediante qRT-PCR se determinó la presencia del RNA de sentido positivo de TEV-TAMPS en todas las muestras (Figura 10). A 4 dpi en hojas locales se observó una mayor cantidad de RNA viral en plantas silvestres y mutantes *(iso)4E2* con respecto a la cantidad de RNA inoculado (0 dpi). Como se mostró anteriormente, la ausencia de eIF(iso)4E afectó el movimiento sistémico viral, ya que no se detectó RNA viral a nivel de hojas sistémicas. Sin embargo, a nivel local en esta mutante se detectó RNA a niveles similares a los inoculados, aunque menores a los observados en las plantas silvestres o sobreexpresoras del factor. Estos datos sugieren de manera indirecta que la estabilidad y acumulación del RNA viral en *A. thaliana* Col-0 a nivel local no se ve afectada por la ausencia de eIF(iso)4E.

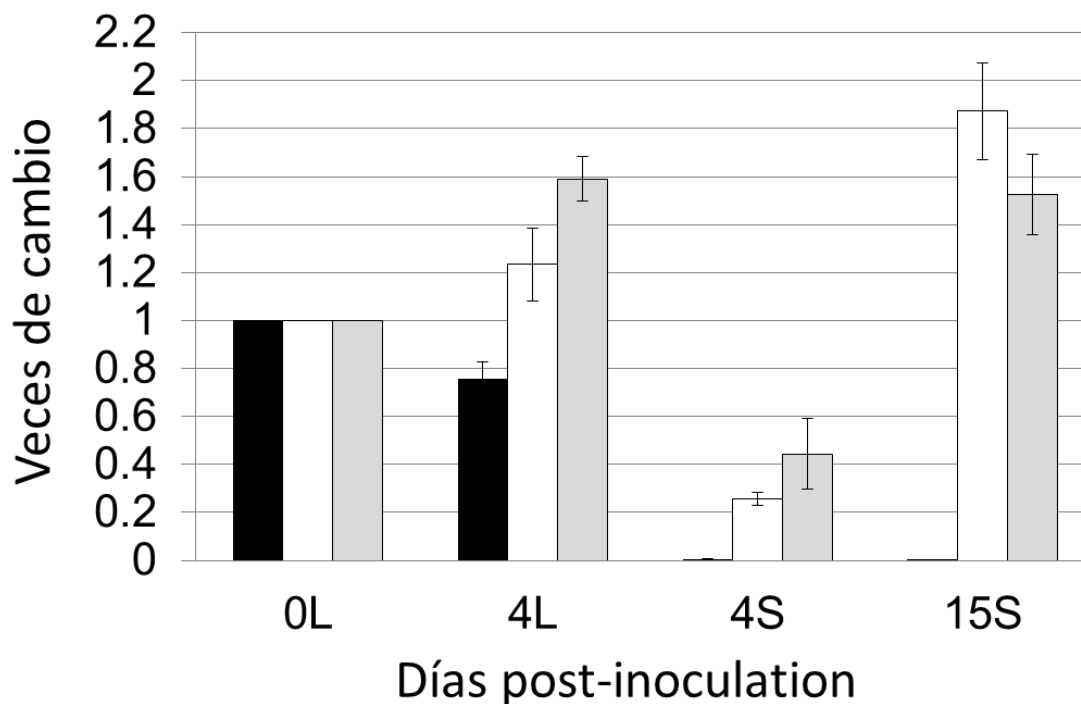


Figura 10. Análisis cuantitativo mediante qRT-PCR de la acumulación de RNA de sentido positivo de TEV-TAMPS en *A. thaliana* Col-0 mutante *(iso)4E1* (barras negras), silvestres (barras blancas) mutante *(iso)4E2* (barras grises) en hojas locales (L) a 0 y 4 dpi, y hojas sistémicas (S) a 4 y 15 dpi. Se graficó el nivel relativo de cambio en la cantidad de RNA viral tomando como valor 1 la cantidad inoculada en forma de viriones. Los valores fueron normalizados por los niveles del factor eEF1 α .

Para confirmar que la ausencia de eIF(*iso*)4E no afecta la acumulación o la estabilidad viral pero si el movimiento de TEV-TAMPS en *A. thaliana*, se extrajo la proteína total de hojas locales y sistémicas de plantas Col-0 silvestres, mutante nula y sobreexpresora de eIF(*iso*)4E, y se detectó por western blot la presencia de CP de TEV (Figura 11). Mediante este ensayo se pudo detectar a la proteína viral en hojas locales a 0 y 4 dpi, mientras que en las hojas sistémicas de plantas carentes de eIF(*iso*)4E, la proteína viral estaba ausente, contrario a lo observado en el resto de las líneas de plantas. Además, se observó que la cantidad de proteína viral incrementa conforme pasa el tiempo de infección, lo que sugiere que la traducción viral parece ser independiente de eIF(*iso*)4E. Estos datos apoyan la idea de que el movimiento de TEV-TAMPS (a nivel de RNA o de proteínas) es afectado por la ausencia de eIF(*iso*)4E.

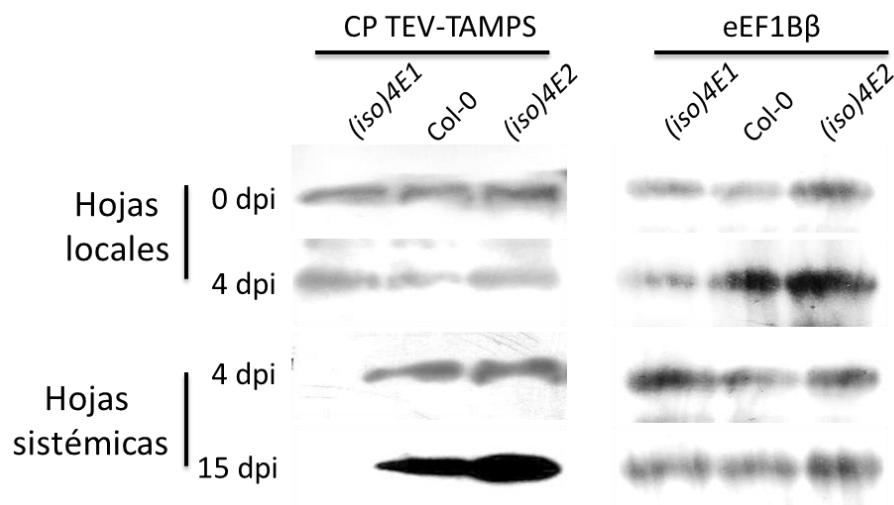


Figura 11. A la izquierda se muestra la detección por western blot de la proteína CP de TEV en hojas locales a 0 y 4 dpi, y sistémicas a 4 y 15 dpi en *A. thaliana* Col-0, mutante nula *(iso)4E1*, silvestre y mutante sobreexpresora *(iso)4E-2*. Del lado derecho se muestra la detección por western blot del factor eEF1Bβ usado como control de carga para las mismas membranas.

Tomando en cuenta que durante la replicación de TEV existe un RNA con sentido negativo intermediario en la síntesis de nuevas cadenas virales, y que se ha evidenciado la presencia de algunos factores de inicio de la traducción en complejos asociados a la replicación de algunos *Potyvirus* (Cotton, Grangeon et al. 2009), se cuantificó la cantidad de RNA con sentido negativo de TEV-TAMPS con la finalidad de determinar si la ausencia de eIF(iso)4E afecta la replicación viral. Dado que las plantas se inocularon con partículas virales parcialmente purificadas, se consideró como basal la presencia de intermediarios negativos a tiempo 0, por lo que los datos obtenidos para los tiempos 4 y 15 dpi, fueron referidos como veces de cambio con respecto a 0 dpi considerado como 1 (Figura 12). Todos los valores fueron normalizados por el qRT-PCR de eEF1α. Con base en este análisis se observó que eIF(iso)4E no es imprescindible para la replicación de RNA de TEV-TAMPS a nivel local, al no haber cambio significativo entre los niveles de RNA detectados en plantas silvestres y mutantes carentes de eIF(iso)4E. Sin embargo, se distingue un incremento de RNA con sentido negativo en las plantas sobreexpresoras de dicho factor a nivel local y sistémico (Figura 12).

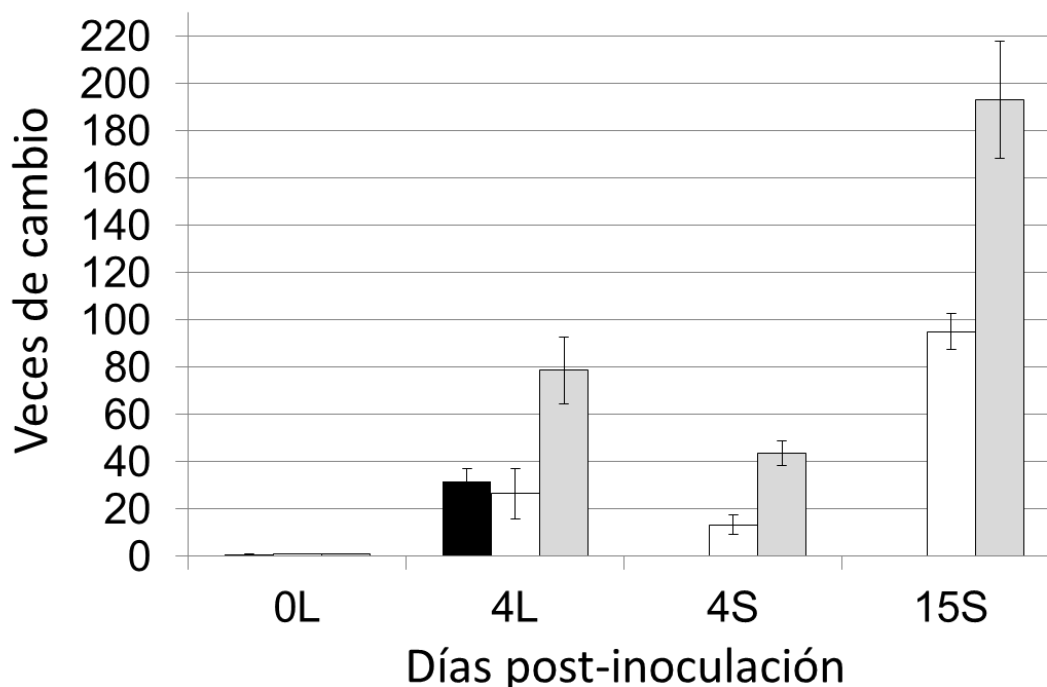


Figura 12. Análisis cuantitativo de la acumulación de RNA viral con sentido negativo en *A. thaliana* Col-0 mutante (*iso*)4E1 (barras negras), silvestres (barras blancas) mutante (*iso*)4E2 (barras grises) en hojas locales (L) a 0 y 4 dpi, y hojas sistémicas (S) a 4 y 15 dpi. Se graficaron niveles relativos de veces cambio de la cantidad de RNA de sentido negativo con respecto a 0 dpi que fue considerado como 1. Todos los valores fueron normalizados por los niveles del factor eEF1 α .

7.4 Evaluación de la eficiencia de traducción del RNA de TEV-TAMPS en ausencia de eIF(*iso*)4E en *A. thaliana*.

eIF(*iso*)4E reconoce el *cap* de los mRNA, permitiendo el ensamble del complejo de inicio de la traducción. Debido a la interacción de eIF(*iso*)4E con VPg presente en el extremo 5' de los *Potyvirus*, se ha sugerido que su rol podría ser mediar la traducción del RNA viral directamente o inhibir la traducción celular mediante el secuestro de este factor (Khan, Miyoshi et al. 2008, Eskelin, Hafren et al. 2011). En este trabajo se evaluaron, mediante la separación de polisomas en gradientes de sacarosa, los niveles de traducción del RNA viral en hojas locales de *A. thaliana* Col-0 silvestres, mutante nula y la sobreexpresora de eIF(*iso*)4E a 4 dpi. En la figura 13A se muestran los perfiles polisomales y el RNA separado en geles de agarosa presente en las fracciones obtenidas. El RNA viral de las fracciones

señaladas con un asterisco fue cuantificado por qRT-PCR (este experimento fue realizado por triplicado), la figura 13B muestra la distribución del RNA de TEV-TAMPS a lo largo del perfil polisomal en cada línea de plantas. Se observó que el RNA viral está presente en fracciones polisomales o de traducción activa en todas las plantas, lo que sugiere que la traducción del RNA viral puede prescindir de eIF(iso)4E y ser soportada por otro mecanismo u otro factor de inicio de la traducción de la familia eIF4E.

Para el mismo análisis de fracciones polisomales se cuantificó la distribución del mRNA correspondiente a eEF1 α en las tres líneas de plantas. En todos los casos, este mRNA estaba distribuido hacia las fracciones polisomales o traduccionalmente activas, ya que este es un gen de expresión constitutiva (Figura 13C). Esta observación también indicó que durante la infección con TEV-TAMPS no necesariamente se utiliza eIF(iso)4E como mecanismo de inhibición para la traducción celular.

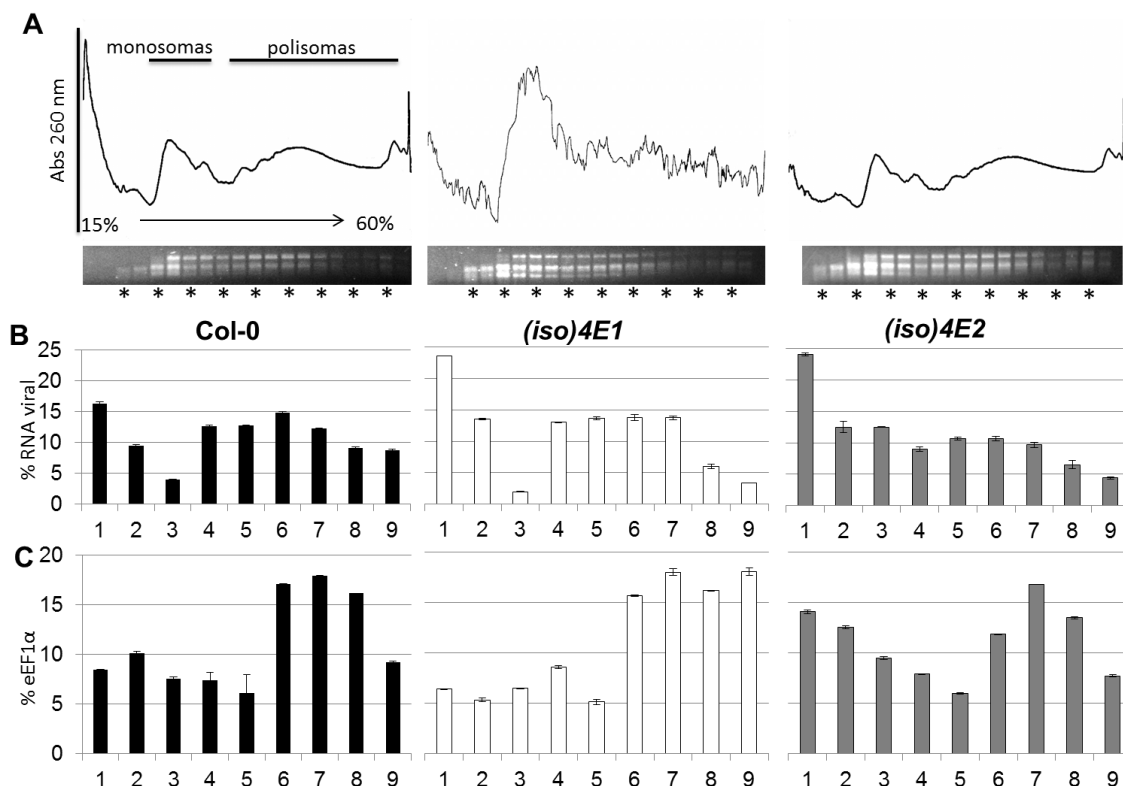


Figura 13. Distribución del RNA viral a través de un gradiente de sacarosa. A) Se muestran los perfiles polisomales obtenidos a partir de plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestres, *(iso)4E1* (mutante nula) e *(iso)4E2* (sobreeexpresora) a 4 dpi con TEV-TAMPS, se indican los monosomas como las fracciones donde la traducción de RNAs es baja y polisomas como las fracciones traduccionalmente activas. El RNA de cada fracción fu separado por electroforesis en gel de agarosa. Las fracciones marcadas con asterisco fueron tomadas para los experimentos de qRT-PCR B) Se muestra la cantidad porcentual de RNA viral distribuido en cada fracción polisomal. C) Se muestra la cantidad porcentual del RNA de eEF1α usado como control de traducción en el ensayo.

Para descartar la posibilidad de que la distribución de RNA de TEV-TAMPS observada en los gradientes de sacarosa fuese debida a algún tipo de forma encapsidada o parcialmente encapsidada de los viriones que co-migrara en fracciones de alta densidad, se realizó un experimento en presencia de puromicina que disocia a las dos subunidades ribosomales e inhibe la traducción pero no afecta la formación de partículas virales. Para esto, se obtuvieron los perfiles polisomales de hojas locales de plantas de *N. tabacum* a 4 dpi con TEV-TAMPS agregando puromicina al concentrado de ribosomas con la finalidad de inducir la disociación de los ribosomas y desensamble de los complejos polisomales. Los

ensayos de RT-PCR para amplificar un fragmento codificante para la proteína Nib de TEV-TAMPS, mostraron al RNA viral desplazado hacia fracciones no traduccionales en presencia de puromicina (Figura 14), de manera similar a un RNA ribosomal (18S) y contrario a lo que se observó en presencia de cicloheximida para mantener unidos a los ribosomas en presencia del RNA que está siendo traducido.

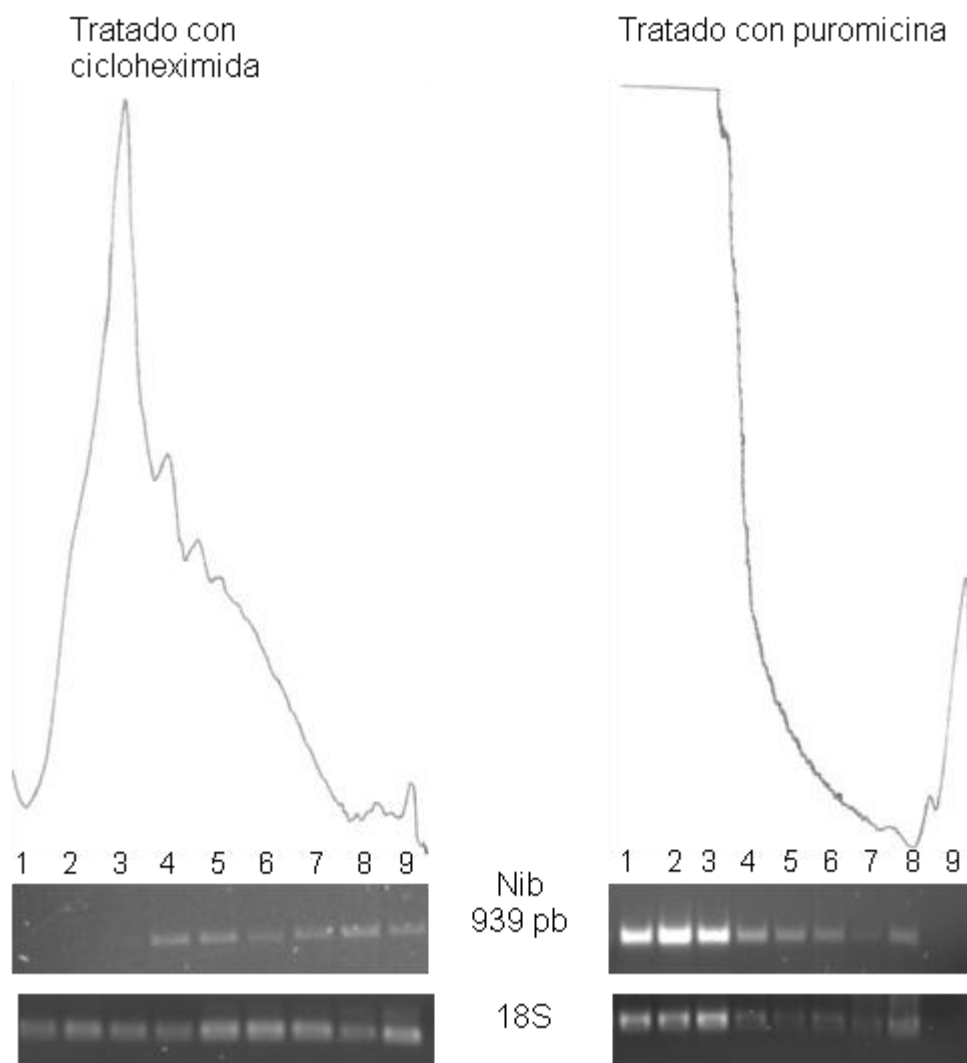


Figura 14. Efecto de la asociación/disociación de ribosomas sobre la distribución polisomal de TEV-TAMPS. (Izquierda) Efecto de la cicloheximida en el perfil polisomal de hojas de tabaco infectadas con TEV-TAMPS (4 dpi). (Derecha) Perfil polisomal de hojas de tabaco infectada con TEV-TAMPS (4 dpi) obtenido en presencia de puromicina.

7.5 VPg y CP de TEV-TAMPS se asocian en complejos con eIF(iso)4E *in planta*.

La interacción de eIF(iso)4E con proteínas virales ha sido estudiada fundamentalmente *in vitro* o por ensayos de co-localización mediante proteínas de fusión con etiquetas fluorescentes. Sin embargo, aún no se ha esclarecido completamente la formación de complejos entre este factor celular y las proteínas virales o la función de estos en el ciclo infectivo. En este trabajo se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación sin hacer tratamiento con RNasa usando anticuerpos α -eIF(iso)4E α -CP y α -eIF4E para determinar *in planta* los complejos que se están formando durante el proceso de infección con TEV-TAMPS. El producto de las inmunoprecipitaciones fue separado electroforéticamente en geles de SDS-PAGE y mediante western blot se detectó la presencia de eIF(iso)4E, eIF4E y las proteínas virales CP y NIa (precursor de VPg) en hojas locales de plantas de *A. thaliana* Col-0 silvestres, *(iso)4E-1* (mutante nula) e *(iso)4E-2* (sobrexpresora) a 4 dpi (Figura 15). Al realizar la inmunoprecipitación de eIF(iso)4E, se corroboró la ausencia de éste en las mutantes nulas, sin embargo, se observó la co-inmunoprecipitación de las proteínas virales CP y NIa con este factor en plantas silvestres y sobreexpresoras, aunque no se descarta la posibilidad de que estas interacciones sean mediadas por RNA. En estos complejos no se detectó eIF4E indicando que el anticuerpo usado presenta afinidad sólo por eIF(iso)4E. Por otra parte, entre las proteínas que co-inmunoprecipitaron con la proteína viral CP, se detectó a eIF(iso)4E y NIa en plantas silvestres y sobreexpresoras de eIF(iso)4E, confirmando la formación del mismo complejo. Finalmente al realizar el ensayo empleando como anticuerpo α -eIF4E, se pudo evidenciar que junto con el factor eIF4E co-inmunoprecipitaba solo la proteína NIa pero no CP ni eIF(iso)4E. Este resultado es congruente con datos previamente reportados (Beauchemin, Boutet et al. 2007, Roudet-Tavert, Michon et al. 2007, Charron, Nicolai et al. 2008), y sugiere la formación de otro complejo proteico entre eIF4E y NIa cuya función podría ser distinta al complejo formado por eIF(iso)4E, CP y NIa. Es necesario aclarar que las dos proteínas detectadas en el western blot por el anticuerpo α -NIa corresponden a VPg (la de menor tamaño) y la segunda podría ser un precursor de esta proteína, dado que se ha reportado que durante la maduración de VPg se pueden encontrar varios precursores tales como VPg, VPg-Pro, 6K-VPg-Pro (Beauchemin, Boutet et al. 2007)

Dado que se ha reportado que chaperonas podrían estar asistiendo los complejos formados entre factores celulares y proteínas virales, se detectó la presencia de la chaperona HSP70 en las reacciones de inmunoprecipitación anteriormente descritas. Se observó que HSP70 co-inmunoprecipitó con las proteínas CP y eIF4E por separado en hojas locales de las tres líneas de plantas de *A. thaliana*, indicando que presencia de la misma en los complejos proteicos no depende de eIF(iso)4E pero posiblemente de RNA.

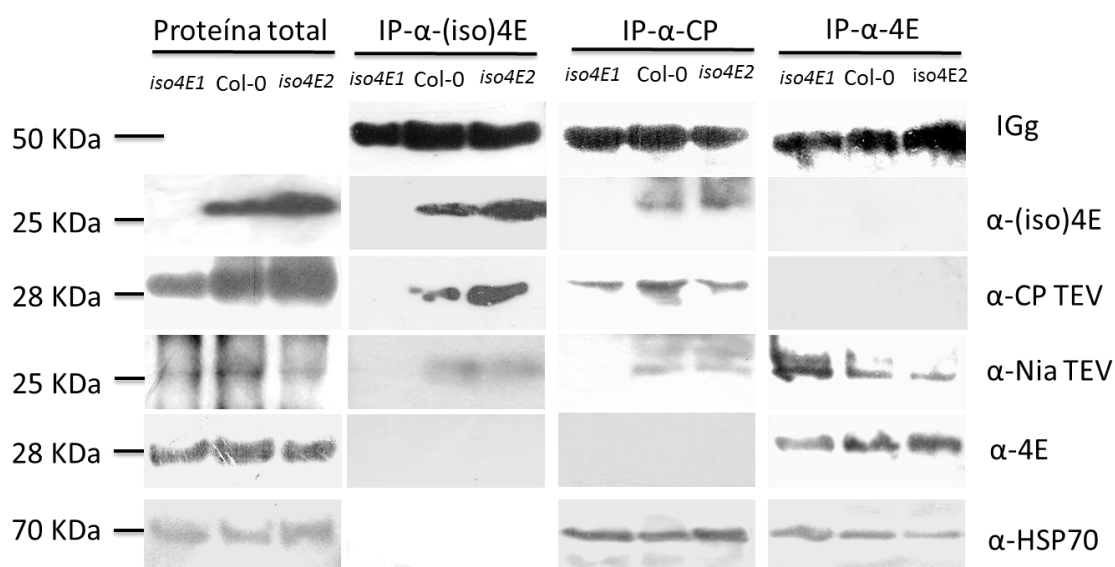


Figura 15. Inmunodetección de las proteínas eIF(iso)4E eIF4E, CP y Nla en complejos proteicos inmunoprecipitados con los anticuerpos indicados a partir de hojas locales de plantas de *A. thaliana* Col-0 (silvestre), *(iso)4E1* (mutante nula) e *(iso)4E2* (sobrexpresora) a 4 dpi con TEV-TAMPS. En el panel superior se muestra la IGg de cada anticuerpo empleado en la inmunoprecipitación. A la izquierda la detección de cada proteína en extracto totales.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la participación de eIF(iso)4E durante la infección de *A. thaliana* con un Potyvirus a diferentes niveles. Los resultados indicaron que durante la infección con un aislamiento mexicano del virus de jaspeado de tabaco (TEV-TAMPS), este factor es dispensable para la acumulación, traducción y replicación del RNA viral. Sin embargo, la ausencia de eIF(iso)4E interfiere con la diseminación de TEV-TAMPS en *A. thaliana* (Figuras 5, 10 y 11).

En *A. thaliana* ecotipo Col-0 hay un mecanismo que no se conoce a detalle pero restringe el movimiento sistémico de algunos aislados de TEV mediado por las proteínas RTM1, RTM2 y RTM3. En este trabajo se observó que el aislamiento mexicano TEV-TAMPS puede sobrepasar dicha resistencia, siendo capaz de moverse sistémicamente en *A. thaliana* Col-0 (Figura 5B).

Algunos mecanismos desarrollados por los virus que permiten sobrepasar la resistencia a la infección ofrecida por la planta, son soportados por cambios en algunas proteínas virales como VPg y CP. Se ha propuesto que mediante la substitución de algunos aminoácidos en la parte central y C-terminal de VPg, el virus puede sobrepasar mecanismos de resistencia recesiva o permitir la acumulación en el sistema vascular (Rajamaki y Valkonen 2002, Charron, Nicolai et al. 2008, Perez, Yeam et al. 2012). Por otra parte se ha determinado que aislamientos de LMV y PPV pertenecientes al género *Potyvirus* son capaces de sobrepasar la resistencia RTM de *A. thaliana*, ya que presentan sustituciones particulares en algunos aminoácidos de la región N-terminal de la proteína CP. Se ha sugerido que estos cambios podrían afectar la interacción con alguna de las proteínas RTM y permitir que estos aislamientos virales sean capaces de diseminarse sistémicamente en *A. thaliana* Col-0 (Decroocq, Salvador et al. 2009).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se realizó la secuenciación del genoma de TEV-TAMPS, con un enfoque particular en las secuencias de VPg y CP. La secuencia obtenida para TEV-TAMPS fue comparada con la correspondiente a aislamientos de TEV afectados en su capacidad para diseminarse sistémicamente en *A. thaliana* Col-0, y aislamientos cuya capacidad de diseminación sistémica no es conocida. De manera interesante, el alineamiento mostrado en éste trabajo (Figura 6), indica cambios en la región central de las

proteínas VPg de los aislamientos MX_MEX1_EU334789, MX_MEX3_EU334788 y TEV-TAMPS tal como se muestra en el trabajo de (Perez, Yeam et al. 2012), en el que se sugiere que dichos cambios conducen a la reactivación de la virulencia de aislamientos de TEV mediada por la interacción con los factores de inicio de la traducción de la familia eIF4E en *Capsicum* spp. Por otra parte, los análisis comparativos entre las secuencias de las proteínas CP de diferentes aislamientos de TEV mostraron cambios en la región N-terminal para TEV-TAMPS (Figura 7) que son responsables de la divergencia entre este aislamiento mexicano y aislamientos que no son capaces de movilizarse en *A. thaliana* Col-0 (TEV-7DA), ubicándolos en grupos diferentes al realizar un análisis filogenético (Figura 8).

Acorde al análisis de secuencias realizado en este trabajo se propone que los cambios en aminoácidos específicos de CP y VPg de TEV-TAMPS, podrían tener repercusión en la capacidad de diseminación sistémica de este aislamiento en *A. thaliana* Col-0. Sin embargo, es necesario corroborar experimentalmente esta propuesta.

Los virus de plantas requieren diversos factores del hospedero para llevar a cabo la expresión y replicación de su genoma, así como su dispersión. Numerosos trabajos han caracterizado genes de resistencia viral mediante mutaciones espontáneas o inducidas a través de compuestos químicos. Entre los factores responsables de resistencia recesiva se ha reportado a los factores de inicio de la traducción miembros de la familia eIF4E, particularmente para virus pertenecientes al género *Potyvirus* (Duprat, Caranta et al. 2002, Lellis, Kasschau et al. 2002, Gao, Johansen et al. 2004, Kang, Yeam et al. 2005, Robaglia y Caranta 2006, Hwang, Li et al. 2009).

Recientemente se han encontrado complejos de replicación de *Potyvirus* formados por RNA de doble cadena y las proteínas virales NIa (o su forma inmadura 6K2-NIa) y NIb, además de proteínas necesarias para la traducción de los RNAs del hospedero, tales como la proteína de unión a la cola de poliadeninas 2 (PABP2), eIF(iso)4E y eEF1A, aunque no se ha esclarecido el papel de estas en la replicación viral (Cotton, Grangeon et al. 2009, Huang, Wei et al. 2009).

En este trabajo se analizó cuantitativamente la presencia de cadenas de RNA negativas de TEV-TAMPS como un indicativo de la replicación viral. La

cuantificación fue considerada a partir de 0 dpi como el estado inicial, y como el estadio en el que la carga de RNA negativo fue menor, ya que para estos experimentos se inocularon viriones parcialmente purificados. Los resultados mostraron la presencia de cadenas negativas en hojas locales de plantas silvestres y mutantes carentes de eIF(iso)4E, pero en hojas sistémicas de la mutante no se observó RNA viral ya sea de sentido positivo o negativo (Figuras 11 y 12). Sin embargo, en las hojas sistémicas de plantas sobreexpresoras de eIF(iso)4E, se detectaron mayores niveles de RNA de sentido negativo. Estos datos sugieren que eIF(iso)4E no es imprescindible para la replicación viral, pero podría tener participación en este mecanismo, ya que su sobreexpresión favorece la replicación. Por otra parte, es posible que eIF4E pueda mediar la replicación de TEV-TAMPS, dada su interacción con VPg o su forma inmadura 6K2-N1a (Figura 15). Asimismo, no se descarta la posibilidad de que este tipo de complejo tenga otra función durante la infección como el transporte intra- o intercelular del RNA viral.

En contraste con los mRNAs celulares, el RNA de TEV carece de la estructura *cap* indispensable para el inicio de la traducción. En cambio, TEV tiene acoplada por un enlace fosfodiéster a la proteína VPg en el extremo 5' seguida por una región no traducible que puede formar estructuras secundarias (Urcuqui-Inchima, Haenni et al. 2001, Dreher y Miller 2006). Se ha probado *in vitro* la interacción de la proteína VPg de *Potyvirus* con los miembros de la familia eIF4E de *A. thaliana* y *T. aestivum*, sugiriéndose que VPg puede competir con los RNA celulares con *cap* por eIF4E o eIFiso4E para favorecer la traducción del RNA viral o para llevar a cabo algún otro proceso (Leonard, Plante et al. 2000, Miyoshi, Suehiro et al. 2006). En experimentos *in vitro* se ha probado el rol de la región 5' no traducible de TEV para soportar la traducción cuando se fusiona a esta un RNA reportero. Se observó que la traducción del reportero es mediada por la interacción de eIF4G o en menor medida de eIFiso4G con la estructura secundaria que se forma en la región no traducible 5' de TEV y que esta interacción es estabilizada en presencia de eIF4E y eIF(iso)4E (Zeenko y Gallie 2005, Ray, Yumak et al. 2006). Estos datos indican que aunque los factores tipo eIF4E podrían promover la traducción del RNA de TEV, el papel principal en este evento reside en eIF4G, quien actúa reclutado por una secuencia interna (tipo IRES) independientemente de VPg. Mediante la separación de fracciones polisomales se observó que el RNA de TEV-TAMPS se encuentra traduccionalmente activo en plantas de *A. thaliana* Col-0,

tanto silvestres, como mutantes nulas [(iso)4E1] o sobreexpresoras [(iso)4E2] de eIF(iso)4E (Figura 13). Esto sugiere que, *in vivo*, la traducción activa de las proteínas virales no depende de la presencia o niveles de eIF(iso)4E, por lo que se apoya la idea que *in planta* la traducción de TEV-TAMPS sea vía IRES y mediada por algún miembro de la familia eIF4G utilizando probablemente a eIF4E para estabilizar la formación de un complejo de inicio para la traducción viral.

Investigaciones con eIF4E y eIF(iso)4E recombinantes de *A. thaliana* y *Triticum aestivum*, han indicado que la proteína Nla (el precursor de VPg) del virus TuMV puede llevar a cabo una eficiente interacción con eIF(iso)4E de Arabidopsis y de trigo, y con menor eficiencia con eIF4E de estas especies. Esto ha sugerido que VPg puede unirse a cualquier isoforma y podría existir competencia entre VPg y los mRNA celulares por los miembros de la familia eIF4E. Por otro lado se ha mapeado el sitio de interacción de VPg con los factores eIF4E, encontrando que una secuencia de 35 aminoácidos en la región amino de las proteínas VPg de diferentes aislamientos de TEV, es la responsable de dicha interacción (Leonard, Plante et al. 2000). Otros estudios *in vitro* demuestran que existe competencia entre VPg y el análogo de cap 7mGTP por unirse a eIF(iso)4E de *A. thaliana* siendo favorecida la interacción entre VPg y eIF(iso)4E. Además se observó que esta interacción es viable para formar el complejo VPg-eIF(iso)4E-eIFiso4G (Miyoshi, Suehiro et al. 2006). Ensayos *in vivo* han mostrado que precursores de la proteína VPg de TuMV son capaces de co-localizar con eIF(iso)4E de Arabidopsis al ser expresados en *N. benthamiana*, lo que propone que esta interacción podría mediar la replicación y/o la traducción del genoma viral (Beauchemin, Boutet et al. 2007). Los resultados obtenidos en éste trabajo plantean la formación de dos tipos de complejos entre las proteínas del aislamiento mexicano TEV-TAMPS, eIF(iso)4E y eIF4E de *A. thaliana in vivo*: 1) Un complejo en el que eIF4E se asocia con VPg y la chaperona HSP70; 2) Un complejo formado por eIF(iso)4E con las proteínas virales CP y VPg o algún precursor (Figura 15). De estos complejos, el segundo es el que probablemente estaría involucrado en la dispersión sistémica viral, ya que además, no podemos descartar que la formación de dichos complejos esté mediada por RNA.

Miembros de la superfamilia HSP70 tienen un papel importante en el plegamiento, disgregación y transporte de un amplio número de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl 2002). Datos recientes han sugerido que un motivo ubicado en el extremo C-

terminal de la proteína HSC70 permite la interacción en complejos ribonucleoprotéicos virales competentes para el movimiento entre célula a célula, teniendo la capacidad incrementar el tamaño del límite de exclusión del plasmodesmo e interaccionar con rutas plasmodesmales de translocación autónomas no celulares (Aoki, Kragler et al. 2002). En éste estudio se detectó a la proteína HSP70 co-inmunoprecipitando con eIF4E de *A. thaliana* en un complejo, y con CP en otro complejo aún en ausencia de eIF(iso)4E (Figura 15; (iso)4E-1). Dada la universalidad del anticuerpo utilizado, no se puede definir a qué miembro de la familia de proteínas HSP70 de *Arabidopsis* corresponde la proteína detectada. Sin embargo, el resultado sugiere que se podrían formar complejos de movimiento célula a célula en ausencia de eIF(iso)4E asistido por algún miembro de la familia de chaperonas HSP70 o complejos de replicación viral ya que ésta chaperona se ha encontrado en complejos de replicación viral (Jiang y Laliberte 2011) además se debe considerar que los ensayos de inmunoprecipitación fueron realizados sin hacer tratamiento con RNasas, por lo que es posible que los complejos encontrados pueden estar mediados por RNA viral.

Se ha planteado que eIF4E o eIF(iso)4E puede tener diversos roles en la infección viral, como la traducción, el movimiento, la replicación y la estabilidad del RNA viral. En este trabajo se pudo establecer que para el sistema TEV-TAMPS – *A. thaliana* Col-0 la participación de eIF(iso)4E en el ciclo infectivo viral se encuentra principalmente a nivel de dispersión sistémica. Sin embargo, sería necesario efectuar ensayos adicionales que permitan definir si los complejos formados por eIF(iso)4E y proteínas virales *in planta* participan en el movimiento célula a célula o sistémico de TEV-TAMPS.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se reporta un aislamiento mexicano de TEV capaz de sobrepasar la restricción al movimiento sistémico en *A. thaliana* Col-0.

Se encontraron cambios en aminoácidos específicos de las proteínas virales VPg y CP de TEV-TAMPS con respecto al aislamiento TEV-7DA que es susceptible al mecanismo de resistencia mediado por RTM en *A. thaliana* ecotipo Col-0.

Acorde a alineamientos y filogenias construidas para VPg y CP de diferentes aislamientos de TEV se sugiere que los cambios de aminoácidos en TEV-TAMPS podrían estar involucrados en la capacidad de sobrepasar la respuesta RTM en el patosistema *A. thaliana* Col-0-TEV-TAMPS.

La ausencia de eIF(iso)4E afecta la dispersión sistémica de TEV-TAMPS, pero no la traducción o producción de intermediarios de la replicación.

La sobreexpresión de eIF(iso)4E incrementa los niveles de cadenas antisentido de TEV-TAMPS, por lo que no se descarta que este factor tenga participación en la replicación viral.

eIF(iso)4E y eIF4E de *A. thaliana* ecotipo Col-0 forman *in vivo* distintos complejos con proteínas virales de TEV-TAMPS. La formación de un complejo eIF(iso)4E-VPg-CP es probablemente indispensable para la dispersión sistémica de TEV-TAMPS en el hospedero *A. thaliana* Col-0.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo sugieren que es necesario abundar en el estudio de los cambios encontrados en las secuencias que codifican las proteínas VPg y CP que son importantes en el movimiento viral, con la finalidad de establecer si dichos cambios son responsables de la capacidad de TEV-TAMPS para sobrepasar la respuesta RTM de *A. thaliana* Col-0. Una propuesta a futuro es llevar a cabo la construcción de una clona infecciosa de TEV-TAMPS para realizar ensayos de mutación dirigida y análisis de la dispersión sistémica de las clonas mutantes en este hospedero.

Realizar ensayos de co-inmunoprecipitación de RNA para poder determinar la presencia de RNA viral en los complejos protéicos encontrados.

Llevar a cabo el estudio de la localización *in situ* de las proteínas virales VPg, CP y eIF(iso)4E en el patosistema TEV-TAMPS-*A. thaliana* Col-0 con la finalidad de discernir cuál es su localización durante la infección viral y si esta está dirigida a soportar el movimiento sistémico viral.

11. LITERATURA CITADA

- Alfonso, Y., L. Cantrill y D. Jackson (2006). Plasmodesmata: Cell-Cell Channels in Plants. Cell-Cell Channels, Springer New York: 101-112.
- Aoki, K., F. Kragler, B. Xoconostle-Cazares y W. J. Lucas (2002). "A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16342-16347.
- Arazi, T., Y. M. Shibolet y A. Gal-On (2001). "A Nonviral Peptide Can Replace the Entire N Terminus of Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus Coat Protein and Permits Viral Systemic Infection." Journal of Virology **75**(14): 6329-6336.
- Ashby, J. A., C. E. Stevenson, G. E. Jarvis, D. M. Lawson y A. J. Maule (2011). "Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to sbm1 resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea." PLoS ONE **6**(1): e15873.
- Baulcombe, D. (2004). "RNA silencing in plants." Nature **431**(7006): 356-363.
- Beauchemin, C., N. Boutet y J. F. Laliberte (2007). "Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in Planta." J Virol **81**(2): 775-782.
- Benitez-Alfonso, Y., C. Faulkner, C. Ritzenthaler y A. J. Maule (2010). "Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection." Mol Plant Microbe Interact **23**(11): 1403-1412.
- Boller, T. (2005). "Peptide signalling in plant development and self/non-self perception." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 116-122.
- Carr, J. P., M. G. Lewsey y P. Palukaitis (2010). "Signaling in induced resistance." Adv Virus Res **76**: 57-121.
- Carrington, J. C. and D. D. Freed (1990). "Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region." J Virol **64**(4): 1590-1597.
- Carrington, J. C., P. E. Jensen y M. C. Schaad (1998). "Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement." Plant J **14**(4): 393-400.
- Carrington, J. C., K. D. Kasschau, S. K. Mahajan y M. C. Schaad (1996). "Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants." Plant Cell **8**(10): 1669-1681.
- Carrington, J. C. y S. A. Whitham (1998). "Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies." Curr Opin Plant Biol **1**(4): 336-341.

- Cilia, M. L. y D. Jackson (2004). "Plasmodesmata form and function." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 500-506.
- Citovsky, V., D. Knorr, G. Schuster y P. Zambryski (1990). "The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein." Cell **60**(4): 637-647.
- Citovsky, V., M. L. Wong, A. L. Shaw, B. V. Prasad y P. Zambryski (1992). "Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids." Plant Cell **4**(4): 397-411.
- Collmer, C. W., M. F. Marston, J. C. Taylor y M. Jahn (2000). "The I Gene of Bean: A Dosage-Dependent Allele Conferring Extreme Resistance, Hypersensitive Resistance, or Spreading Vascular Necrosis in Response to the Potyvirus Bean common mosaic virus." Molecular Plant-Microbe Interactions **13**(11): 1266-1270.
- Contreras-Paredes, C. A. (2008). "Papel del factor eIF4E en el mecanismo de infección por Potyvirus en Arabidopsis thaliana." Tesis de Maestría.
- Cosson, P., L. Sofer, Q. Hien Le, V. Leger, V. Schurdi-Levraud, S. A. Whitham, M. L. Yamamoto, S. Gopalan, O. Le Gall, T. Candresse, J. C. Carrington y F. Revers (2010). "RTM3, Which Controls Long-Distance Movement of Potyviruses, Is a Member of a New Plant Gene Family Encoding a Meprin and TRAF Homology Domain-Containing Protein." Plant Physiol. **154**(1): 222-232.
- Cotton, S., R. Grangeon, K. Thivierge, I. Mathieu, C. Ide, T. Y. Wei, A. M. Wang y J. F. Laliberte (2009). "Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, and Are Each Derived from a Single Viral Genome." Journal of Virology **83**(20): 10460-10471.
- Crawford, K. M. y P. C. Zambryski (2001). "Non-Targeted and Targeted Protein Movement through Plasmodesmata in Leaves in Different Developmental and Physiological States." Plant Physiology **125**(4): 1802-1812.
- Culver, J. N. y M. S. Padmanabhan (2007). "Virus-induced disease: Altering host physiology one interaction at a time." Annual Review of Phytopathology **45**: 221-243.
- Charron, C., M. Nicolai, J. L. Gallois, C. Robaglia, B. Moury, A. Palloix y C. Caranta (2008). "Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg." Plant J **54**(1): 56-68.
- Chen, M. H., J. Sheng, G. Hind, A. K. Handa and V. Citovsky (2000). "Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement." EMBO J **19**(5): 913-920.

- Cheng, N. H., C. L. Su, S. A. Carter y R. S. Nelson (2000). "Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*." Plant J **23**(3): 349-362.
- Chisholm, S. T., S. K. Mahajan, S. A. Whitham, M. L. Yamamoto y J. C. Carrington (2000). "Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 489-494.
- Chisholm, S. T., M. A. Parra, R. J. Anderberg y J. C. Carrington (2001). "Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus." Plant Physiol **127**(4): 1667-1675.
- Chung, B. Y., W. A. Miller, J. F. Atkins y A. E. Firth (2008). "An overlapping essential gene in the Potyviridae." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5897-5902.
- Davies, E. y S. Abe (1995). "Methods for isolation and analysis of polyribosomes." Methods Cell Biol **50**: 209-222.
- Decroocq, V., B. Salvador, O. Sicard, M. Glasa, P. Cosson, L. Svanella-Dumas, F. Revers, J. A. Garcia y T. Candresse (2009). "The Determinant of Potyvirus Ability to Overcome the RTM Resistance of Arabidopsis thaliana Maps to the N-Terminal Region of the Coat Protein." Mol Plant Microbe Interact **22**(10): 1302-1311.
- Decroocq, V., O. Sicard, J. M. Alamillo, M. Lansac, J. P. Eyquard, J. A. Garcia, T. Candresse, O. Le Gall y F. Revers (2006). "Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana." Mol Plant Microbe Interact **19**(5): 541-549.
- Dijkstra, J., G. C. A. Bruin, A. Burgers, L. C. Loon, C. Ritter, P. A. C. M. Sanden y D. H. Wieringa-Brants (1977). "Systemic infection of some N-gene-carrying *Nicotiana* species and cultivars after inoculation with tobacco mosaic virus." Netherlands Journal of Plant Pathology **83**(2): 41-59.
- Ding, B., M.-O. Kwon y L. Warnberg (1996). "Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll." The Plant Journal **10**(1): 157-164.
- Dolja, V. V., R. Haldeman-Cahill, A. E. Montgomery, K. A. Vandenbosch y J. C. Carrington (1995). "Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus." Virology **206**(2): 1007-1016.
- Dolja, V. V., R. Haldeman, N. L. Robertson, W. G. Dougherty y J. C. Carrington (1994). "Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants." EMBO J **13**(6): 1482-1491.

- Dreher, T. W. y W. A. Miller (2006). "Translational control in positive strand RNA plant viruses." Virology **344**(1): 185-197.
- Duprat, A., C. Caranta, F. Revers, B. Menand, K. S. Browning y C. Robaglia (2002). "The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses." Plant J **32**(6): 927-934.
- Durrant, W. E. y X. Dong (2004). "Systemic acquired resistance." Annu Rev Phytopathol **42**: 185-209.
- Erhardt, M., M. Morant, C. Ritzenthaler, C. Stussi-Garaud, H. Guilley, K. Richards, G. Jonard, S. Bouzoubaa y D. Gilmer (2000). "P42 movement protein of Beet necrotic yellow vein virus is targeted by the movement proteins P13 and P15 to punctate bodies associated with plasmodesmata." Mol Plant Microbe Interact **13**(5): 520-528.
- Erhardt, M., C. Stussi-Garaud, H. Guilley, K. E. Richards, G. Jonard y S. Bouzoubaa (1999). "The first triple gene block protein of peanut clump virus localizes to the plasmodesmata during virus infection." Virology **264**(1): 220-229.
- Eskelin, K., A. Hafren, K. I. Rantalainen y K. Makinen (2011). "Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta." J Virol.
- Faulkner, C. R., L. M. Blackman, D. A. Collings, S. J. Cordwell y R. L. Overall (2009). "Anti-tropomyosin antibodies co-localise with actin microfilaments and label plasmodesmata." Eur J Cell Biol **88**(6): 357-369.
- Fraser, R. S. S. (1990). "The Genetics of Resistance to Plant Viruses." Annual Review of Phytopathology **28**(1): 179-200.
- Fraser, R. S. S. (1992). "The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding." Euphytica **63**(1): 175-185.
- Gao, Z., E. Johansen, S. Evers, C. L. Thomas, T. H. Noel Ellis y A. J. Maule (2004). "The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking." Plant J **40**(3): 376-385.
- Gilbertson, R. L., M. Sudarshana, H. Jiang, M. R. Rojas y W. J. Lucas (2003). "Limitations on geminivirus genome size imposed by plasmodesmata and virus-encoded movement protein: insights into DNA trafficking." Plant Cell **15**(11): 2578-2591.
- Gopalan, S. (2007). "A multidirectional non-cell autonomous control and a genetic interaction restricting tobacco etch virus susceptibility in Arabidopsis." PLoS ONE **2**(10): e985.

- Harries, P. y B. Ding (2011). "Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants." Virology.
- Hartl, F. U. y M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-1858.
- Heinlein, M. (2002). "Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling." Curr Opin Plant Biol **5**(6): 543-552.
- Heinlein, M. (2002). "The spread of tobacco mosaic virus infection: insights into the cellular mechanism of RNA transport." Cell Mol Life Sci **59**(1): 58-82.
- Heinlein, M. y B. L. Epel (2004). "Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata." Int Rev Cytol **235**: 93-164.
- Heinlein, M., B. L. Epel, H. S. Padgett y R. N. Beachy (1995). "Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton." Science **270**(5244): 1983-1985.
- Hirashima, K. y Y. Watanabe (2001). "Tobamovirus replicase coding region is involved in cell-to-cell movement." J Virol **75**(18): 8831-8836.
- Hofmann, C., A. Sambade y M. Heinlein (2007). "Plasmodesmata and intercellular transport of viral RNA." Biochem Soc Trans **35**(Pt 1): 142-145.
- Holt, C. A. y R. N. Beachy (1991). "In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants." Virology **181**(1): 109-117.
- Howard, A. R., M. L. Heppler, H. J. Ju, K. Krishnamurthy, M. E. Payton y J. Verchot-Lubicz (2004). "Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves." Virology **328**(2): 185-197.
- Huang, T. S., T. Wei, J. F. Laliberte y A. Wang (2009). "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 Physiol **152**(1): 255-266.
- Hwang, J., J. Li, W. Y. Liu, S. J. An, H. Cho, N. H. Her, I. Yeam, D. Kim y B. C. Kang (2009). "Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to Chilli veinal mottle virus in pepper." Mol Cells **27**(3): 329-336.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen y T. V. Pestova (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(2): 113-127.
- Jenner, C. E., C. F. Nellist, G. C. Barker y J. A. Walsh (2010). "Turnip mosaic virus (TuMV) Is Able to Use Alleles of Both eIF4E and eIF(iso)4E from Multiple Loci of

- the Diploid Brassica rapa." Molecular Plant-Microbe Interactions **23**(11): 1498-1505.
- Jiang, J. y J. F. Laliberte (2011). "The genome-linked protein VPg of plant viruses-a protein with many partners." Curr Opin Virol **1**(5): 347-354.
- Jones, D. T., W. R. Taylor y J. M. Thornton (1992). "The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences." Comput Appl Biosci **8**(3): 275-282.
- Kang, B. C., I. Yeam, J. D. Frantz, J. F. Murphy y M. M. Jahn (2005). "The pvr1 locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg." Plant J **42**(3): 392-405.
- Kang, B. C., I. Yeam y M. M. Jahn (2005). "Genetics of plant virus resistance." Annu Rev Phytopathol **43**: 581-621.
- Khan, M. A., H. Miyoshi, D. R. Gallie y D. J. Goss (2008). "Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F." J Biol Chem **283**(3): 1340-1349.
- Kim, I., E. Cho, K. Crawford, F. D. Hempel y P. C. Zambryski (2005). "Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in Arabidopsis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(6): 2227-2231.
- Kim, J. Y. (2005). "Regulation of short-distance transport of RNA and protein." Curr Opin Plant Biol **8**(1): 45-52.
- Kim, S. H., N. O. Kalinina, I. Andreev, E. V. Ryabov, A. G. Fitzgerald, M. E. Taliany y P. Palukaitis (2004). "The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation." J Gen Virol **85**(Pt 1): 221-230.
- Kobayashi, I., Y. Kobayashi, N. Yamaoka y H. Kunoh (1992). "Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts." Canadian Journal of Botany **70**(9): 1815-1823.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**: 2947-2948.
- Lee, J. Y., K. Taoka, B. C. Yoo, G. Ben-Nissan, D. J. Kim y W. J. Lucas (2005). "Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins." Plant Cell **17**(10): 2817-2831.

- Lellis, A. D., K. D. Kasschau, S. A. Whitham y J. C. Carrington (2002). "Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection." Curr Biol **12**(12): 1046-1051.
- Leonard, S., D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M. G. Fortin y J. F. Laliberte (2000). "Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity." J Virol **74**(17): 7730-7737.
- Lucas, W. J. (2006). "Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes." Virology **344**(1): 169-184.
- Lucas, W. J., B. K. Ham y J. Y. Kim (2009). "Plasmodesmata - bridging the gap between neighboring plant cells." Trends Cell Biol **19**(10): 495-503.
- Lucas, W. J. y J. Y. Lee (2004). "Plasmodesmata as a supracellular control network in plants." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 712-726.
- Lucas, W. J. y S. Wolf (1993). "Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants." Trends Cell Biol **3**(9): 308-315.
- Mahajan, S. K., S. T. Chisholm, S. A. Whitham y J. C. Carrington (1998). "Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*." Plant J **14**(2): 177-186.
- Martin-Hernandez, A. M. y D. C. Baulcombe (2008). "Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems." J Virol **82**(8): 4064-4071.
- Martinez-Silva, A. V., C. Aguirre-Martinez, C. E. Flores-Tinoco, N. D. Alejandri-Ramirez y T. D. Dinkova (2012). "Translation Initiation Factor AtelF(iso)4E Is Involved in Selective mRNA Translation in *Arabidopsis Thaliana* Seedlings." PLoS ONE **7**(2): e31606.
- Maule, A. J. (2008). "Plasmodesmata: structure, function and biogenesis." Curr Opin Plant Biol **11**(6): 680-686.
- Mayberry, L. K., M. L. Allen, K. R. Nitka, L. Campbell, P. A. Murphy y K. S. Browning (2011). "Plant cap binding complexes eukaryotic initiation factors eIF4F and eIFiso4F: molecular specificity of subunit binding." J Biol Chem.
- Miyoshi, H., N. Suehiro, K. Tomoo, S. Muto, T. Takahashi, T. Tsukamoto, T. Ohmori y T. Natsuaki (2006). "Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors." Biochimie **88**(3-4): 329-340.
- Morozov, S. Y. y A. G. Solovyev (2003). "Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement." J Gen Virol **84**(Pt 6): 1351-1366.

- Mysore, K. S. y C.-M. Ryu (2004). "Nonhost resistance: how much do we know?" Trends in Plant Science **9**(2): 97-104.
- Naderpour, M., O. S. Lund, R. Larsen y E. Johansen (2010). "Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele." Molecular Plant Pathology **11**(2): 255-263.
- Nakajima, K., G. Sena, T. Nawy y P. N. Benfey (2001). "Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning." Nature **413**(6853): 307-311.
- Nicaise, V., J. L. Gallois, F. Chafiai, L. M. Allen, V. Schurdi-Levraud, K. S. Browning, T. Candresse, C. Caranta, O. Le Gall y S. German-Retana (2007). "Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*." FEBS Lett **581**(5): 1041-1046.
- Nicaise, V., S. German-Retana, R. Sanjuan, M. P. Dubrana, M. Mazier, B. Maisonneuve, T. Candresse, C. Caranta y O. LeGall (2003). "The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus." Plant Physiol **132**(3): 1272-1282.
- Niehl, A. y M. Heinlein (2011). "Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata." Protoplasma **248**(1): 75-99.
- Oparka, K. J., A. G. Roberts, P. Boevink, S. Santa Cruz, I. Roberts, K. S. Pradel, A. Imlau, G. Kotlizky, N. Sauer y B. Epel (1999). "Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking of proteins in developing tobacco leaves." Cell **97**(6): 743-754.
- Oparka, K. J. y R. Turgeon (1999). "Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem." Plant Cell **11**(4): 739-750.
- Osborn, A. E. (1996). "Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack." The Plant Cell Online **8**(10): 1821-1831.
- Palukaitis, P. y F. Garcia-Arenal (2003). "Cucumoviruses." Adv Virus Res **62**: 241-323.
- Perez, K., I. Yeam, B. C. Kang, D. R. Ripoll, J. Kim, J. F. Murphy y M. M. Jahn (2012). "Tobacco etch virus Infectivity in *Capsicum* Spp. Is Determined by a Maximum of Three Amino Acids in the Viral Virulence Determinant VPg." Mol Plant Microbe Interact **25**(12): 1562-1573.
- Piron, F., M. Nicolai, S. Minoia, E. Piednoir, A. Moretti, A. Salgues, D. Zamir, C. Caranta y A. Bendahmane (2010). "An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses." PLoS ONE **5**(6): e11313.

- Raffaele, S., E. Bayer, D. Lafarge, S. Cluzet, S. German Retana, T. Boubekeur, N. Leborgne-Castel, J. P. Carde, J. Lherminier, E. Noiro, B. Satiat-Jeunemaitre, J. Laroche-Traineau, P. Moreau, T. Ott, A. J. Maule, P. Reymond, F. Simon-Plas, E. E. Farmer, J. J. Bessoule y S. Mongrand (2009). "Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement." Plant Cell **21**(5): 1541-1555.
- Rajamaki, M. L. y J. P. Valkonen (2002). "Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves." Mol Plant Microbe Interact **15**(2): 138-149.
- Rantalainen, K. I., K. Eskelin, P. Tompa y K. Makinen (2011). "Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg." J Virol **85**(5): 2449-2457.
- Ray, S., H. Yumak, A. Domashevskiy, M. A. Khan, D. R. Gallie y D. J. Goss (2006). "Tobacco etch virus mRNA preferentially binds wheat germ eukaryotic initiation factor (eIF) 4G rather than eIFiso4G." J Biol Chem **281**(47): 35826-35834.
- Reichel, C., P. Mas y R. N. Beachy (1999). "The role of the ER and cytoskeleton in plant viral trafficking." Trends Plant Sci **4**(11): 458-462.
- Revers, F., O. Le Gall, T. Candresse y A. J. Maule (1999). "New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions." Molecular Plant-Microbe Interactions **12**(5): 367-376.
- Robaglia, C. y C. Caranta (2006). "Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection." Trends Plant Sci **11**(1): 40-45.
- Roberts, I. M., D. Wang, K. Findlay y A. J. Maule (1998). "Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement." Virology **245**(1): 173-181.
- Rojas, M. R., F. M. Zerbini, R. F. Allison, R. L. Gilbertson y W. J. Lucas (1997). "Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins." Virology **237**(2): 283-295.
- Ross, A. F. (1961). "Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants." Virology **14**(3): 340-358.
- Roudet-Tavert, G., S. German-Retana, T. Delaunay, B. Delecolle, T. Candresse y O. Le Gall (2002). "Interaction between potyvirus helper component-proteinase and capsid protein in infected plants." J Gen Virol **83**(Pt 7): 1765-1770.
- Roudet-Tavert, G., T. Michon, J. Walter, T. Delaunay, E. Redondo y O. Le Gall (2007). "Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the

- host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro." J Gen Virol **88**(Pt 3): 1029-1033.
- Ruffel, S., M. H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, A. Bendahmane, C. Robaglia y C. Caranta (2002). "A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)." Plant J **32**(6): 1067-1075.
- Ruffel, S., J. L. Gallois, M. L. Lesage y C. Caranta (2005). "The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene." Mol Genet Genomics **274**(4): 346-353.
- Ruiz-Medrano, R., B. Xoconostle-Cazares y W. J. Lucas (1999). "Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants." Development **126**(20): 4405-4419.
- Sato, M., K. Nakahara, M. Yoshii, M. Ishikawa y I. Uyeda (2005). "Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses." FEBS Lett **579**(5): 1167-1171.
- Scholthof, H. B. (2005). "Plant virus transport: motions of functional equivalence." Trends Plant Sci **10**(8): 376-382.
- Serva, S. y P. D. Nagy (2006). "Proteomics analysis of the tombusvirus replicase: Hsp70 molecular chaperone is associated with the replicase and enhances viral RNA replication." J Virol **80**(5): 2162-2169.
- Sessions, A., M. F. Yanofsky y D. Weigel (2000). "Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1." Science **289**(5480): 779-782.
- Shun Ding, X., S. A. Carter, C. Michael Deom y R. S. Nelson (1998). "Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins of Inoculated Leaves from Representatives of the Solanaceae and Fabaceae." Plant Physiology **116**(1): 125-136.
- Simón-Buela, L. y F. García-Arenal (1999). "Virus Particles of Cucumber Green Mottle Mosaic Tobamovirus Move Systemically in the Phloem of Infected Cucumber Plants." Molecular Plant-Microbe Interactions **12**(2): 112-118.
- Simpson, C., C. Thomas, K. Findlay, E. Bayer y A. J. Maule (2009). "An *Arabidopsis* GPI-anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking." Plant Cell **21**(2): 581-594.
- Su, S., Z. Liu, C. Chen, Y. Zhang, X. Wang, L. Zhu, L. Miao, X. C. Wang y M. Yuan (2010). "Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to

increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco." Plant Cell **22**(4): 1373-1387.

Swanson, M., H. Barker y S. A. Macfarlane (2002). "Rapid vascular movement of tobnaviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses." Annals of Applied Biology **141**(3): 259-266.

Tacke, E., D. Prufer, J. Schmitz y W. Rohde (1991). "The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein." J Gen Virol **72** (Pt 8): 2035-2038.

Taliansky, M., M. A. Mayo y H. Barker (2003). "Potato leafroll virus: a classic pathogen shows some new tricks." Mol Plant Pathol **4**(2): 81-89.

Taliansky, M., I. M. Roberts, N. Kalinina, E. V. Ryabov, S. K. Raj, D. J. Robinson y K. J. Oparka (2003). "An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes." J Virol **77**(5): 3031-3040.

Taliansky, M., L. Torrance y N. O. Kalinina (2008). "Role of plant virus movement proteins." Methods Mol Biol **451**: 33-54.

Taliansky, M. E. y D. J. Robinson (2003). "Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors." J Gen Virol **84**(Pt 8): 1951-1960.

Thomas, C. L., E. M. Bayer, C. Ritzenthaler, L. Fernandez-Calvino y A. J. Maule (2008). "Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication." PLoS Biol **6**(1): e7.

Thompson, J. R. y F. García-Arenal (1998). "The Bundle Sheath-Phloem Interface of Cucumis sativus Is a Boundary to Systemic Infection by Tomato Aspermy Virus." Molecular Plant-Microbe Interactions **11**(2): 109-114.

Tilsner, J., O. Linnik, K. M. Wright, K. Bell, A. G. Roberts, C. Lacomme, S. Santa Cruz y K. J. Oparka (2012). "The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory." Plant Physiol **158**(3): 1359-1370.

Truniger, V. y M. A. Aranda (2009). Recessive Resistance to Plant Viruses. Advances in Virus Research. L. Gad y P. C. John, Academic Press. **Volume 75**: 119-159, 231.

Trutnyeva, K., R. Bachmaier y E. Waigmann (2005). "Mimicking carboxyterminal phosphorylation differentially effects subcellular distribution and cell-to-cell movement of Tobacco mosaic virus movement protein." Virology **332**(2): 563-577.

Urcuqui-Inchima, S., A. L. Haenni y F. Bernardi (2001). "Potyvirus proteins: a wealth of functions." Virus Res **74**(1-2): 157-175.

- Varrelmann, M. y E. Maiss (2000). "Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*." J Gen Virol **81**(Pt 3): 567-576.
- Ventelon-Debout, M., F. Delalande, J. P. Brizard, H. Diemer, A. Van Dorsselaer y C. Brugidou (2004). "Proteome analysis of cultivar-specific deregulations of *Oryza sativa indica* and *O. sativa japonica* cellular suspensions undergoing rice yellow mottle virus infection." Proteomics **4**(1): 216-225.
- Vuorinen, A. L., J. Kelloniemi y J. P. Valkonen (2011). "Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants?" Plant Sci **181**(4): 355-363.
- Wang, A. y S. Krishnaswamy (2012). "Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement." Molecular Plant Pathology **13**(7): 795-803.
- Whitham, S. A., R. J. Anderberg, S. T. Chisholm y J. C. Carrington (2000). "Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein." Plant Cell **12**(4): 569-582.
- Yang, Y., B. Ding, D. C. Baulcombe y J. Verchot (2000). "Cell-to-cell movement of the 25K protein of potato virus X is regulated by three other viral proteins." Mol Plant Microbe Interact **13**(6): 599-605.
- Yoshioka, K., Y. Matsushita, M. Kasahara, K. Konagaya y H. Nyunoya (2004). "Interaction of tomato mosaic virus movement protein with tobacco RIO kinase." Mol Cells **17**(2): 223-229.
- Zamyatnin, A. A., Jr., A. G. Solovyev, E. I. Savenkov, A. Germundsson, M. Sandgren, J. P. Valkonen y S. Y. Morozov (2004). "Transient coexpression of individual genes encoded by the triple gene block of potato mop-top virus reveals requirements for TGBp1 trafficking." Mol Plant Microbe Interact **17**(8): 921-930.
- Zavaliev, R., S. Ueki, B. L. Epel y V. Citovsky (2011). "Biology of callose (beta-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata." Protoplasma **248**(1): 117-130.
- Zeenko, V. y D. R. Gallie (2005). "Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader." J Biol Chem **280**(29): 26813-26824.

Anexo 1

MPMI Vol. 26, No. 4, 2013, pp. 461–470. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0225-R>

e-Xtra*

The Absence of Eukaryotic Initiation Factor eIF(iso)4E Affects the Systemic Spread of a Tobacco etch virus Isolate in *Arabidopsis thaliana*

Carlos A. Contreras-Paredes,¹ Laura Silva-Rosales,² José-Antonio Daròs,³ Naholi D. Alejandri-Ramírez,¹ and Tzvetanka D. Dinkova¹

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., México; ²Departamento de Ingeniería Genética, Cinvestav-Irapuato, Km 9.6 Lib. Nte. Carr. Irapuato-León, Irapuato, Gto. 36821 México; ³Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Politécnica de Valencia), Avenida de los Naranjos, 46022 Valencia, Spain

Submitted 9 September 2012. Accepted 4 December 2012.

Translation initiation factor eIF4E exerts an important role during infection of viral species in the family *Potviridae*. Particularly, a eIF(iso)4E family member is required for *Arabidopsis thaliana* susceptibility to Turnip mosaic virus, Lettuce mosaic virus, and Tobacco etch virus (TEV). In addition, a resistance mechanism named restriction of TEV movement (RTM) in *A. thaliana* controls the systemic spread of TEV in Col-0 ecotype. Here, we describe that TEV-TAMPS, a Mexican isolate, overcomes the RTM resistance mechanism reported for TEV-TDA infection of the Col-0 ecotype but depends on eIF(iso)4E for its systemic spread. To understand at which level eIF(iso)4E participates in *A. thaliana* TEV-TAMPS infection, the viral RNA replication and translation were measured. The absence or overexpression of eIF(iso)4E did not affect viral translation, and replication was still observed in the absence of eIF(iso)4E. However, the TEV-TAMPS systemic spread was completely abolished in the null mutant. The viral protein genome-linked (VPg) precursor NIa was found in co-immunoprecipitated complexes with both, eIF(iso)4E and eIF4E. However, the viral coat protein (CP) was only present in the eIF(iso)4E complexes. Since both the VPg and the CP proteins are needed for systemic spread, we propose a role of *A. thaliana* eIF(iso)4E in the movement of TEV-TAMPS within this host.

Successful colonization of a plant host by viruses is mediated through molecular interactions between the host and viral factors. Such interactions mediate translation and replication of the viral genome, invasion of the host by cell-to-cell movement through plasmodesmata, and long-distance movement through the vascular system (Carrington and Whitham 1998; Taliany et al. 2008).

During the past decade, a central role of the translation initiation factor eIF4E has become evident during infection of viral species in the family *Potviridae*. Point mutations or polymor-

phisms within eIF4E family members have been identified as the products of recessive resistance genes and are considered as markers for viral resistance in a broad spectrum of hosts and potyviruses (Ashby et al. 2011; Gao et al. 2004; Kang et al. 2005; Nicaise et al. 2007; Robaglia and Caranta 2006). Such mutations usually do not affect the endogenous cellular role of eIF4E. This protein is involved in translation initiation of capped mRNAs by directly binding the Cap structure, m⁷GpppN (where N is any nucleotide), at the 5' end of the mRNA through π - π stacking interactions as well as to the eIF4G protein to form the eIF4F complex (Jackson et al. 2010). In plants, three members of the eIF4E family have been characterized: eIF4E, eIF(iso)4E, and nCBP (Browning 2004). eIF4E forms a complex with eIF4G named eIF4F, whereas eIF(iso)4E binds to eIF(iso)4G to form the eIF(iso)4F complex. The expression of each member of the eIF4E family is apparently under differential regulatory mechanisms depending upon specific tissue and developmental stages (Dinkova et al. 2000; Rodríguez et al. 1998; Ruud et al. 1998). Particularly, eIF4E and eIF(iso)4E have been more broadly studied and have shown both redundant and specific roles as part of the eIF4F and eIF(iso)4F complexes during in vitro and in vivo translation of cellular mRNAs (Dinkova et al. 2011; Gallie 2001; Martínez-Silva et al. 2012).

Natural and insertional mutants in the eIF4E family have been studied in *Arabidopsis thaliana* (Duprat et al. 2002; Hwang et al. 2009; Jenner et al. 2010; Sato et al. 2005), pepper and tomato (Kang et al. 2005; Ruffel et al. 2002, 2005), pea (Gao et al. 2004), lettuce (Nicaise et al. 2003), and common bean (Naderpour et al. 2010). The mechanisms by which eIF4E proteins are involved in potyvirus infection are not completely understood. However, it has been shown that they interact with the viral genome-linked protein (VPg) bound to the 5' end of the viral genome. It has been proposed that inhibition of cellular mRNA translation might be achieved by the competition between VPg and Cap for a particular eIF4E factor (Khan et al. 2008; Leonard et al. 2000). Mutant alleles of eIF4E showing impairment of the interaction with VPg are responsible for observed resistances to potyviral infections (Gao et al. 2004; Lellis et al. 2002). The central region of the VPg has been implicated in the interaction with eIF4E (Roudet-Tavert et al. 2007), and the VPg protein itself has been proposed as an avirulence factor in the potyvirus-plant interaction (Rajamaki and Valkonen 1999).

Other host resistance factors different from eIF4E have also been documented. Some of them act at different steps of the

Corresponding author: T. D. Dinkova; Telephone: +52 55 56225277; Fax: +52 55 56225329; E-mail: cesy@unam.mx

*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates that three supplementary figures and one supplementary table are published online.

© 2013 The American Phytopathological Society

Vol. 26, No. 4, 2013 / 461

viral infection such as short- or long-distance movement. For example, the restriction of *Tobacco etch virus* (TEV) movement (RTM) described in *A. thaliana* controls the systemic spread of TEV, *Plum pox virus* (PPV), and *Lettuce mosaic virus* (LMV) (Decroocq et al. 2006, 2009; Whitham et al. 1999). TEV belongs to the family *Potyviridae* and infects a broad range of host plants. Its genome is composed of a positive single-stranded RNA of about 10 kb with a VPg covalently attached to the 5' end and a poly(A) tail at the 3' end. The viral genome contains a long open reading frame coding for about 10 mature viral proteins (Urcuqui-Inchima et al. 2001) and a small open reading frame called PIP0, which is inserted in the P3 sequence and produces an additional protein (P3N-PIPO) that acts as a cell-to-cell movement protein (Chung et al. 2008; Wei et al. 2010).

The first experiments describing the RTM mechanism were performed using an isolate named TEV-7DA. The RTM response requires at least three loci, *RTM1*, *RTM2*, and *RTM3*. *RTM1* encodes a protein belonging to the jacalin family, which is involved in defense against insects and fungi (Chisholm et al. 2000). The *RTM2* locus corresponds to a protein with a trans membrane domain similar to small heat-shock proteins. Its expression is not heat-inducible and, apparently, is not involved in a thermo-tolerance mechanism (Whitham et al. 2000). *RTM1* and *RTM2* associate with the phloem, perhaps within the sieve elements, to restrict TEV long-distance movement (Chisholm et al. 2001). A third RTM loci (*RTM3*) was characterized (Cosson et al. 2010). It encodes a protein be-

longing to an undefined family of 29 members with Meprin and TRAF homology domains. Recently, two additional RTM genes have been identified, indicating that the nonconventional RTM resistance is a complex biological process (Cosson et al. 2012). At present, it is not clear how the RTM proteins restrict long-distance movement of potyviruses and whether they interact with viral components. However, a possible regulation by plant hormones opens new venues of virus resistance regulation (Cosson et al. 2012). A connection between RTM and eIF4E family member-associated resistance has not been reported to date.

In *A. thaliana*, eIF(iso)4E but not eIF4E is required for successful viral colonization in the case of TEV (Lellis et al. 2002) and other potyviruses, such as *Turnip mosaic virus* (TuMV) and LMV (Duprat et al. 2002). At least three potential roles have been considered for the VPg-eIF(iso)4E interactions during TEV infection: i) a function in viral RNA translation based on the eIF(iso)4E role in translation initiation, ii) protection of the viral mRNA 5' end against enzymatic degradation through the eIF(iso)4E bound to VPg, and iii) appropriate intracellular localization and transport of the potyviral RNA as part of ribonucleoprotein complexes through interaction with cellular microtubules (Lellis et al. 2002; Okada et al. 2009).

Here, we assayed the infectivity of a Mexican isolate of TEV (TEV-TAMPS) in *A. thaliana* plants (Col-0 ecotype). Curiously, we found that this isolate was able to overcome the RTM resistance mechanism reported for the Col-0 ecotype as compared with TEV-7DA, which is susceptible to RTM. However, when using eIF(iso)4E knockout plants, no systemic spread of TEV-TAMPS could be observed. The finding that TEV-TAMPS was able to overcome RTM only in the presence of eIF(iso)4E prompted us to investigate whether eIF(iso)4E was involved in the systemic spread of this isolate or in either viral translation, replication, or both. After sequencing the TEV-TAMPS VPg and coat protein (CP), we found particular amino acid changes in variable regions of these proteins, as compared with other TEV isolates deposited in the GeneBank database, mostly from the Americas (Allison et al. 1985; Chu et al. 1995) but one from Asia. Translation of TEV-TAMPS was not importantly affected by the absence or overexpression of eIF(iso)4E. However, the presence of eIF(iso)4E was required for the TEV-TAMPS systemic spread in *A. thaliana*. Finally, although the VPg precursor NIa was found in vivo in coimmunoprecipitated complexes with both eIF(iso)4E and eIF4E, the viral CP was only present in the eIF(iso)4E complexes. Since both the VPg and the CP proteins are needed for the systemic viral movement, we propose that eIF(iso)4E is required for the systemic spread of TEV-TAMPS.

RESULTS

A Mexican TEV isolate is able to overcome the RTM resistance mechanism of an *A. thaliana* Col-0 ecotype.

The RTM resistance mechanism reported for *A. thaliana* Col-0 ecotype affects the systemic spread of TEV, LMV, and PPV (Chisholm et al. 2001; Cosson et al. 2010; Mahajan et al. 1998). The viral isolates tested in these reports moved cell-to-cell in inoculated leaves but did not move systemically. For the same viruses, the cap-binding protein eIF(iso)4E has been identified as a factor required for successful infection (Robaglia and Caranta 2006).

Here, we tested whether a Mexican TEV isolate (TEV-TAMPS) was able to infect an *A. thaliana* Col-0 ecotype, previously reported to have the RTM resistance mechanism, as compared with the C24 ecotype. Additionally, eIF(iso)4E knockout mutant plants in the Col-0 ecotype background were tested to find at which level this factor is required in the viral

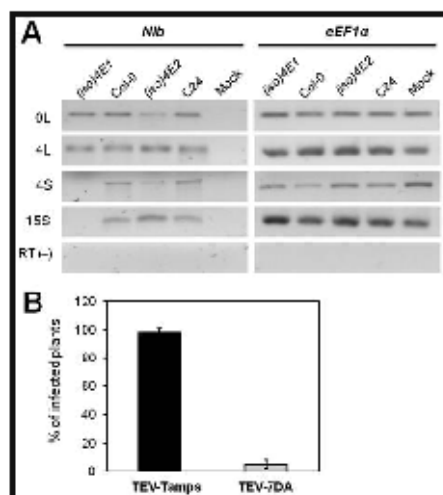


Fig. 1. *Arabidopsis thaliana* infection with a Mexican *Tobacco etch virus* (TEV) isolate (TEV-TAMPS). **A**, The TEV-TAMPS RNA was detected by final point reverse transcription-polymerase chain reaction in local (L) and systemic (S) leaves of wild-type Col-0 ecotype (Col-0), *AtEIF(iso)4E-1* knockout mutant ([*iso*4E1]), *AtEIF(iso)4E-2* overexpressing mutant ([*iso*4E2]), and wild-type C24 ecotype (C24) after inoculation (0L) and at 4 and 15 days postinoculation (4L, 4S, and 15S). The viral RNA was present in systemic leaves of Col-0, [*iso*4E2], and C24 wild-type plants at 4 and 15 days postinoculation but was undetectable in systemic tissues of the [*iso*4E1] knockout mutant. Mock = leaves inoculated with virus-free inoculation buffer; eIF1 α = the elongation factor 1 α , which was used as an internal control; RT (-) = reaction without reverse transcriptase. **B**, The percentage of *A. thaliana* Col-0 plants systemically infected with TEV-TAMPS or TEV-7DA isolates. Viral presence was measured with enzyme-linked immunosorbent assay against TEV coat protein.

infection. The TEV-TAMPS viral RNA was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at 4 days after inoculation (dpi) on either local or systemic leaves of wild-type Col-0 and C24 plants (Fig. 1A). At 15 dpi, TEV-TAMPS was detected at similar levels in the systemic leaves of both ecotypes. Interestingly, the TEV-TAMPS RNA was not detected in the systemic leaves of *Atelf(iso)4E-1* mutant (*[iso]4E-1*), previously reported as resistant to potyvirus infection (Duprat et al. 2002).

The ability of TEV-TAMPS to systemically spread in Col-0 wild-type (WT) plants was compared with TEV-7DA at 15 dpi, using CP quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Fig. 1B). This experiment was performed with 20 plants per isolate in three independent experiments. Each plant was tested in duplicate technical replicate. The viral CP was detected in systemic leaves of only two from the 20 TEV-7DA-inoculated plants, whereas 19 of 20 of the TEV-TAMPS-inoculated plants gave systemically positive signal. These observations indicated that TEV-TAMPS but not TEV-7DA was able to overcome the RTM resistance mechanism reported for *A. thaliana* Col-0 (Mahajan et al. 1998). Although the molecular basis of RTM has not yet been discovered and the particular viral targets for this host defense mechanism are not known, several evidences have shown that the viral Nla protein and the CP are necessary for systemic spread of the virus (Dolja et al. 1995; Urcuqui-Inchima et al. 2001). Hence, amino acid changes in these proteins could be associated with the RTM overcome in *A. thaliana*, as has been shown for the PPV CP amino terminal region (Decroocq et al. 2009).

Amino acid differences within VPg and CP of TEV-7DA and TEV-TAMPS isolates in the context of other TEV isolates.

To find out whether TEV-TAMPS carries particular mutations as compared with those reported for TEV-7DA, the regions corresponding to these two proteins were sequenced. The TEV-TAMPS VPg and CP (GenBank accessions JX512812, *MX_TAMPS* and JX512813, *MX_TAMPS*, respectively) were aligned with sequences from TEV isolates available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, including accessions reported as unable to spread systemically in the *A. thaliana* Col-0 ecotype, such as TEV-7DA (*US_7DA_DQ986288*), TEV-HAT (*US_HAT_M11458*), *US_M15239*, *US_NW_L38714*, and *VE_CT8_EU334787*, as well as isolates for which the ability of systemic movement in *A. thaliana* has not been described. Several amino acid substitutions were found, particularly in a variable core region and in a less variable one at the carboxy terminus of the VPg sequence (Supplementary Fig. S1). These substitutions lie outside the region reported to interact with *elf(iso)4E* or the viral RNA. The alignment of CP sequences showed high variability, particularly at the TEV-TAMPS amino-terminal region near to the DAG motif needed for aphid transmission (Supplementary Fig. S2), as has been shown for other potyviruses (Rybicki and Shukla 1992; Silva-Rosales et al. 2000).

Using the above alignments, the evolutionary relatedness between TEV-TAMPS and other TEV isolates affected by the RTM mechanism was inferred from phylogenetic analysis using the Geneious alignment and tree builder, with the Jukes-Cantor genetic distance model and the neighbor-joining method. The phylogenetic tree based on the VPg sequence showed separated groups for isolates from two countries in North America (the United States and Mexico) and one in South America (Venezuela) (Fig. 2A). Viral isolates affected by the RTM resistance mechanism (*US_7DA_DQ986288* and *US_HAT_M11458*) grouped together. TEV-TAMPS (*MX_TAMPS_JX512812*), overcoming the RTM resistance mechanism, stood

alone on a separate branch of the other Mexican isolates, whose ability to spread systemically in the *A. thaliana* Col-0 ecotype is not known. The same applies for the Venezuelan isolates that form another group.

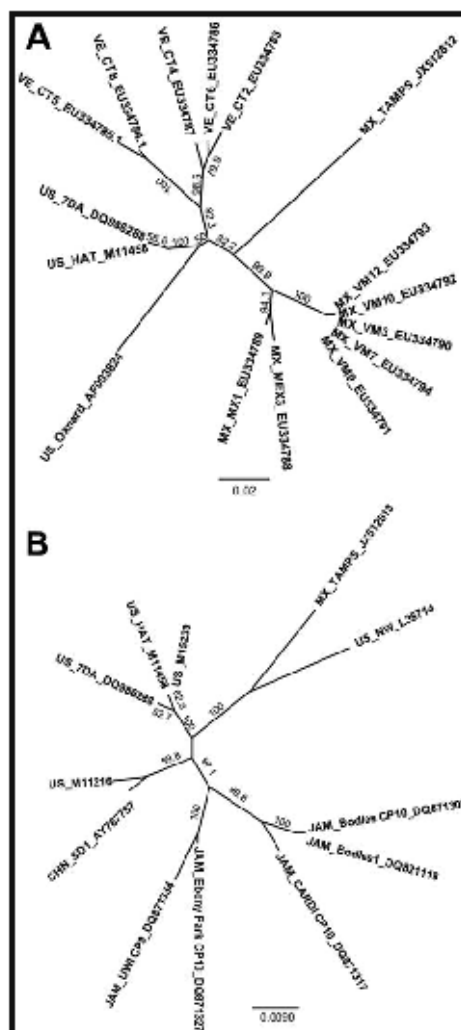


Fig. 2. Phylogenetic relationship of Tobacco etch virus (TEV) isolates based on the amino acid sequences of A, viral genome-linked protein (VPg) and B, coat protein (CP). The TEV-TAMPS VPg branch (*MX_TAMPS_JX512812*) was distant from the group of TEV-7DA, and TEV-HAT isolates reported as susceptible to the *Arabidopsis thaliana* Col-0 restriction of Tobacco etch virus (TEV) movement mechanism (*US_7DA_DQ986288* and *US_HAT_M11458*) and, curiously, from other Mexican isolates grouped together as well. According to the CP sequence, a single branch was formed between TEV-TAMPS (*MX_TAMPS_JX512812*) and *US_NW_L38714*, although the length of each line indicates a considerable distance between these isolates. In this case, a separate branch was formed by *US_7DA_DQ986288*, *US_HAT_M11458*, and *US_M15239*.

To see whether this phylogeny would also apply for the CP sequence, a similar analysis was done for this cistron. The analysis showed again that TEV-TAMPS clusters separately to the TEV isolates susceptible to RTM (Fig. 2B). In this case, a single group formed by TEV-TAMPS and the *US_NW_L38714* was observed, although the distance between these isolates is con-

siderable. For this phylogenetic tree, different Mexican isolates were not included, due to the unavailability of corresponding CP sequences.

eIF(iso)4E is not required for TEV-TAMPS RNA replication or stability in *A. thaliana* Col-0.

The interaction between eIF(iso)4E and the viral VPg has been proposed by several authors to participate in RNA stability, translation, or movement (Lellis et al. 2002; Okade et al. 2009). Additionally, eIF(iso)4E sequestration by VPg might impair translation of host mRNAs and promote viral RNA translation (Eskelin et al. 2011; Khan et al. 2008). To further understand the potential role of eIF(iso)4E in TEV-TAMPS infection of *A. thaliana*, the replication and presence of viral RNA was evaluated in local and systemic leaves of plants inoculated with semipurified viral particles obtained as described below. In addition to the knockout line (*iso*4E-1), an eIF(iso)4E-overexpressing line on Col-0 ecotype background, (*iso*4E-2), was included in the analysis. Accumulation of the virus positive and negative RNA strands was quantified by real time quantitative (q)RT-PCR in local leaves at 0 and 4 dpi as well as in systemic leaves at 4 and 15 dpi (Fig. 3A and B). The positive RNA level in local leaves at 0 dpi (discussed below) was employed as the reference for each line used in the experiment. It must be noted, here, that the inoculum, despite intense washing, importantly contributed to the number of virus-positive strands detected in the inoculated leaves, particularly at 0 dpi (Fig. 3A), but not to the negative strands (Fig. 3B).

The results indicated that TEV-TAMPS accumulation in local leaves at 4 dpi was impaired in the (*iso*4E-1) knockout mutant and enhanced in the (*iso*4E-2)-overexpressing mutant as compared with the Col-0 WT plants (Fig. 3A and B). Accumulation of the viral strands in systemic leaves at 4 and 15 dpi was not detected in the (*iso*4E-1) mutant plants, in contrast to WT and the (*iso*4E-2)-overexpressing mutant. Again, and taking together the data of positive and negative viral strands, viral accumulation in systemic leaves was enhanced in (*iso*4E-2) (Fig. 3A and B). These observations indicate that eIF(iso)4E is not strictly required for the replication of TEV-TAMPS RNA in local leaves, as it is in the case of TuMV and LMV inoculations (Duprat et al. 2002), but it is indispensable for the TEV-TAMPS systemic dispersion.

A. thaliana inoculation with TEV-TAMPS was not associated with visible symptoms of viral infection. Therefore, to test whether the systemic spread is able to produce viral proteins, a Western blot with commercially available TEV CP antiserum was performed on local and systemic leaves (Fig. 3C). The observed results were consistent with the behavior of positive and negative RNA strands (Fig. 3A and B), and the CP level in systemic tissues was similar in the cases of Col-0 WT and (*iso*4E-2) plants. CP was not detected in systemic leaves of the (*iso*4E-1) knockout. These data further confirm that eIF(iso)4E is required for the TEV-TAMPS movement.

Arabidopsis thaliana eIF(iso)4E is not required for TEV-TAMPS RNA translation.

We evaluated the translational efficiency of TEV-TAMPS in the presence or lack of eIF(iso)4E to determine whether this particular factor is able to enhance translation of the viral RNA in planta. For this assay, inoculated *A. thaliana* leaves, at 4dpi, from (*iso*4E-1), (*iso*4E-2), and WT plants were used. The distribution of viral RNA was measured along sucrose density gradients (polysomal fractionation), using qRT-PCR of a region corresponding to the CP RNA. The mRNAs efficiently initiated for translation are found on polyribosomes (high sucrose concentration), whereas a decrease in translation initiation shows a shift towards nonpolyribosome (fractions with

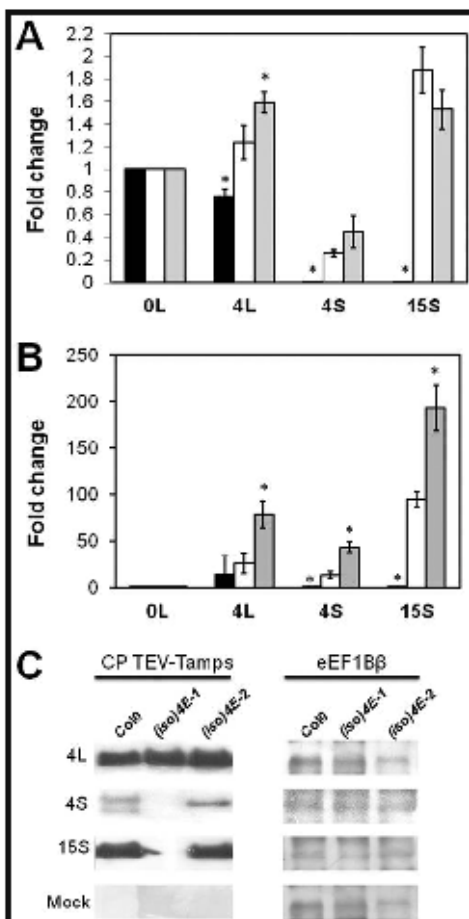


Fig. 3. Effect of absence or overexpression of eIF(iso)4E on TEV-TAMPS RNA accumulation. **A**, The TEV-TAMPS positive or **B**, the negative RNA strand was quantified by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in inoculated *Arabidopsis thaliana* plants from ecotype Col-0 wild-type (white bars), (*iso*4E-1) knockout (black bars), and (*iso*4E-2) overexpressing (gray bars) plants. For quantification, total RNA was extracted from local leaves (0L, 0 days postinoculation [dpi]; 4L, 4 dpi) and systemic leaves (4S, 4 dpi; 15S, 15 dpi). The *eEF-1α* mRNA was used as internal control for normalization and the 0L value was considered as basal line in order to represent the rest of samples as fold of change with respect to the inoculated viral RNA. Asterisks (*) indicate the difference was statistically significant at $P < 0.05$. **C**, Immunoblots of total protein extracts from local or systemic leaves of TEV-TAMPS inoculated plants, as described in the upper part of the figure, were performed with anti-coat protein (CP) serum to detect *Tobacco etch virus* (TEV) or with anti-eEF1Bβ serum as loading control.

lower sucrose concentration). The profiles during fractionation were similar for WT, *(iso)4E-1*, and *(iso)4E-2* plants (Fig. 4A), indicating that there were no meaningful changes on global translation levels by the absence or overexpression of eIF(iso)4E. The viral RNA was found in free RNA particles (fractions 2 to 4) and polyribosomal fractions with a peak of abundance between fractions 10 and 14 (Fig. 4B). This indicates that only a fraction of the total positive RNA strand is subjected to active translation in the absence, presence, or overexpression of eIF(iso)4E. The distribution of viral RNA appeared mostly unaltered in *(iso)4E-1* and *(iso)4E-2* lines as compared with WT. The distribution of a cellular mRNA used as control, the eukaryotic elongation factor 1 α (*eEF1 α*) mRNA, was found mostly in heavy polysomes (Fig. 4), indicating that it is efficiently translated in the presence of the viral RNA, regardless of the eIF(iso)4E levels. The presence of viral RNA in the fractions corresponding to polysomes was dependent on ribosome association as shown by puromycin polysome-disrupting treatments (Supplementary Fig. S3). These results do not support the hypothesis that TEV-TAMPS VPg interaction with eIF(iso)4E impairs translation of endogenous transcripts or enhances its own translation, at least in the *A. thaliana* host. Moreover, it was confirmed that eIF(iso)4E is not required for TEV-TAMPS translation.

TEV-TAMPS CP and VPg are found in complexes with *A. thaliana* eIF(iso)4E in planta.

The eIF(iso)4E factor has been previously associated with potyvirus translation and replication (Cotton et al. 2009; Khan

et al. 2006, 2008). However, in this work we obtained evidence that, in *A. thaliana*, the eIF(iso)4E absence or overexpression does not affect translation (association to polysomes). Moreover, eIF(iso)4E absence does not impede virus replication in local leaves. Nevertheless, eIF(iso)4E is required for the viral movement, either cell to cell or at long distance, and its systemic spread. Therefore, we asked whether eIF(iso)4E is particularly associated to viral proteins involved in the systemic spread. This interaction was tested by coimmunoprecipitation assays using protein extracts from *(iso)4E-1*, *(iso)4E-2*, and WT local leaves at 4 dpi. Three immunoprecipitations were performed using the antibody for *A. thaliana* eIF(iso)4E (IP-[iso]4E) or eIF4E (IP-4E) and the antibody against TEV CP. The immunoprecipitated protein complexes were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), were blotted, and were detected with antibodies against eIF(iso)4E, eIF4E, CP, and Nla (Fig. 5).

The Western blot against eIF(iso)4E and eIF4E in IP-[iso]4E and IP-4E demonstrated that the antibodies are able to specifically distinguish each isoform without cross-reactivity and, hence, each immunoprecipitate is expected to contain protein complexes specific for each isoform. eIF(iso)4E was not detected in *(iso)4E-1* plants, and none of the other Western assays showed a detectable product for the IP-[iso]4E of the knockout (Fig. 5 second panel). Detection with either α -CP or α -Nla in the same immunoprecipitate rendered a positive signal for WT and *(iso)4E-2* but not in the *(iso)4E-1* knockout, indicating specific coimmunoprecipitation of both viral proteins in complex with eIF(iso)4E. To corroborate the specificity of this

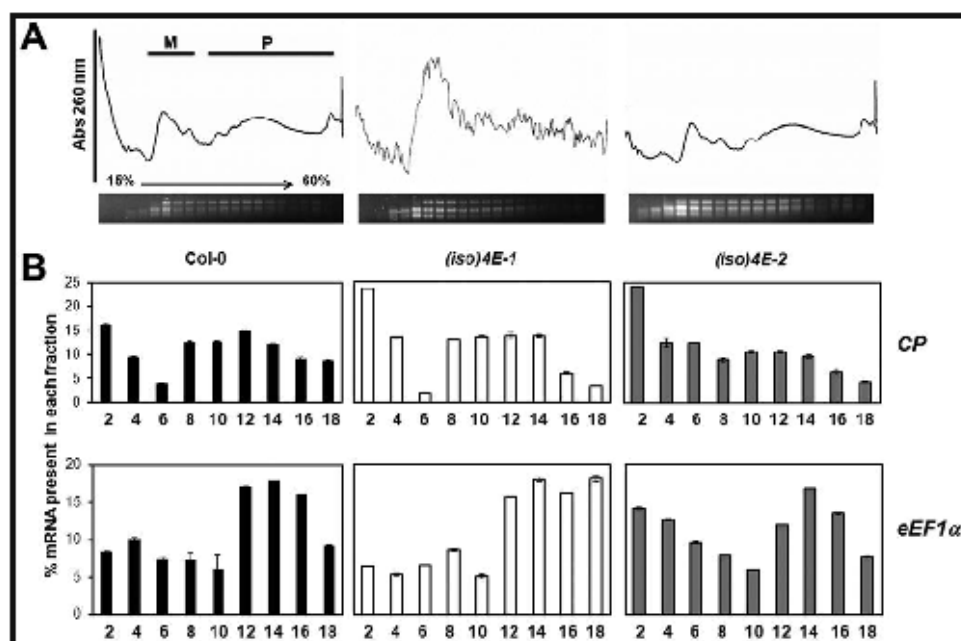


Fig. 4. Quantitation of TEV-TAMPS RNA in polysomal fractions from *Arabidopsis thaliana* wild-type Col-0 (black bars), *(iso)4E-1* knockout (white bars), and *(iso)4E-2* overexpressing (gray bars) plants. **A.** The polysomal fractionation was performed on continuous sucrose gradients (15 to 60%), and profiles were detected at 260 nm. **B.** The RNA isolated from each fraction (pair numbers) was subjected to quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction for the viral RNA (CP), and cellular *eEF1 α* RNA. The percentage of RNA corresponding to each sucrose fraction is shown. The distribution of viral RNA along the profile was not affected in the *(iso)4E-1* knockout or *(iso)4E-2* overexpressing mutants, similar to the behavior of the cellular mRNA in mono (M) and poly (P) pools.

interaction, immunoprecipitation assays using α -CP or α -eIF4E were performed with protein extracts from 4-dpi TEV-TAMPS local leaves. The CP was detected in immunoprecipitation assays of all plants, since the extract was obtained from local leaves. However, eIF(iso)4E and NIa were immunodetected only in the immunoprecipitation assays from WT and (iso)4E-2 plants (Fig. 5, third panel). On the other hand, immunodetection performed with the same antibodies of IP-4E complexes returned positive for eIF4E and NIa but not CP and eIF(iso)4E (Fig. 5, fourth panel). These data suggest the presence of at least two different viral protein complexes, one involving CP, NIa, and eIF(iso)4E, the other one including NIa and eIF4E. The antibody against NIa includes the portion corresponding to VPg, and the band detected in immunoprecipitates was about 26 kDa, indicating that the protein found in these complexes is actually VPg. Therefore, TEV-TAMPS VPg is able to interact in planta with either eIF(iso)4E or eIF4E from *A. thaliana*, similar to reports of previous in vitro and in vivo studies with VPg from other potyviruses (Grzela et al. 2006).

DISCUSSION

Members of the translation initiation factor eIF4E family constitute a major group of host-recessive resistance genes for potyviruses (Nicaise et al. 2007; Piron et al. 2010; Robaglia and Caranta 2006; Ruffel et al. 2002). Several genetic and biochemical approaches have demonstrated that the VPg is the predominant factor mediating the eIF4E resistance and susceptibility mechanism. Based on the eIF4E function in eukaryotic translation and on the observed VPg interference of its binding to a Cap (7mGTP) analogue or during in vitro mRNA translation (Grzela et al. 2006; Khan et al. 2008), it has been proposed that the resistance mechanism mediated through eIF4E family members is at the level of viral translation enhancement,

cellular translation inhibition, or both. However, other evidences argue against this proposal. One of these is the presence of an internal translation initiation mechanism promoted by specific regions found in the 5' untranslated region of several potyviral RNAs able to efficiently support in vitro translation by directly binding other initiation factors, such as eIF4G or eIF(iso)4G, without the presence of eIF4E or eIF(iso)4E (Gallie 2001; Ray et al. 2006). The other is that inhibiting cellular translation through eIF4E sequestration by VPg, as has been demonstrated by in vitro and, recently, in vivo experiments (Eskelin et al. 2011; Miyoshi et al. 2008), would not fully explain the specificity of the virus requiring a particular eIF4E isoform depending upon the host.

In this work, we aimed to dissect the level of eIF(iso)4E participation in the infection of *A. thaliana* with a Mexican isolate of the TEV named TEV-TAMPS. When analyzing inoculations of TEV-TAMPS in *A. thaliana* Col-0 WT and eIF(iso)4E knockout plants, we noticed that this isolate reproducibly overcame the RTM mechanism only in the WT plants. TEV-TAMPS mutations in VPg and CP, both proteins involved in the systemic movement of potyviruses, might be responsible for overcoming resistance mechanisms such as RTM and allowing the infection of *A. thaliana*. Recent publications support this idea, showing that amino acid substitutions, particularly at the N-terminus of CP, are determinants for the ability of LMV and PPV isolates to break the RTM resistance mechanism in *A. thaliana* (Decroocq et al. 2009). Furthermore, mutations in the VPg protein from TuMV have been shown to be sufficient to break the resistance imposed by *A. thaliana* eIF(iso)4E or eIF(iso)4G knockout mutants by a mechanism independent of its interaction with these factors (Gallois et al. 2010).

The null mutation for eIF(iso)4E in *A. thaliana* (Duprat et al. 2002) was previously reported as resistant to both TuMV and LMV, even at local tissues. The observation that TEV-TAMPS is able to overcome the RTM mechanism only in the

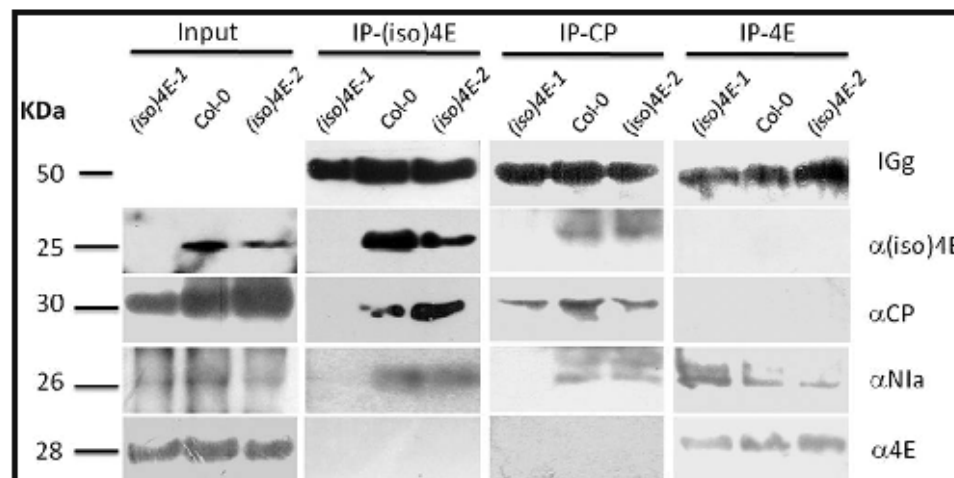


Fig. 5. Interaction of *Arabidopsis thaliana* Col-0 eIF(iso)4E and eIF4E with TEV-TAMPS proteins. Immunoprecipitation assays were performed using total protein extracts obtained from local leaves of *A. thaliana* wild-type Col-0, (iso)4E-1 knockout, and (iso)4E-2 overexpressing plants at 4 days postinoculation. Immunoprecipitates (IP) with α -CP-TEV, α -(iso)4E, and α -4E, as well as 10 μ g of total protein extract (Input) were resolved with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and were immunoblotted against α -CP-TEV, α -NIa-TEV (which also recognizes viral genome-linked protein [VPg]), α -(iso)4E and α -4E. IP with α -(iso)4E (IP-(iso)4E) contained complexes formed by *A. thaliana* eIF(iso)4E and the coat protein (CP) (30 kDa) and VPg (26 kDa) viral proteins but not the *A. thaliana* eIF4E protein. Reciprocally, the IP with α -CP (IP-CP) contained the same proteins. The IP with α -4E (IP-4E) did not show the presence of viral CP or *Arabidopsis* eIF(iso)4E but displayed a positive signal for the viral VPg (in α -NIa).

presence of eIF(iso)4E but is detected in local tissues regardless the eIF(iso)4E presence allowed us to study in planta the viral translation, replication, and systemic spread. Our results indicated that abolishment of eIF(iso)4E did not impede TEV-TAMPS RNA accumulation in local leaves, although overexpression of this protein positively influenced, to some extent, viral replication in both local and systemic leaves (Fig. 3). Such observation is consistent with previous findings describing the presence of eIF(iso)4E and other translational factors, such as the PolyA binding protein 2 (PABP2) and the translation elongation factor 1A (eEF1A) in large vesicles associated with viral replication (Cotton et al. 2009; Hafren et al. 2010). However, TEV-TAMPS replication was not strictly dependent on the eIF(iso)4E presence, since the knockout mutant presented newly synthesized negative RNA strands in local leaves (Fig. 3B). In addition, this mutant did not show impairments in global cellular translation or in the viral RNA translation (Fig. 4), ruling out the requirement of eIF(iso)4E for these steps in the viral infective cycle, at least for the TEV-TAMPS-*Arabidopsis* system. Other work makes reference to two different sites within eIF4E that independently bind VPg and the Cap analogue m⁷GDP with similar affinity in vitro. The VPg-binding site would be different but structurally related to the CAP-binding site and reduces the mRNA Cap affinity (Michon et al. 2006). Similar interactions could occur with the TEV-TAMPS VPg and eIF(iso)4E of *A. thaliana* Col-0 but probably without a reduction in the mRNA Cap affinity, as there was not an interference with host mRNA translation.

Using co-immunoprecipitation assays, we were able to detect the TEV-TAMPS VPg in either eIF(iso)4E or eIF4E complexes. However, we found the viral CP only in the eIF(iso)4E complexes (Fig. 5). The presence of CP only in the eIF(iso)4E-dependent protein complex has not been previously reported and could correlate with the requirement of this specific isoform for the viral movement in *A. thaliana*. Whether the interaction between eIF(iso)4E and CP is direct or is supported by other proteins within the complex remains to be solved. However, it is unlikely that VPg would recruit CP in the complex, since we found VPg but not CP in the eIF4E-bound complexes. Taking into account that both CP and VPg are proteins required for viral movement, we propose that particular complexes formed by eIF(iso)4E and these proteins are involved in the systemic spread of TEV-TAMPS. In the absence of eIF(iso)4E, such complexes could not be formed, hence, the viral movement is restricted.

Previous reports have described the interaction between eIF(iso)4E and TuMV VPg or its precursors VPg-Pro (N1a) and 6K-VPg-Pro (6K-N1a), suggesting a role in the disruption of cellular functions or in viral translation or replication (Beauchemin et al. 2007; Cotton et al. 2009). *A. thaliana* is a TuMV-susceptible plant showing severe symptoms upon infection with this potyvirus. The same plant species could be infected by TEV-TAMPS isolates without developing any obvious symptoms. For both TuMV and TEV *A. thaliana* susceptibility, the requirement of eIF(iso)4E has been demonstrated (Duprat et al. 2002; Lellis et al. 2002). However, whereas the presence of TuMV RNA could not be detected in the inoculated leaves of an *A. thaliana* eIF(iso)4E knockout (Duprat et al. 2002), viral products from TEV-TAMPS could be observed in local leaves when compared with WT plants, even though the inoculated virus might account for the majority of the detected RNA. Therefore, replication of TuMV strands may be strictly dependent on eIF(iso)4E, whereas replication of TEV, although negatively affected, still occurs in the absence of eIF(iso)4E.

The analysis of CP and VPg sequences reveals that specific amino acid changes may be responsible for the ability of TEV-TAMPS to overcome the RTM resistance mechanism. It will

be interesting to get a further insight in the phylogeny of these proteins, when more sequences for both proteins are available from the same isolates in different geographic regions. Noticeably, TEV-TAMPS VPg interacts with both eIF(iso)4E and eIF4E in planta. However, each isoform is apparently involved in different complexes with the viral proteins, leading us to conclude that they probably exert different roles within the viral life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Plant and virus materials.

Arabidopsis thaliana Columbia 0 (Col-0) ecotype was used as WT as well as the genetic background for the eIF(iso)4E knockout *AtEIF(iso)4E-1* (Duprat et al. 2002) and the eIF(iso)4E-overexpressing mutant *AtEIF(iso)4E-2* (Martinez-Silva et al. 2012) lines. For some experiments, the ecotype Columbia 24 (C24) reported as susceptible to the TEV systemic movement was used (Mahajan et al. 1998). Individual plants were grown in pots with Metromix 200 substrate and were kept at 23°C, under 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity, with an 8-h light and 16-h dark photoperiod, for 6 weeks before inoculation.

TEV-TAMPS was used for inoculation of all plants. TEV-TAMPS from the federal Mexican state of Tamaulipas was propagated in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi plants (6 weeks old) and were maintained under standard greenhouse conditions. The TEV-7DA isolate used in this work was expressed from a p35TEV plasmid previously reported (Bedoya and Daros 2010) and was propagated in *N. tabacum* cv. Xanthi plants (6 weeks old) under greenhouse conditions. TEV-TAMPS and TEV-7DA viral particles were partially purified from *N. tabacum* symptomatic leaves, according to a procedure previously described (Gopalan 2007). The amount of viral particles was determined using ELISA quantitation with α -CP-TEV (Agdia Inc., Elkhart, IN, U.S.A.). Six-week-old rosette leaves from *A. thaliana* plants were mechanically inoculated using a cotton swab tip with estimated similar amounts of viral particles.

Total RNA isolation and TEV-TAMPS detection by final point RT-PCR.

Total RNA from *A. thaliana* and *N. tabacum* plants was extracted using the Trizol method (Invitrogen Corp.; San Diego, CA, U.S.A.) and following the manufacturer's indications. The concentration was quantified by measuring absorbance at 260 nm, and its quality was verified by electrophoresis on a 1% agarose gel. The reverse transcription reaction was performed with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Corp.) according to the manufacturer's instructions, using 1 μg of total RNA. Oligo dT was used as primer in the reverse transcriptase reaction. PCR assays were performed with recombinant *Taq* polymerase (Invitrogen Corp.) following the manufacturer's instructions, using the appropriate primers as described in Supplementary Table S1. The amplified products were resolved on a 1% agarose gel electrophoresis.

Polysomal RNA purification and analysis.

The separation of polysomal complexes was performed using 2 g of TEV-inoculated leaves, according to a previously described protocol (Davies and Abe 1995), adapted to *A. thaliana* (Martinez-Silva et al. 2012). After concentrating through a 60% sucrose cushion, ribosome-bound RNA was loaded on 15 to 60% sucrose gradients and was centrifuged for 2 h at 4°C in a SW-55 rotor at 250,000 $\times g$. Nine fractions were separated with an Auto Densi-flow system (Labconco, Kansas City, MO, U.S.A.) coupled to a 260 nm absorbance detector Econo UV Monitor EM-1 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) and a plotter LKB BROMMA 2210 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) to

obtain the polysomal profiles. The RNA was extracted from each fraction using phenol-chloroform. The treatment with puromycin was done by adding GTP buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 400 mM KCl, 3 mM MgCl₂, and 0.5 mM puromycin) to the pellet obtained after the 60% sucrose cushion centrifugation and incubating for 45 min at 37°C. Afterwards, the extract was run through a 15 to 60% sucrose gradient.

qRT-PCR.

RNA (2 µg) were treated with RQ1 DNase (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.) and were reverse-transcribed using M-MLV-RT (Invitrogen). The qPCR was performed with qTEV primers designed with the aid of the "Primer Tools" within the Geneious program). *eEF-1α* was used as an internal normalizing control gene. For the negative viral-strand quantitation, the 5' forward oligonucleotide TEV3 was used in the reverse transcriptase reaction. The PCR amplification was performed in a 7500 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.), using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) for signal detection. The relative viral expression was calculated after normalization with the reference gene (*eEF-1α*), using the 2^{-ΔΔC_T} method and was represented as fold of change with respect to the inoculated RNA (either positive or negative strand) collected from the local leaves 2 h after inoculation. To avoid with the quantification of inoculated viral particles that did not enter the plant cells, the local leaves were extensively washed with virus-free solution and, afterwards, were subjected to RNA isolation or were further grown under standard conditions to collect local leaves at 4 dpi and systemic leaves at 4 or 15 dpi. Tukey honestly significant difference analysis (*P* < 0.05) was performed on the data to estimate statistical differences between the three *A. thaliana* lines (WT, [iso]4E-1, and [iso]4E-2). The quantification of viral RNA distributed along polysomal fractions, obtained by sucrose gradients, was performed as described previously (Dinkova et al. 2005; Martínez-Silva et al. 2012), and the percentage of the RNA in nonpolysomal and polysomal fractions was determined.

Immunoblot and ELISA assays.

Total proteins were extracted by grinding 500 mg of leaf tissue and homogenizing it in 500 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 2% PTE (polyoxyethylene [10] tridecyl ether), 1% Igepal, and 5 µg of cycloheximide per milliliter, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 1 mM orthovanadate). After centrifugation (12,000 × g, 5 min), the supernatant was recovered, and the concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad), using bovine serum albumin as standard. After SDS-PAGE, 5 µg of total proteins were used directly for immunoblot analysis. The α-eIF4E and α-eIF(iso)4E antibodies supplied by K. S. Browning from the Department of Chemistry and Biochemistry, University of Texas at Austin, were used at 1:10,000 dilution. The α-CP-TEV (Agdia Inc.) was used at 1:10,000 dilution, and the α-Nla antibody (from W. Dougherty) was used at 1:15,000 dilution. The antigen-antibody complexes were detected using a horseradish peroxidase-coupled goat α-rabbit immunoglobulin G (IgG) according to the manufacturer's recommendations. Immunoreactive bands were detected with Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

For ELISA experiments, 100 µg of total proteins obtained from uninfected or infected (15 dpi) systemic leaves of *A. thaliana* Col-0 with TEV-TAMPS or TEV-7DA were incubated, with α-CP-TEV (Agdia) as capture antibody at 1:500 dilution. As secondary antibody, an alkaline phosphatase-coupled goat α-rabbit IgG was used at a 1:1,000 dilution. The activity of alkaline phosphatase was indirectly estimated at 450 nm using

NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt) in carbonate buffer (0.1 M NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9.8) as substrate.

Immunoprecipitation assays.

To evaluate interactions between eIF(iso)4E and viral proteins, 3 g of local or systemic leaves were ground. The slurry was transferred to 15-ml tubes with 5 ml of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 50 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, heparin at 100 µg/ml, 2% PTE, 1% Igepal [previously Nonidet P40], and cycloheximide at 5 µg/ml, 1 mM DTT, and 1 mM orthovanadate). The extracts were vigorously mixed and were centrifuged for 15 min at 10,000 × g at 4°C. The upper clear supernatant was used to perform immunoprecipitation assays according to a previous report (Peritz et al. 2006), using Protein Agarose A (Millipore). The α-eIF(iso)4E, α-CP-TEV, and α-eIF4E antibodies were used at 1:1,000 dilutions. The total protein extracts (Input) and the immunoprecipitates were analyzed by immunoblots.

TEV-TAMPS VPg and CP sequencing and phylogenetic analysis.

The TEV-TAMPS isolate was obtained from *Capsicum annum* cultivars in the county of Tampico Madero in the federal state of Tamaulipas, Mexico. The nucleotide sequences of VPg and CP were obtained after RT-PCR amplification, using specific oligonucleotides and cloning into pGEM-T Easy vector (Promega Corp.). Both sequences were cured using the BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.9.0 for Windows, and were tested against GenBank sequences using the Blast software freely accessible on the NCBI website. The sequences were manually assembled and deposited in the GenBank database with the following accession numbers: TEV-TAMPS VPg, *JX512812_MX_TAMPS*; TEV-TAMPS CP, *JX512813_MX_TAMPS*.

Available VPg and CP sequences from other TEV isolates were obtained from GenBank. Unfortunately, CP sequences were not available for all accessions used in the VPg analysis and vice versa. Nucleotide sequences for both VPg and CP cistrons were aligned using Geneious Pro 4.8.3 created by Biomatters (available from the Biomatters Geneious Pro website) with the Clustal W algorithm (Larkin et al. 2007) and cost matrix with gap extension cost of 100. The aligned nucleotide sequences were further translated *in silico*, with the same program, and were used with the Geneious tree builder with the Jukes-Cantor genetic distance model and the neighbor-joining method. A bootstrapping with a random seed of 500,000 and 1,000 replicates and no outgrouping was used. The consensus tree was selected with a threshold of 50.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to T. D. Dinkova (PAPIT IN204309, IN210912 and CONACYT 81708) and L. Silva-Rosales (Cinvestav funds). J.-A. Daròs was funded by grant BIO2011-26741 (MEC, Spain). C. A. Contreras-Paredes and N. D. Alejandri-Ramírez were awarded with a fellowship from CONACYT for their Ph.D. studies. The authors are thankful to W. Dougherty for the Nla-TEV antibody and K. Browning (University of Texas at Austin) for *Arabidopsis* eIF(iso)4E and eIF4E antibodies.

LITERATURE CITED

- Allison, R. F., Dougherty, W. G., Parks, T. D., Willis, L., Johnston, R. E., Kelly, M., and Armstrong, F. B. 1985. Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147:309-316.
- Ashby, J. A., Stevenson, C. E., Jarvis, G. E., Lawson, D. M., and Maule, A. J. 2011. Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to

- shn1* resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea. *PLoS ONE* 6:e15873. Published online.
- Beauchemin, C., Boutet, N., and Laliberté, J. F. 2007. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso4E in *Planta*. *J. Virol.* 81:775-782.
- Bedoya, L. C., and Duros, J. A. 2010. Stability of *Tobacco etch virus* infectious clones in plasmid vectors. *Virus Res.* 149:234-240.
- Browning, K. S. 2004. Plant translation initiation factors: It is not easy to be green. *Biochem. Soc. Trans.* 32:589-591.
- Carrington, J. C., and Whitham, S. A. 1998. Viral invasion and host defense: Strategies and counter-strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:336-341.
- Cosson, P., Sofer, L., Hien Le, Q., Leger, V., Schurdi-Levrard, V., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., Gopalan, S., Le Gall, O., Candresse, T., Carrington, J. C., and Revers, F. 2010. *RTM3*, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a Meprin and TRAF Homology domain-containing protein. *Plant Physiol.* 154:222-232.
- Cosson, P., Schurdi-Levrard, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Le Gall, O., Candresse, T., and Revers, F. 2012. The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural variation of the *RTM* genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS ONE* 6:e29169. Published online.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T. Y., Wang, A. M., and 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. *J. Virol.* 83:10460-10471.
- Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. 2000. Cloning of the *Arabidopsis thaliana* *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of Tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:489-494.
- Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J., and Carrington, J. C. 2001. *Arabidopsis thaliana* *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of Tobacco etch virus. *Plant Physiol.* 127:1667-1675.
- Chu, M., Johnson, M., Thornbury, D., Black, L., and Pirone, T. 1995. Nucleotide sequence of a strain of Tobacco etch virus that does not cause Tobacco pepper wilt. *Virus Genes* 10:283-288.
- Chung, B. Y., Miller, W. A., Atkins, J. F., and Firth, A. E. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:5897-5902.
- Davies, E., and Abe, S. 1995. Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell Biol.* 50:209-222.
- Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J. M., Lansac, M., Eyraud, J. P., Garcia, J. A., Candresse, T., Le Gall, O., and Revers, F. 2006. Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:541-549.
- Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., Garcia, J. A., and Candresse, T. 2009. The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1302-1311.
- Dinkova, T. D., Aguilar, R., and Sanchez de Jimenez, E. 2000. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochem. J.* 351:825-831.
- Dinkova, T. D., Keiper, B. D., Korneeva, N. I., Azmodi, E. J., and Rhoads, R. E. 2005. Translation of a small subset of *Caenorhabditis elegans* mRNAs is dependent on a specific eukaryotic translation initiation factor 4E isoform. *Mol. Cell Biol.* 25:100-113.
- Dinkova, T. D., Marquez-Velazquez, N. A., Aguilar, R., Lázaro-Mixteco, P. E., and Sanchez de Jimenez, E. 2011. Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci. Res.* 21:85-93.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cabill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., and Carrington, J. C. 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206:1007-1016.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S., and Robaglia, C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32:927-934.
- Eskelin, K., Hafren, A., Rantalainen, K. I., and Makinen, K. 2011. Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation *in planta*. *J. Virol.* 85:9210-9221.
- Gallie, D. R. 2001. Cap-independent translation conferred by the 5' leader of Tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J. Virol.* 75:12141-12152.
- Gallois, J. L., Charron, C., Sanchez, F., Pagny, G., Houvenagel, M. C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C., and German-Retana, S. 2010. Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* 91:288-293.
- Gao, Z., Johansen, E., Eysers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H., and Maule, A. J. 2004. The potyvirus recessive resistance gene, *shn1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J.* 40:376-385.
- Gopalan, S. 2007. A multidirectional non-cell autonomous control and a genetic interaction restricting tobacco etch virus susceptibility in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2:e985. Published online.
- Gizela, R., Stokovska, L., Andrieu, J. P., Dublet, B., Zagorski, W., and Chroboczek, J. 2006. Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie* 88:887-896.
- Hafren, A., Hofius, D., Ronnholm, G., Sonnewald, U., and Makinen, K. 2010. HSP70 and its cochaperone CIP1 promote potyvirus infection in *Nicotiana benthamiana* by regulating viral coat protein functions. *Plant Cell* 22:523-535.
- Hwang, J., Li, J., Liu, W. Y., An, S. J., Cho, H., Her, N. H., Yeom, I., Kim, D., and Kang, B. C. 2009. Double mutations in eIF4E and eIF(iso)4E confer recessive resistance to *Chilli veinal mottle virus* in pepper. *Mol. Cells* 27:329-336.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:113-127.
- Jenner, C. E., Nellist, C. F., Barker, G. C., and Walsh, J. A. 2010. Turnip mosaic virus (TuMV) is able to use alleles of both eIF4E and eIF(iso)4E from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1498-1505.
- Kang, B. C., Yeom, I., Frantz, J. D., Murphy, J. F., and Jahn, M. M. 2005. The *pvr1* locus in *Capricorn* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant J.* 42:392-405.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N., and Goss, D. J. 2006. Interaction of genome-linked protein (VPg) of Turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4F. *J. Biol. Chem.* 281:28002-28010.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Gallie, D. R., and Goss, D. J. 2008. Potyvirus genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ *in vitro* translation: Interactions with translation initiation factors eIF4F and eIF(iso)4F. *J. Biol. Chem.* 283:1340-1349.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lellis, A. D., Kaschau, K. D., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. 2002. Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* 12:1046-1051.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J. F. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74:7730-7737.
- Mahajan, S. K., Chisholm, S. T., Whitham, S. A., and Carrington, J. C. 1998. Identification and characterization of a locus (*RTM1*) that restricts long-distance movement of Tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 14:177-186.
- Martinez-Silva, A. V., Aguirre-Martinez, C., Flores-Tinoco, C. E., Alejandri-Ramirez, N. D., and Dinkova, T. D. 2012. Translation initiation factor At(eIF)4E is involved in selective mRNA translation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *PLoS One* 7:e31606. Published online.
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S., and Le Gall, O. 2006. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA Cap analogue. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 273:1312-1322.
- Miyoshi, H., Okada, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K., and Natsuaki, T. 2008. Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits *in vitro* translation. *Biochimie* 90:1427-1434.
- Naderpour, M., Lund, O. S., Larsen, R., and Johansen, E. 2010. Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Mol. Plant Pathol.* 11:255-263.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and LeGall, O. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* 132:1272-1282.
- Nicaise, V., Gallois, J. L., Chafai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levrard, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O., and German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 581:1041-1046.

- Okada, H., Fujita, Y., Miyamoto, S., Tomoo, K., Muto, S., Miyoshi, H., Natsuaki, T., Rhoads, R. E., and Ishida, T. 2009. Turnip mosaic virus genome-linked protein VPg binds C-terminal region of cap-bound initiation factor 4E orthologue without exhibiting host cellular specificity. *J. Biochem.* 145:299-307.
- Peritz, T., Zeng, F., Kannanayakal, T. J., Kilk, K., Eiriksdottir, E., Langel, U., and Eberwine, J. 2006. Immunoprecipitation of mRNA-protein complexes. *Nat. Protoc.* 1:577-580.
- Piron, F., Nicolai, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., Zamir, D., Caranta, C., and Bendahmane, A. 2010. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS ONE* 5:e11313. Published online.
- Rajamaki, M. L., and Valkonen, J. P. 1999. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:1074-1081.
- Ray, S., Yamak, H., Domashevskiy, A., Khan, M. A., Gallie, D. R., and Goss, D. J. 2006. Tobacco etch virus mRNA preferentially binds wheat germ eukaryotic initiation factor (eIF) 4G rather than eIFiso4G. *J. Biol. Chem.* 281:35826-35834.
- Robaglia, C., and Caranta, C. 2006. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11:40-45.
- Rodriguez, C. M., Freire, M. A., Camilleri, C., and Robaglia, C. 1998. The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *Plant J.* 13:465-473.
- Roudes-Tavet, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. 2007. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HC-Pro. *J. Gen. Virol.* 88:1029-1033.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32:1067-1075.
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., and Caranta, C. 2005. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol. Genet. Genomics* 274:346-353.
- Ruud, K. A., Kuhlow, C., Goss, D. J., and Browning, K. S. 1998. Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273:10325-10330.
- Rybicki, E. P., and Shukla, D. D. 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. *Arch. Virol. Suppl.* 5:139-170.
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., and Uyeda, I. 2005. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 579:1167-1171.
- Silva-Rosales, L., Becerra-Leor, N., Ruiz-Castro, S., Teliz-Ortiz, D., and Noa-Carranza, J. C. 2000. Coat protein sequence comparisons of three Mexican isolates of papaya ringspot virus with other geographical isolates reveal a close relationship to American and Australian isolates. *Arch. Virol.* 145:835-843.
- Taliansky, M., Torrance, L., and Kalinina, N. O. 2008. Role of plant virus movement proteins. *Method Mol. Biol.* 451:33-54.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L., and Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Res.* 74:157-175.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C., and Wang, A. 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6:e1000962. Published online.
- Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. 1999. Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:772-777.
- Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T., and Carrington, J. C. 2000. *Arabidopsis RTM2* gene is necessary for specific restriction of Tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12:569-582.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCES

Biomatters Geneious Pro website: www.geneious.com
 NCBI Blast software: blast.ncbi.nlm.nih.gov/
 NCBI GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov