



## SUPRESIÓN VIRAL DEL SILENCIAMIENTO POR RNA EN PLANTAS

### VIRAL SUPPRESSION OF RNA SILENCING IN PLANTS

Yazmín Landeo-Ríos, Jesús Navas-Castillo,  
Enrique Moriones y M. Carmen Cañizares\*

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Universidad de Málaga. Estación Experimental "La Mayora". 29750, Algarrobo-Costa, Málaga, España.

\*Autor para correspondencia (carmen.canizares@eelm.csic.es)

#### RESUMEN

El silenciamiento por RNA en plantas es un mecanismo implicado en la regulación de la expresión génica que también funciona como defensa antiviral. El silenciamiento es inducido por la presencia de moléculas de RNA de doble hebra, que activa una cascada de procesos enzimáticos que resulta en la inhibición o supresión de moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas. Para contrarrestar este mecanismo de defensa, los virus codifican en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento que pueden interferir con cualquier etapa de la ruta. Estas proteínas supresoras del silenciamiento son muy diversas tanto en secuencia como en estructura y, han sido frecuentemente asociadas a interacciones de tipo sinérgico en infecciones mixtas. Aunque los detalles de los mecanismos moleculares de supresión se conocen en muy pocos casos, en general, los supresores virales contrarrestan el silenciamiento por RNA mediante su acción sobre moléculas de RNA relacionadas con la ruta o mediante interacción con los componentes proteicos de ésta. En este trabajo se hace una revisión sobre las diversas estrategias de supresión de silenciamiento viral descritas hasta el momento y su posible implicación en los procesos de patogénesis y sinergismo viral, dando prioridad a los virus con genoma de RNA por ser los mayoritarios entre los virus de plantas.

**Palabras clave:** Supresores virales del silenciamiento, virus de plantas, silenciamiento por RNA.

#### SUMMARY

RNA silencing in plants is a mechanism involved in the regulation of gene expression that also serves as antiviral defense. This process is induced by the presence of double-stranded RNA molecules that activate a cascade of enzymatic processes and results in the inhibition or suppression of nucleic acid molecules through specific interactions. To counteract this defense mechanism, viruses encode in their genome RNA silencing suppressor proteins that can interfere with any step of the RNA silencing pathway. These RNA silencing suppressor proteins are highly diverse in both sequence and structure and have often been linked to synergistic interactions in mixed infections. Although the details of the molecular mechanisms of suppression are completely known in very few cases, most viral suppressors counteract RNA silencing by acting on RNA molecules involved in the silencing pathway or by interacting with its protein components. This review discusses the different strategies of viral RNA silencing suppression currently known and their possible involvement in the pathogenesis and viral synergism processes primarily in RNA viruses, because they are the majority among plant viruses.

**Index words:** Viral silencing suppressors, plant viruses, RNA silencing.

#### INTRODUCCIÓN

El silenciamiento por RNA es un sistema de regulación mediado por RNAs pequeños que causan la inhibición o supresión de moléculas de ácidos nucleicos a través de interacciones específicas. Este proceso está altamente conservado en organismos eucariotas, donde está presente en plantas, hongos y animales (Wang y Metzlaff, 2005).

Este fenómeno fue descubierto en plantas transgénicas de petunia (*Petunia hybrida* L.), donde la introducción de una copia foránea de un gen endógeno que se quería sobreexpresar resultó en la co-supresión de ambos, el transgén y el gen endógeno (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et al.*, 1990). Posteriormente, en diferentes sistemas virales se demostró que, en contra del modelo propuesto, no era necesaria la expresión de proteínas virales para obtener resistencia frente al virus, sino que era suficiente con una secuencia viral no traducible (Lindbo y Dougherty 1992; van der Vlugt *et al.*, 1992). La observación de que un transgén  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) silenciado podía prevenir la acumulación viral de *Potato virus X* (PVX) portador de una secuencia GUS, indicaba que se trataba de un mecanismo de defensa antiviral específico de secuencia (English *et al.*, 1996).

Otra evidencia que indicaba que se trataba de un mecanismo general de respuesta de la planta frente a la infección viral, fue el hallazgo de que en planta no sólo se encontrara resistencia frente a un virus inoculado inicialmente, sino también frente a otros virus que portaran secuencias homólogas (Ratcliff *et al.*, 1997). El posterior descubrimiento de que los genomas virales codificaban proteínas supresoras de silenciamiento, capaces de bloquear o interferir con este proceso de silenciamiento por RNA, confirmó su implicación en defensa antiviral (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998). La prueba inequívoca que explicaba la extrema especificidad de secuencia del proceso de silenciamiento por RNA fue

el hallazgo de que en plantas que contenían un transgén silenciado, se acumulaban RNAs pequeños de aproximadamente 24 nucleótidos (nt) de tamaño con secuencias idénticas a la del transgén (Hamilton y Baulcombe, 1999).

Para contrarrestar un mecanismo de defensa antiviral basado en el silenciamiento por RNA, los virus han evolucionado codificando una o varias proteínas supresoras de silenciamiento que bloquean distintos puntos de la cascada de silenciamiento antiviral (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Voinnet, 2005). Estas proteínas supresoras frecuentemente son multifuncionales, las cuales además de suprimir el silenciamiento antiviral, cumplen funciones indispensables para el ciclo vital del virus, como son: la proteína de cubierta, la proteína de movimiento, la replicasa, la proteasa, las proteínas implicadas en la transmisión viral y en la regulación de la transcripción (Csorba *et al.*, 2009). Además, estos supresores frecuentemente están implicados en interacciones sinérgicas en infecciones mixtas, que pueden dar lugar a una acentuación de la sintomatología y en algunos casos a un aumento de los niveles de acumulación viral. La diversidad encontrada tanto a nivel estructural como funcional de estas proteínas, muestra la importancia de los estudios encaminados a conocer mejor el mecanismo de acción de estos supresores virales.

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión de los diversos mecanismos de supresión del silenciamiento antiviral en plantas de los supresores más representativos descritos hasta el momento, codificados por virus de ssRNA; así mismo, ya que estos supresores además de funcionar en defensa antiviral pueden interferir en procesos fisiológicos de la planta que dependen del silenciamiento por RNA, se ha abordado también el tema de su posible implicación en los procesos de patogénesis y sinergismo viral.

### Mecanismos moleculares del silenciamiento por RNA en plantas

En plantas, el silenciamiento por RNA engloba una serie de procesos que pueden actuar a nivel transcripcional (transcriptional gene silencing, TGS) o post-transcripcional (post-transcriptional gene silencing, PTGS). Ambos procesos tienen en común el reconocimiento específico de secuencias de DNA o RNA por pequeñas moléculas de RNA. Este mecanismo está implicado en procesos tales como el mantenimiento de la integridad del genoma, la regulación de procesos del desarrollo y la defensa frente a ácidos nucleicos invasores, tales como transgenes, transposones y virus (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009; Vaucheret, 2006; Voinnet, 2001).

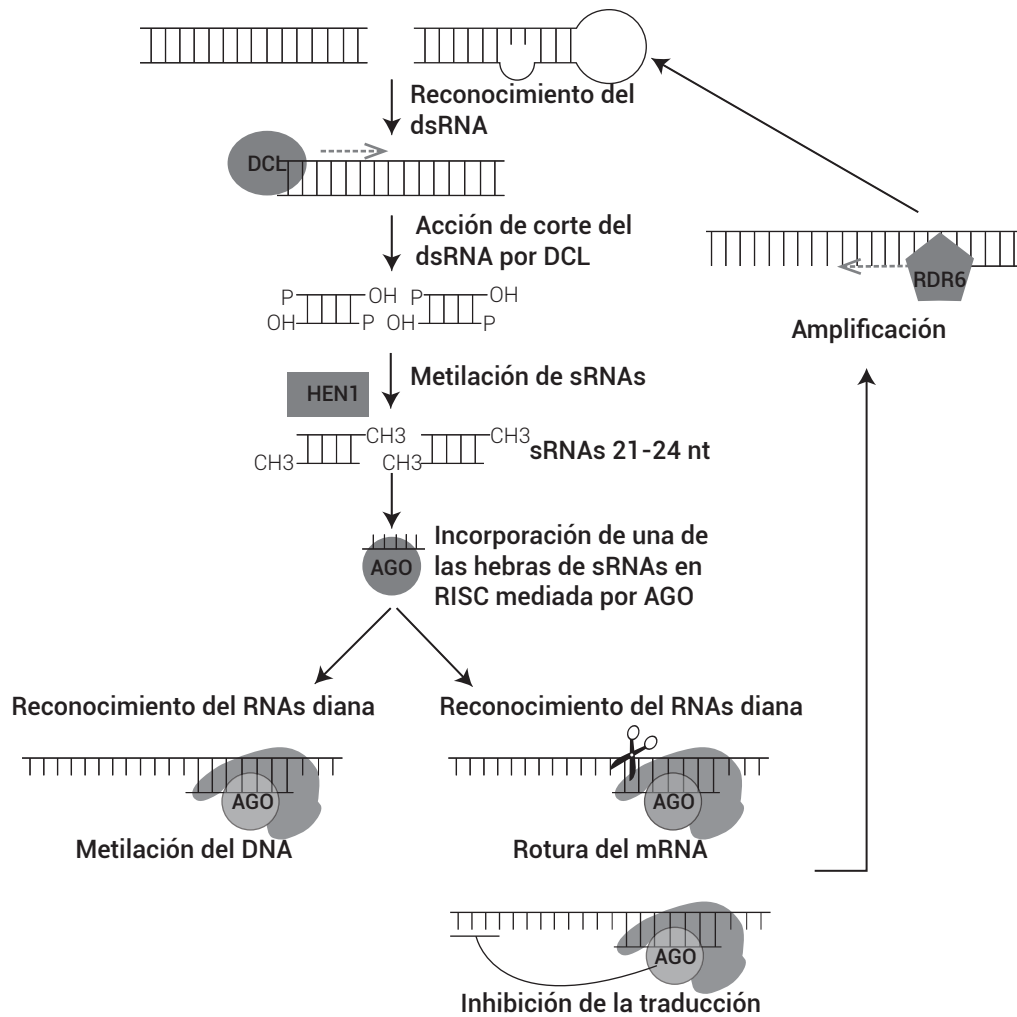
El silenciamiento por RNA se induce por la presencia de

moléculas de dsRNA que podrían derivar de la replicación viral, de repeticiones invertidas, de la transcripción convergente de transgenes y transposones, de *loci* endógenos con una alta estructura secundaria, o bien generarse por la acción de RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR) a partir de ssRNA. Estas moléculas son procesadas por RNasas de tipo III denominadas en plantas DCLs (Dicer-like), en pequeños RNAs (small RNAs, sRNAs) de doble hebra de entre 19 y 25 nt que presentan 2 o 3 nt protuberantes en el extremo 3' de ambas cadenas (Elbashir *et al.*, 2001). DCL requiere de la acción de DRB (dsRNA binding protein), para que el procesamiento del dsRNA se produzca de un modo preciso y eficiente (Eamens *et al.*, 2012a, b; Hiraguri *et al.*, 2005). La metilación de los sRNAs generados mediada por la metiltransferasa HEN1 (Boutet *et al.*, 2003), los protege de la degradación. Una de las hebras del sRNA es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RNA induced-silencing complex, RISC) que contiene, entre otros componentes, una endonucleasa llamada Argonauta (AGO).

Una vez ensamblado, en el caso del PTGS (post-transcriptional gene silencing), este complejo es guiado por el sRNA hasta un mRNA diana de secuencia complementaria al que se une induciendo la inhibición de su traducción o su degradación. En el TGS (transcriptional gene silencing), este complejo es guiado hasta un DNA de secuencia complementaria al que se une e induce su metilación y el bloqueo de su transcripción. Existe un proceso de amplificación de la señal de silenciamiento mediado por RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR), que resulta en la generación de nuevas moléculas de dsRNA que son procesadas en sRNAs secundarios (Figura 1).

En plantas existen tres rutas básicas del silenciamiento por RNA: 1) la ruta de los microRNA (miRNA), 2) la ruta de degradación mediada por pequeños RNAs interferentes (small interfering RNAs, siRNAs), y 3) la ruta de metilación del DNA mediada por RNA (RNA-directed DNA methylation, RdDM). En la ruta de los miRNAs, la transcripción de los genes MIR da lugar a un miRNA primario, que forma una estructura secundaria parcialmente plegada, que es procesada por DCL1, una de las cuatro proteínas DCL de *Arabidopsis thaliana*, para dar lugar a una estructura precursora tipo horquilla de la que serán escindidos los dúplex de miRNA de 21 a 24 nt (Kim, 2005).

Otros factores, como la proteína de dedo de zinc SERRATE y las proteínas de unión a dsRNA DRB1 o HYL1, también están implicadas en la biogénesis de los miRNAs. Los miRNAs juegan un papel crítico en el control del desarrollo de la planta porque reprimen o controlan la expresión de genes reguladores tales como los factores de transcripción. Los miRNAs de planta tienen principalmente como



**Figura 1. Ruta del silenciamiento por RNA en plantas.** La molécula de dsRNA es reconocida y procesada por DCL, lo que genera dúplex de sRNAs que serán metilados por la acción de HEN1. Una de las hebras del sRNA es incorporada en el complejo RISC cuyo componente principal es AGO, y se lleva a cabo la degradación de los RNAs diana. Las RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) generan nuevas moléculas de dsRNA que serán nuevamente procesadas por DCL, dando lugar a la formación de sRNAs secundarios.

diana las regiones codificantes de los mRNAs y, aunque funcionan predominantemente mediante la acción de corte del RNA, se ha visto que también pueden actuar mediante represión traduccional (Brodersen *et al.*, 2008). En la ruta de degradación mediada por siRNAs, dsRNAs de tamaño largo endógenos o exógenos, o estructuras en horquilla son procesados por DCL4 y DCL2 en siRNAs de 21 y 22 nt, respectivamente. El dsRNA largo endógeno precursor de esos siRNAs es sintetizado por la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6), una de las seis RDRs de *A. thaliana*, usando ssRNA como molde. Los siRNAs endógenos conocidos como trans-acting siRNAs (tasiRNAs) juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la planta y en las respuestas a estrés; sin embargo, parece que una de las funciones principales de esta ruta es la defensa an-

tiviral de la planta (ver el siguiente apartado).

Por su parte, la ruta RdDM juega un importante papel en el silenciamiento de transposones y elementos de DNA repetitivos, lo que mantiene la estabilidad e integridad del genoma (Haag y Pikaard 2011; Matzke *et al.*, 2009). Esta ruta también parece tener un papel importante en la defensa de la planta frente a virus de DNA. Los siRNAs de 24 nt implicados en esta ruta son procesados por DCL3 a partir del dsRNA sintetizado por la RNA polimerasa IV dependiente de DNA (Pol IV) y RDR2 (Henderson *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2004). Aunque los detalles moleculares de la RdDM no están del todo claros, como resultado de su actuación, se produce la metilación *de novo* del DNA por mediación de la DNA metiltransferasa

DRM2 (Cao y Jacobsen, 2002; Henderson *et al.*, 2010), con lo que se inhibe la transcripción.

En plantas, la activación del silenciamiento en una célula induce el silenciamiento de la misma secuencia en células adyacentes y en tejidos distales. Así, se han descrito tres tipos de movimiento de la señal de silenciamiento que ocasionarían un silenciamiento a corta distancia, un silenciamiento local extensivo y un silenciamiento sistémico (Kalantidis *et al.*, 2008). El movimiento de la señal de silenciamiento a través de la planta presenta un patrón similar al del movimiento viral, que se mueve célula a célula a través de los plasmodesmos, y a larga distancia a través del floema desde tejidos fuente a tejidos de demanda (Voinnet, 2008). Aunque no se conoce la naturaleza exacta de la señal de silenciamiento, los datos disponibles indican que se trata de un ácido nucleico (Molnar *et al.*, 2010), y se han propuesto posibles modelos de como ocurre el mismo. Así, mientras la proteína RDR6 parece jugar un papel crucial en la amplificación de la señal y su movimiento a largas distancias (Schwach *et al.*, 2005), DCL4, en las células acompañantes, estaría implicada en la generación de sRNAs de 21 nt que son capaces de moverse de 10 a 15 células más allá del límite del floema (Dunoyer *et al.*, 2005). Estudios recientes han demostrado que tanto siRNAs como miRNAs tienen la capacidad de moverse de una célula a otra y alcanzar el tejido vascular (Melnyk *et al.*, 2011).

#### **Silenciamiento por RNA como mecanismo de defensa antiviral en plantas**

En plantas, el silenciamiento por RNA también funciona como mecanismo de defensa antiviral (Baulcombe, 2004; Burguán y Havelda, 2011). Las infecciones virales en plantas están asociadas con la acumulación de siRNAs virales (viral small interfering RNAs, vsiRNAs) que pueden, a su vez, actuar silenciando el propio genoma viral. Por esta razón, los virus son tanto inductores como dianas del silenciamiento por RNA. Mientras que en virus de DNA los vsiRNAs podrían provenir de dsRNAs generados durante la transcripción bidireccional de sus genomas (Chellappan *et al.*, 2004), en virus de RNA los vsiRNAs podrían generarse a partir de dsRNAs sintetizados durante el proceso de replicación viral. En este último caso se ha propuesto también que la presencia de regiones altamente estructuradas del genoma podría constituir una fuente de generación de vsiRNAs (Molnár *et al.*, 2005); sin embargo, estudios recientes han mostrado que la mayor parte de los vsiRNAs se generarían por la acción de RDR celulares; por lo tanto, su biogénesis sería similar a la descrita para los siRNAs endógenos (Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010).

En *A. thaliana*, las cuatro proteínas DCL identificadas

están involucradas en la biogénesis de vsiRNAs. En el caso de virus RNA, el papel esencial en defensa antiviral lo tienen DCL4 y DCL2 (Ding y Voinnet, 2007) que generan vsiRNAs de 21 y 22 nt, respectivamente. De las dos, DCL4 parece tener un papel dominante, porque los vsRNAs de 21 nt son generalmente más abundantes que los de 22 nt. Esta predominancia de DCL4 sobre DCL2 podría también deberse a un efecto más potente en silenciamiento antiviral de los vsiRNAs de 21 nt con respecto a los de 22 (Wang *et al.*, 2011). En el caso de DCL3, aunque hay indicaciones que sugieren que puede contribuir en defensa antiviral, especialmente si DCL4 es inactivada (Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2008), esta contribución parece no ser muy relevante (Deleris *et al.*, 2006; García-Ruiz *et al.*, 2010). También la contribución de DCL1 a la generación de vsiRNAs parece ser minoritaria (Deleris *et al.*, 2006; Dunoyer *et al.*, 2005; García-Ruiz *et al.*, 2010). En el caso de virus con genoma de DNA, las cuatro proteínas DCL están implicadas en la biogénesis de vsiRNAs (Blevins *et al.*, 2006).

Los vsiRNAs generados se asocian con el complejo antiviral RISC (RNA-induced silencing complex) del que AGO (proteína argonuta) forma parte, en el que se produce el reconocimiento de las dianas virales y su corte. De entre los 10 miembros de AGO identificadas en *A. thaliana*, AGO1 parece ser el más importante en defensa antiviral, aunque también se ha descrito la participación de AGO2, AGO3, AGO4, AGO5 y AGO7 (Brosseau y Moffett, 2015; Chiu *et al.*, 2010; Jaubert *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2008). Se ha propuesto que AGO1 formaría parte de una primera línea de defensa antiviral, mientras que otras proteínas AGO actuarían en una segunda fase (Harvey *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2008).

De los vsiRNAs producidos durante el proceso de silenciamiento, sólo una pequeña fracción resulta de la acción de corte de DCL sobre la diana inicial. Existe un proceso de amplificación de la señal de silenciamiento mediado por RDR, que resulta en la generación de vsiRNAs secundarios (Voinnet, 2008). De las seis proteínas RDR identificadas en *A. thaliana*, RDR1, RDR2 y RDR6 parecen estar implicadas en respuesta antiviral (Dalmay *et al.*, 2000; Díaz-Pendón *et al.*, 2007; Donaire *et al.*, 2008; García-Ruiz *et al.*, 2010; Mourrain *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2008). Entre ellas, el papel de RDR6 es especialmente importante, pues se ha observado que una disminución en la actividad de esta enzima, hace que aumente la susceptibilidad a un gran número de virus (Mourrain *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2005; Schwach *et al.*, 2005).

En plantas, el silenciamiento inducido en una célula puede moverse célula a célula y a largas distancias para alcanzar tejidos distales. De este modo, si la señal de silenciamiento se propaga de un modo más rápido del que

lo hace el virus, los tejidos distales estarán alertados y de este modo tendrán la capacidad de resistir a la invasión viral (Ding y Voinnet, 2007). El silenciamiento sistémico, cuya amplificación está mediada por RDR6, juega un papel muy importante en defensa antiviral, porque previene la invasión viral del meristemo (Schwach *et al.*, 2005). Esta exclusión del meristemo es especialmente importante en defensa antiviral, porque puede facilitar tanto la recuperación de la planta como prevenir la transmisión por semillas.

### Supresión viral del silenciamiento

Para contrarrestar el silenciamiento por RNA, los virus han evolucionado codificando en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento. El primer supresor de silenciamiento viral descrito fue la proteína HCPro de potyvirus (Anandalakshmi *et al.*, 1998; Kasschau y Carrington, 1998). Desde entonces distintas aproximaciones han permitido identificar un gran número de supresores virales (<http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-2/7a-cuadro1.pdf>). Así, se ha propuesto que los virus de plantas codifican en su genoma al menos un supresor del silenciamiento, aunque en algunos casos codifican más de uno como ocurre en los géneros *Closterovirus*, *Crinivirus* y *Begomovirus* (Csorba *et al.*, 2015; Díaz-Pendón y Ding, 2008). Los supresores del silenciamiento, incluso dentro de la misma familia o grupo viral, son muy diversos tanto en secuencia como en estructura. Esta alta diversidad sugiere que han evolucionado de manera independiente y que son el resultado de procesos evolutivos recientes (Ding y Voinnet, 2007).

Muchas de estas proteínas supresoras son multifuncionales; es decir, además de cumplir con las funciones del ciclo viral, interfieren con la ruta de silenciamiento del hospedero (Voinnet, 2005), aunque también han sido descritas proteínas supresoras cuya única función es la supresión del silenciamiento. Los mecanismos de acción de los supresores son tan diversos que pueden interferir en cualquier etapa de la ruta de silenciamiento. Así mismo, cada vez existen más casos en que se describe que un mismo supresor viral es capaz de interferir en distintas etapas de la ruta de silenciamiento, lo que acentúa la efectividad de la supresión. Otra estrategia usada por los virus de plantas para suprimir de un modo más efectivo el silenciamiento por RNA es, como se ha comentado arriba, la producción de varias proteínas supresoras que podrían actuar en distintos puntos de la ruta de silenciamiento y complementarse entre sí.

### Mecanismos moleculares de supresión del silenciamiento

Los detalles de los mecanismos moleculares subyacen-

tes a la actividad específica de los supresores virales se conocen en pocos casos. En general, actúan sobre moléculas de RNA relacionadas con la ruta o interactúan con los componentes proteicos de ésta (Cuadro 1).

Entre los distintos mecanismos de acción descritos para supresores virales de silenciamiento se encuentran:

**Unión a dsRNA.** Dado el papel clave que los dsRNAs juegan en la ruta de silenciamiento, se espera que cualquier mecanismo que impida su actuación, comprometa la efectividad de la misma. De este modo, uno de los mecanismos de acción más comunes de los supresores de silenciamiento es la unión a dsRNAs (Lakatos *et al.*, 2006; Mérai *et al.*, 2006). Depende de si se unen a dsRNAs de tamaño largo o de tamaño corto, se afectarán distintas etapas de la ruta; de este modo si el supresor se une a dsRNAs de tamaño largo, la enzima Dicer no podrá acceder a su sustrato y la digestión del mismo se verá afectada, mientras que la unión a dsRNAs pequeños (siRNAs) puede impedir que éstos se carguen al complejo RISC, y se inhiba por lo tanto esta etapa de la ruta.

Entre el grupo de supresores que se unen a dsRNAs de tamaño largo se encuentran la proteína P14 del aureusvirus (género *Aureusvirus*, familia *Tombusviridae*) *Photos latent virus* (PoLV), la proteína P38 del carmovirus (género *Carmovirus*, familia *Tombusviridae*) *Turnip crinkle virus* (TCV) (Mérai *et al.*, 2006), y la proteína NS<sub>s</sub> del tospovirus (género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*) *Tomato spotted wilt virus* (Schnettler *et al.*, 2010). Estos supresores también son capaces de unir siRNAs, y representan la estrategia más común utilizada por las proteínas supresoras de silenciamiento de los virus de plantas (Chapman *et al.*, 2004; Csorba *et al.*, 2007; Goto *et al.*, 2007; Kurihara *et al.*, 2007; Martínez-Turiño y Hernández, 2009; Mérai *et al.*, 2006; Schnettler *et al.*, 2010). Entre las evidencias experimentales que apoyan que la unión a siRNAs interferiría con su carga en el complejo RISC, se encuentran las descritas para las proteínas p19 de tobusvirus (género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae*), p21 de closterovirus (género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*), NS3 de tenuivirus (género *Tenuivirus*), HCPro de potyvirus (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*) y p122 de tobamovirus (género *Tobamovirus*, familia *Virgaviridae*) (Csorba *et al.*, 2007; Hemmes *et al.*, 2007; Lakatos *et al.*, 2006).

Como consecuencia de la unión del supresor a siRNAs, se interferiría en la metilación de los mismos por parte de la enzima HEN1, y afectaría así su estabilidad (Csorba *et al.*, 2007; Lózsza *et al.*, 2008; Vogler *et al.*, 2007). Probablemente, el supresor mejor caracterizado entre los que unen siRNAs es la proteína p19 de tobusvirus (Silhavy *et al.*, 2002). Estudios cristalográficos han mostrado que p19 forma un



homodímero que selecciona específicamente siRNAs de 21 y 22 nt de tamaño (Vargason *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2003). El secuestro de siRNAs por parte de p19, bloquearía la formación de complejos RISC activos (Lakatos *et al.*, 2006) e interferiría en el movimiento sistémico de la señal de silenciamiento (Molnar *et al.*, 2010). Una estrategia totalmente distinta a la unión a siRNAs, aunque con el mismo resultado, es llevada a cabo por la proteína supresora RNasa III del crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV). Así, el corte de los siRNAs virales de 21 a 24 nt en productos de 14 nt mediado por la actividad endonucleasa de la proteína RNasa III, hace que éstos sean inactivos sin poder ser incorporados en el complejo RISC (Cuellar *et al.*, 2009).

**Interferencia con DCL.** Los supresores virales que actúen directamente inhibiendo la maquinaria enzimática implicada en el procesamiento de dsRNAs, actuarán afectando la eficiencia de corte de DCL. Así, el factor DRB4 (dsRNA binding protein 4), que se requiere para el procesamiento de vsiRNAs mediado por DCL4, constituye la diana de varios supresores virales que se unen a él, y lo inhibirían. Como consecuencia de la interacción con este factor auxiliar de DCL4, se inhibe la formación de vsiRNAs de 21 nt (Delewis *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008; Hiraguri *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2008; Shivaprasad *et al.*, 2008). Otra estrategia que también resultaría en la interferencia de la acción de corte de DCL, es la utilizada por el dianthovirus (género *Dianthovirus*, familia *Tombusviridae*) *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV). Así, la incorporación de DCL en el complejo de replicación de RCNMV conduciría a su inhibición (Takeida *et al.*, 2005).

**Interacción con proteínas AGO.** El bloqueo de complejos RISC funcionales puede llevarse a cabo por medio de la unión directa a la unidad catalítica AGO (Zhang *et al.*, 2006), su desestabilización o degradación (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Pazhouhandeh *et al.*, 2006). La primera proteína supresora en la que se describió la unión a AGO1 y AGO4 *in vivo* fue la proteína 2b del cucumovirus (género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*) *Cucumber mosaic virus* (CMV) (González *et al.*, 2010; Hamera *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006). Así, el que la interacción con AGO1 resulte en la inhibición de la actividad de corte de AGO1 (Zhang *et al.*, 2006), sugiere que podría estar implicada en la prevención de la amplificación y dispersión de vsiRNAs (Goto *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). Por su parte, la interacción con AGO4 que actúa uniendo siRNAs de 24 nt de origen endógeno que participan en RdDM, reduciría el acceso de los siRNAs a su diana endógena y modularía, de este modo, la transcripción de genes del hospedero en beneficio del virus (Hamera *et al.*, 2012).

Por otra parte, la proteína supresora P0 de polerovirus (género *Polerovirus*, familia *Luteoviridae*), contiene un do-

minio tipo F-box, típico de factores celulares relacionados con la ubiquitinación y la degradación de proteínas, que tiene como diana AGO1 y cuyo papel sería promover su degradación (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Csorba *et al.*, 2010; Pazhouhandeh *et al.*, 2006). En el caso del nepovirus (género *Nepovirus*, familia *Secoviridae*) *Tomato ringspot virus* (ToRSV), la proteína supresora CP se uniría a AGO1 para promover su degradación por autofagia (Karran y Sanfaçon, 2014) y como consecuencia suprimir su actividad inhibidora durante la traducción. Por su parte, la proteína p25 del potexvirus (género *Potexvirus*, familia *Flexiviridae*) PVX también interacciona físicamente con AGO (AGO1, 2, 3 y 4) y promueve su degradación a través de una ruta dependiente del proteosoma (Chiu *et al.*, 2010). Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de un nuevo tipo de interacción con AGO1 a través de repeticiones aminoacídicas del tipo GW/WG (glicina/triptófano). Este tipo de repeticiones son típicas de proteínas celulares que intervienen en el ensamblaje y funcionamiento de los complejos RISC (Karlowski *et al.*, 2010), y los supresores que las contienen pueden interferir por competencia en la formación *de novo* de RISC o en su actividad (Azevedo *et al.*, 2010; Giner *et al.*, 2010).

Además de estos dos primeros casos descritos para la proteína p38 del carmovirus TCV y la proteína P1 del ipomovirus (género *Ipomovirus*, familia *Potyviridae*) *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV), se ha descrito que esta estrategia es utilizada también por la proteína p37 del carmovirus *Pelargonium line pattern virus* (PLPV). En este caso, se ha demostrado que estos dominios GW además de implicados en la unión a AGO1, también lo están en la unión a siRNAs, y ambas actividades son esenciales para que p37 pueda ejercer su actividad supresora (Pérez-Cañamás y Hernández, 2015). Resultados de este mismo trabajo también muestran que los dominios GW/WG de TCV p38, aparte de implicados en la interacción con AGO1, son necesarios para que se mantengan sus propiedades de unión tanto a siRNAs como a dsRNAs de tamaño largo. Estos resultados sugieren que ambas funciones podrían actuar de modo cooperativo; durante la interacción del supresor con AGO se incrementaría el secuestro de dúplex de siRNAs, e interferiría de este modo con la actividad de RISC.

**Modulación de la homeostasis de AGO1.** Aunque recientemente descrito, este mecanismo de acción basado en la modulación de la expresión génica del hospedero a nivel transcripcional, podría ser una estrategia ubicua en las interacciones virus-planta. AGO1, como se ha comentado anteriormente, es uno de los componentes más importantes de la ruta de silenciamiento implicado en defensa antiviral, cuya homeostasis depende de la expresión de miR168 (Rhoades *et al.*, 2002). Resultados recientes

muestran que durante la infección por tomosvirus se produce una inducción de la transcripción de AGO1 como parte del arsenal de respuestas antivirales de la planta. Para contrarrestar un mecanismo de defensa basado en AGO1, el supresor p19 promueve la inducción transcripcional de miR168, que resulta en la disminución de los niveles de expresión de AGO1 (Várallyay *et al.*, 2010). Además de presentarse en la infección por tomosvirus, este fenómeno ha sido observado en el caso de otras infecciones virales (Du *et al.*, 2011; Várallyay y Havelda, 2013).

**Interferencia en la amplificación de siRNA secundarios.** Las proteínas RDR del hospedero, en especial RDR1 y RDR6, están implicadas en la amplificación del silenciamiento y en la dispersión de la señal sistémica del mismo mediante la síntesis de vsiRNAs (Schwach *et al.*, 2005); por lo tanto, la supresión de la actividad RDR puede constituir un punto clave donde actuar para el supresor, porque al interferir en la amplificación del silenciamiento, la replicación y dispersión viral se verían favorecidas. Entre las proteínas supresoras que actúan en este punto se encuentra la proteína V2 del geminivirus (género *Begomovirus*, familia *Geminiviridae*) *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que interacciona directamente con SGS3, el cofactor de RDR6, y bloquea de este modo la amplificación del silenciamiento (Glick *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* realizados con este mismo supresor han mostrado que V2 compite con SGS3 por dsRNAs que contengan extremos 5' protuberantes, que podría constituir un intermediario de RDR6/SGS3 en la amplificación de vsiRNAs (Fukunaga y Doudna, 2009; Kumakura *et al.*, 2009).

De igual modo, la proteína TGBp1 de potexvirus inhibe la síntesis de dsRNA dependiente de RDR6/SGS3 (Okano *et al.*, 2014). También, el supresor  $\beta$ C1, codificado por el DNA satélite de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) interacciona con el supresor endógeno rgsCaM, una proteína celular relacionada con la calmodulina, en *Nicotiana benthamiana*, y reprime la expresión de RDR6 y por lo tanto la producción de siRNAs secundarios (Li *et al.*, 2014). Ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana* mostraron que los supresores HCPro del potyvirus *Sugar cane mosaic virus* (SCMV) y 2b del cucumovirus *Tomato aspermy virus* (TAV), están implicados en la reducción de los niveles de acumulación de mRNA de RDR6 (Zhang *et al.*, 2008). Del mismo modo, el supresor Pns10 del phyto-reovirus (género *Phytoreovirus*, familia *Reoviridae*) *Rice dwarf phytoreovirus* (RDV) reduce los niveles de expresión de RDR6, y favorece la invasión viral de los ápices (Ren *et al.*, 2010). También la proteína 2b de cucumovirus evita la dispersión de la señal de silenciamiento a larga distancia (Guo y Ding, 2002), al inhibir la producción de siRNAs secundarios (Wang *et al.*, 2010). Es notorio por lo tanto que una actividad supresora centrada en RDR6 es una estrate-

gia ampliamente utilizada por distintos virus que bloquea de un modo efectivo el silenciamiento antiviral.

**Interacción con reguladores endógenos de la ruta de silenciamiento.** Algunos supresores modulan una respuesta defensiva por parte de la planta basada en el silenciamiento por RNA, mediante su actuación sobre reguladores endógenos de la ruta de silenciamiento. Entre ellos se encuentra la proteína AL2 de geminivirus que inhibe a la enzima ADK (Adenosina kinasa) (Wang *et al.*, 2003), implicada en procesos de metilación. Debido a que una parte de la respuesta defensiva contra estos virus implica la metilación de sus genomas, la inhibición de ADK, indirectamente, conseguiría bloquear el proceso de metilación (Wang *et al.*, 2005). Debido a que para este grupo de virus de DNA es muy importante evitar la metilación de sus genomas, la interacción e inhibición de otra enzima implicada en el ciclo de metilación como SAHH (S-adenosil homocisteína hidrolasa), sería el factor endógeno sobre el que actuaría el supresor  $\beta$ C1 codificado por el DNA satélite de *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (Yang *et al.*, 2011). De manera interesante, la proteína de geminivirus mencionada en primer lugar, AL2, también actúa induciendo la expresión e interacciona con la proteína celular rgs-CaM (Chung *et al.*, 2014).

Otro ejemplo de factor endógeno que parece ser diana de diversos supresores no relacionados, es el factor transcripcional inducible por etileno (RAV2) (Endres *et al.*, 2010). En el caso del *Papaya ringspot virus* (PRSV) la proteína supresora HCPro interacciona con calreticulina y modula de este modo la respuesta defensiva antiviral a través de la ruta de señalización del calcio (Shen *et al.*, 2010b). Por su parte la proteína HCPro de los potyvirus *Potato virus A* (PVA), *Potato virus Y* (PVY) y *Tobacco etch virus* (TEV) interacciona con una proteína asociada al microtúbulo (HIP2), a través de su región altamente variable (HVR). Así, mientras que la reducción de HIP2 está asociada con una disminución de los niveles de acumulación viral, mutaciones en el dominio HVR de HCPro provocan una inducción sistémica mediada por etileno y ácido jasmónico de genes de defensa de la planta y necrosis (Haikonen *et al.*, 2013a, b).

### Supresores virales como determinantes de patogenicidad

#### Sinergismo viral

El que un virus sea capaz de replicarse en un hospedero, no necesariamente va unido al hecho de que sea patógeno. La patogénesis tiene lugar cuando una infección viral afecta a la fisiología del hospedero lo que causa alteraciones en el desarrollo y otras manifestaciones fenotípicas, que son consideradas como síntomas de la enfermedad

(Culver y Padmanabhan, 2007; García y Pallás, 2015; Mandadi y Scholthof, 2013; Pallás y García, 2011). Como se ha visto, los virus, para infectar con éxito una planta, deben hacer frente a una repuesta defensiva basada en el silenciamiento por RNA, proceso que además de funcionar como defensa antiviral está implicado en la regulación de diversos procesos celulares. Para ello, la estrategia más comúnmente utilizada es la de codificar en su genoma proteínas supresoras del silenciamiento (Li y Ding, 2006). Estos supresores, además de funcionar en defensa antiviral, pueden interferir en procesos fisiológicos de la planta que dependen del silenciamiento por RNA, y esta interferencia contribuir a la patogénesis. Así, muchos supresores virales suelen ser considerados como los principales determinantes de patogenicidad tanto en infecciones simples como en infecciones mixtas sinérgicas.

Una de las rutas endógenas de silenciamiento por RNA en planta que más frecuentemente se ve afectada es la de los miRNAs. Como se ha visto, los miRNAs regulan negativamente importantes factores reguladores implicados en procesos de desarrollo, homeostasis de nutrientes y respuestas a estrés (Carrington y Ambrós, 2003; Pasquinelli y Ruvkun, 2002; Zhang *et al.*, 2010). Es, por lo tanto, concebible que los supresores puedan ocasionar alteraciones en el desarrollo de procesos, tales como la división celular, la formación de hojas y el desarrollo de la flor, mediante la interferencia en la expresión y la función de los miRNAs, y que estas interferencias puedan resultar en el desarrollo de síntomas de enfermedad (Kasschau *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, plantas transgénicas que expresan proteínas supresoras de silenciamiento, a menudo muestran fenotipos similares a los síntomas virales (Chapman *et al.*, 2004; Chellappan *et al.*, 2005; Jay *et al.*, 2011). Muchos de los supresores de silenciamiento que actúan secuestrando vsiRNAs, pueden interferir en estas rutas endógenas al inhibir su papel regulador. Como ejemplo se encuentra el caso del miRNA167 que resulta en la alteración de la regulación de su diana AUXIN RESPONSE FACTOR 8, y que parece ser especialmente relevante porque es el principal factor implicado en la alteración del desarrollo causada por al menos tres proteínas supresoras, HCpro de potyvirus, p19 de tombusvirus y p15 de pecluvirus (género *Pecluvirus*, familia *Virgaviridae*) (Jay *et al.*, 2011).

También los genes *R* del tipo NBS-LRR están regulados negativamente por miRNAs para evitar que una expresión incontrolada dispare reacciones autoinmunes deletéreas. Es posible, por lo tanto, que la inactivación de esos miRNAs por los supresores resulte en un aumento de los niveles de expresión de los genes *R* lo que causaría síntomas de enfermedad como la necrosis letal (Shivaprasad *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012b; Weber *et al.*, 2004). La unión e inactivación de otros componentes de la ruta de silenciamiento

como las proteínas AGO, estrategia comúnmente utilizada por las proteínas supresoras, puede también producir alteraciones en el desarrollo, como es el caso de la proteína 2b de CMV (Zhang *et al.*, 2006) y de la proteína TGBp1 del carlavirus (género *Carlavirus*, familia *Flexiviridae*) *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) (Okano *et al.*, 2014).

Es importante remarcar que los supresores pueden producir efectos patogénicos que no dependen directamente de su capacidad para suprimir el silenciamiento (Du *et al.*, 2014). Como ejemplo se pueden citar, en el caso de geminivirus, el de la proteína supresora  $\beta$ C1 codificada por el DNA satélite asociado con TYLCCV, y el de la proteína C2 que actúan inhibiendo la ruta del ácido jasmónico (Lozano-Durán *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2008). Otros ejemplos de interacción de supresores con factores del hospedero que pueden tener un impacto en patogénesis viral son los propuestos para la interacción de la proteína supresora p6 del caulimovirus (género *Caulimovirus*, familia *Caulimoviridae*) *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) con componentes implicados en la ruta de señalización del etileno (Geri *et al.*, 2004), el de la interacción del supresor 2b de CMV con una catalasa del hospedero (Inaba *et al.*, 2011) o el de la interacción del supresor HCpro de PVA con la proteína asociada al microtúbulo HIP2 (Haikonen *et al.*, 2013b). También, una función incorrecta del proteosoma como consecuencia de la interacción con el supresor HCpro podría considerarse como otro factor que contribuye al incremento de la patogenicidad asociado a la actividad de una proteína supresora (Pacheco *et al.*, 2012).

Dada la importancia de la supresión del silenciamiento por RNA para la supervivencia viral, es razonable considerar que los supresores virales podrían ser diana de mecanismos de defensa alternativos que podrían causar importantes síntomas de enfermedad (García y Pallás, 2015; Pallás y García, 2011; Wang *et al.*, 2012b). De hecho, algunos supresores como la proteína p6 de CaMV en *Nicotiana clevelandii*, (Király *et al.*, 1999), la proteína p19 de TBSV (Chu *et al.*, 2000) y 2b de TAV (Li *et al.*, 1999) en tabaco (*Nicotiana tabacum*), o la proteína CP de TCV en *A. thaliana* (Ren *et al.*, 2000), han sido descritas como inductoras de respuestas necróticas locales o sistémicas similares a las mediadas por los genes *R*. También la proteína HCpro de TEV induce una débil respuesta específica que estimula la resistencia de la planta frente a diversos patógenos (Pruss *et al.*, 2004). Aunque ninguna de estas respuestas es capaz de bloquear completamente la infección viral, son capaces de condicionar el desarrollo de síntomas.

Ya que diferentes supresores de silenciamiento actúan con mecanismos distintos que afectan a diversas etapas de la ruta de silenciamiento por RNA, no es sorprendente que



en infecciones donde virus de diferentes familias se mezclan se produzca una acentuación de la sintomatología, lo que puede inducir mayores niveles de acumulación viral que en infecciones individuales. Este fenómeno es conocido como sinergismo viral. La mayoría de los estudios de sinergismo viral implican a un virus del género *Potyvirus*. Entre ellos, el caso mejor estudiado es el de la interacción PVX-PVY en *Nicotiana tabacum*, donde se produce tanto una acentuación de la sintomatología como un incremento en los niveles de acumulación de PVX (González-Jara *et al.*, 2004; Pruss *et al.*, 1997; Vance *et al.*, 1991). El incremento en la patogenicidad observado cuando el supresor HCpro fue expresado a partir de un virus heterólogo, mostró que ésta era la secuencia implicada en la interacción sinérgica (Pruss *et al.*, 1997); sin embargo, cuando el hospedero utilizado fue *N. benthamiana* no se observó un incremento en los niveles de acumulación de PVX en plantas co-infectadas con los potyvirus PVY, TEV o *Plum Pox virus* (PPV), a pesar de los severos síntomas observados, donde la aparición de lesiones necróticas sistémicas en hojas y tallos, conducía a la muerte de la planta (González-Jara *et al.*, 2004, 2005).

En este sentido, se ha sugerido que el sinergismo entre PVX y potyvirus es dependiente del hospedero (González-Jara *et al.*, 2004). De hecho, un estudio reciente en este mismo sistema ha propuesto el posible mecanismo implicado en esta interacción sinérgica. De este modo, se ha visto que la presencia del potyvirus, aunque no produce ningún efecto a nivel del RNA genómico de PVX, ayuda a la estabilización de los RNAs subgenómicos lo que permite que se alcance un nivel umbral de expresión de la proteína p25 de PVX, que sería de este modo reconocida por un posible gen *R* presente en *N. benthamiana*. Este reconocimiento es el que dispararía la respuesta que desencadenaría los síntomas observados de necrosis sistémica (Aguilar *et al.*, 2015). De modo general, en las múltiples interacciones sinérgicas descritas en las que un potyvirus está implicado, los niveles de acumulación de potyvirus tales como PVY, TEV, *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV) o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), no se ven afectados, mientras que los del virus heterólogo aumentan (Fukuzawa *et al.*, 2010; Murphy y Bowen, 2006; Pruss *et al.*, 1997; Taiwo *et al.*, 2007; Vance *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 2007).

La capacidad que tienen los virus de planta de causar infecciones sinérgicas en diferentes cultivos tiene implicaciones biológicas, epidemiológicas y económicas. El incremento de la multiplicación de uno o ambos virus implicados *N. benthamiana*, puede alterar la gama de hospederos o la tasa de transmisión por vectores (Elena, 2011), con las impredecibles consecuencias que ello ocasionaría. Como

ejemplo se encuentra el caso de la ruptura de resistencia observada en plantas de tomate co-infectadas con ToCV y el tospovirus *Tomato spotted wild virus* (TSWV) (García-Cano *et al.*, 2006), el de CMV en plantas de pepino (*Cucumis sativus*) co-infectadas con ZYMV (Wang *et al.*, 2004) y el de un número de virus de batata (*Ipomoea batatas* L.) simultáneamente infectada con el crinivirus SPCSV (Karyeija *et al.*, 2000; Mukasa *et al.*, 2006; Untiveros *et al.*, 2007). A pesar de las serias implicaciones biológicas y epidemiológicas que tienen estas interacciones sinérgicas, los mecanismos moleculares implicados en las mismas apenas se conocen.

## AGRADECIMIENTOS

Yazmín Landeo-Ríos fue beneficiaria de una beca predoctoral MAEC/AECID del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación de España. M. Carmen Cañizares fue beneficiaria de un contrato I3P (I3P-PC2004L) del CSIC (España) con la ayuda del Fondo Social Europeo (FSE). Este trabajo fue financiado por los proyectos AGL2010-22287-C02-01/AGR y AGL2013-48913-C2-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad de España, co-financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER. Jesús Navas-Castillo y Enrique Moriones son miembros del Grupo de Investigación AGR-214, financiados parcialmente por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía, España, co-financiado por FEDER y FSE.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar E., D. Almendral, L. Allende, R. Pacheco, B. N. Chung, T. Canto and F. Tenllado (2015) The P25 protein of *Potato virus X* (PVX) is the main pathogenicity determinant responsible for systemic necrosis in PVX-associated synergisms. *Journal of Virology* 89:2090-2103.
- Ahn J. W., C. J. Yin, J. R. Liu and W. J. Jeong (2010) *Cucumber mosaic virus* 2b protein inhibits RNA silencing pathways in green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Reports* 29:967-975.
- Anandalakshmi R., G. J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, T. H. Smith and V. B. Vance (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:13079-13084.
- Andika I. B., H. Kondo, M. Nishiguchi and T. Tamada (2012) The cysteine-rich proteins of *Beet necrotic yellow vein virus* and *Tobacco rattle virus* contribute to efficient suppression of silencing in roots. *Journal of General Virology* 93:1841-1850.
- Angel C. A. and J. E. Schoelz (2013) A survey of resistance to *Tomato bushy stunt virus* in the genus *Nicotiana* reveals that the hypersensitive response is triggered by one of three different viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:240-248.
- Asaoka R., H. Shimura, M. Arai and C. Masuta (2010) A progeny virus from a cucumovirus pseudorecombinant evolved to gain the ability to accumulate its RNA silencing suppressor leading to systemic infection in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:332-339.
- Azevedo J., D. García, D. Pontier, S. Ohnesorge, S. García, L. Braun, M. Bergdoll, M. A. Hakimi, T. Lagrange and O. Voinnet (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & Development* 24:904-915.
- Baulcombe D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.

- Baumberger N., C. H. Tsai, M. Lie, E. Havecker and D. Baulcombe (2007) The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current Biology* 17:1609-1614.
- Bayne E. H., D. V. Rakitina, S. Y. Morozov and D. Baulcombe (2005) Cell-to-cell movement of Potato petexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal* 44:471-482.
- Blevins T., R. Rajeswaran, P. V. Shivaprasad, D. Beknazariants, A. Si-Ammour, H. S. Park, F. Vazquez, D. Robertson, F. Jr. Meins, T. Hohn and M. M. Pooggin (2006) Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research* 34:6233-6246.
- Bortolamiol D., M. Pazhouhandeh, K. Marrocco, P. Genschik and V. Ziegler-Graff (2007) The Ploverovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology* 17:1615-1621.
- Boutet S., F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratiyas, J. B. Morel, P. Crete, X. Chen and H. Vaucheret (2003) *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology* 13:843-48.
- Brodersen P., L. Sakvarelidze-Achard, M. Bruun-Rasmussen, P. Dunoyer, Y. Y. Yamamoto, L. Sieburth and O. Voinnet (2008) Widespread translation inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 320:1185-1190.
- Brousseau C. and P. Moffett (2015) Functional and genetic analysis identify a role for *Arabidopsis* ARGONAUTE5 in antiviral RNA silencing. *The Plant Cell* 27:1742-1754.
- Burgán J. and Z. Havelda (2011) Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* 16:265-272.
- Canto T., F. Cillo and P. Palukaitis (2002) Generation of siRNAs by T-DNA sequences does not require active transcription or homology to sequences in the plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:1137-1146.
- Cañizares M. C., R. Lozano-Durán, T. Canto, E. R. Bejarano, D. M. Bisaro, J. Navas-Castillo and E. Moriones (2013) Effects of the crinivirus coat protein-interacting plant protein SAHH on post-transcriptional RNA silencing and its suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:1004-1015.
- Cañizares M. C., J. Navas-Castillo and E. Moriones (2008) Multiple suppressors of RNA silencing encoded by both genomic RNAs of the crinivirus, *Tomato chlorosis virus*. *Virology* 379:168-174.
- Cañizares M. C., K. M. Taylor and G. P. Lomonosoff (2004) Surface-exposed C-terminal amino acids of the small coat protein of *Cowpea mosaic virus* are required for suppression of silencing. *Journal of General Virology* 85:3431-3435.
- Cao X. and S. E. Jacobsen (2002) Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. *Current Biology* 12:1138-1144.
- Carrington J. C. and V. Ambros (2003) Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301:336-338.
- Chapman E. J., A. I. Prokhnovsky, K. Gopinath, V. V. Dolja and J. C. Carrington (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development* 18:1179-1186.
- Chellappan P., R. Vanitharani and C. M. Fauquet (2004) Short interfering RNA accumulation correlates with host recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *Journal of Virology* 78:7465-7477.
- Chellappan P., R. Vanitharani and C. M. Fauquet (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:10381-10386.
- Chen H. Y., J. Yang, C. Lin and Y. A. Yuan (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *The EMBO Reports* 9:754-760.
- Chen J., W. X. Li, D. Xie, J. R. Peng and S. W. Ding (2004) Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- Cheng J., R. Koukiekolo, K. Kieliszewicz, S. M. Sagan and J. P. Pezacki (2009) Cysteine residues of *Carnation italian ringspot virus* p19 suppressor of RNA silencing maintain global structural integrity and stability for siRNA binding. *Biochimica et Biophysica Acta* 1794:1197-1203.
- Cheng Y. Q., Z. M. Liu, J. Xu, T. Zhou, M. Wang, Y. T. Chen, H. F. Li and Z. F. Fan (2008) HC-Pro protein of *Sugar cane mosaic virus* interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *Journal of General Virology* 89:2046-2054.
- Chiba M., J. C. Reed, A. I. Prokhnovsky, E. J. Chapman, M. Mawassi, E. V. Koonin, J. C. Carrington and V. V. Dolja (2006) Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 346:7-14.
- Chiba S., K. Hleibieh, A. Delbianco, E. Klein, C. Ratti, V. Ziegler-Graff, S. Bouzoubaa and D. Gilmer (2013) The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing suppression activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:168-181.
- Chiu M. H., I. H. Chen, D. C. Baulcombe and C. H. Tsai (2010) The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11:641-649.
- Chu M., B. Desvoyes, M. Turina, R. Noad and H. B. Scholthof (2000) Genetic dissection of *Tomato bushy stunt virus* p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* 266:79-87.
- Chung H. Y., G. Lacatus and G. Sunter (2014) Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* 460:461:108-118.
- Csorba T., A. Bovi, T. Dalmay and J. Burgán (2007) The p122 subunit of *Tobacco mosaic virus* replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of Virology* 81:11768-11780.
- Csorba T., L. Kontra and J. Burgán (2015) Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* 479-480:85-103.
- Csorba T., R. Lózsza, G. Hutvágner and J. Burgán (2010) Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *The Plant Journal* 62:463-472.
- Csorba T., V. Pantaleo and J. Burgán (2009) RNA silencing: an antiviral mechanism. *Advances in Virus Research* 75:35-71.
- Cuellar W. J., J. F. Kreuze, M. L. Rajamäki, K. R. Cruzado, M. Untiveros and J. P. T. Valkonen (2009) Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10354-10358.
- Culver J. N. and M. S. Padmanabhan (2007) Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annual Review of Phytopathology* 45:221-243.
- Dalmay T., A. Hamilton, S. Rudd, S. Angell and D. Baulcombe (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101:543-553.
- Deleris A., J. Gallego-Bartolome, J. Bao, K. D. Kasschau, J. C. Carrington and O. Voinnet (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313:68-71.
- Delfosse V. C., Y. C. Agrofoglio, M. F. Casse, I. B. Kresic, H. E. Hopp, V. Ziegler-Graff and A. J. Distéfano (2014) The P0 protein encoded by *Cotton leafroll dwarf virus* (CLRVDV) inhibits local but not systemic RNA silencing. *Virus Research* 180:70-75.
- Deng X., J. Kelloniemi, T. Haikonen, A. L. Vuorinen, P. Elomaa, T. H. Teeri and J. P. Valkonen (2013) Modification of *Tobacco rattle virus* RNA1 to serve as a VIGS vector reveals that the 29K movement protein is an RNA silencing suppressor of the virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:503-514.
- Deng X. G., X. J. Peng, F. Zhu, Y. J. Chen, T. Zhu, S. B. Qin, D. H. Xi and H. H. Lin (2015) A critical domain of *Sweet potato chlorotic fleck virus* nucleotide-binding protein (NbP) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 16:365-375.
- Díaz-Pendón J. A. and S. W. Ding (2008) Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 46:303-326.
- Díaz-Pendón J. A., F. Li, W. X. Li and S. W. Ding (2007) Suppression of antiviral silencing by *Cucumber mosaic virus* 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation

- of three classes of viral small interfering RNAs. *The Plant Cell* 19:2053-2063.
- Ding S. W. and O. Voinnet (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130:413-426.
- Ding X. S., J. Liu, N. H. Cheng, A. Folimonov, Y. M. Hou, Y. Bao, C. Katagi, S. A. Carter and R. S. Nelson (2004) The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:583-592.
- Donaire L., D. Barajas, B. Martínez-García, L. Martínez-Priego, I. Pagán and C. Llave (2008) Structural and genetic requirements for the biogenesis of Tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *Journal of Virology* 82:5167-5177.
- Donze T., F. Qu, P. Twigg and T. J. Morris (2014) Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in *Arabidopsis* by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology* 449:207-214.
- Du Z., D. Xiao, J. Wu, D. Jia, Z. Yuan, Y. Liu, L. Hu, Z. Han, T. Wei, Q. Lin, Z. Wu and L. Xie (2011) P2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Molecular Plant Pathology* 12:808-814.
- Du Z., A. Chen, W. Chen, Q. Liao, H. Zhang, Y. Bao, M. J. Roossinck and J. P. Carr (2014) Nuclear-cytoplasmic partitioning of Cucumber mosaic virus protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor. *Journal of Virology* 88:5228-5241.
- Duan C. G., Y. Y. Fang, B. J. Zhou, J. H. Zhao, W. N. Hou, H. Zhu, S. W. Ding and H. S. Guo (2012) Suppression of *Arabidopsis* ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *The Plant Cell* 24:259-274.
- Dunoyer P., C. Himber and O. Voinnet (2005) DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* 37:1356-1360.
- Dunoyer P., C. H. Lecellier, E. A. Parizotto, C. Himber and O. Voinnet (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell* 16:1235-1250.
- Dunoyer P., S. Pfeffer, C. Fritsch, O. Hemmer, O. Voinnet and K. E. Richards (2002) Identification subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by Peanut clump virus. *The Plant Journal* 29:555-567.
- Eamens A. L., K. W. Kim, S. J. Curtin and P. M. Waterhouse (2012a) DRB2 is required for microRNA biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 7:e35933.
- Eamens A. L., K. W. Kim and P. M. Waterhouse (2012b) DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior* 7:1224-1229.
- Elbashir S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* 15:188-200.
- Elena S. F. (2011) Evolutionary constraints on emergence of plant RNA viruses. In: Recent Advances in Plant Virology. C. Caranta, M. A. Aranda, M. Tepfer, J. J. López-Moya (eds.). Caister Academic Press. Norfolk, UK. pp. 283-300.
- Endres M. W., B. D. Gregory, Z. Gao, A. W. Foreman, S. Mlotshwa, X. Ge, G. J. Pruss, J. R. Ecker, L. H. Bowman and V. Vance (2010) Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathogens* 6:e1000729.
- English J. J., E. Mueller and D. Baulcombe (1996) Suppression of virus accumulation in transgenic plants exhibiting silencing of nuclear genes. *The Plant Cell* 8:179-188.
- Feng L., C. G. Duan and H. S. Guo (2013) Inhibition of *in vivo* Slicer activity of Argonaute protein 1 by the viral 2b protein independent of its dsRNA-binding function. *Molecular Plant Pathology* 14:617-622.
- Fernández-Calvino L., L. Martínez-Priego, E. Z. Szabó, I. Guzmán-Benito, I. González, T. Canto, L. Lakatos and C. Llave (2016) Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds Argonaute 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes. *Journal of General Virology* 97:246-257.
- Fukunaga R. and J. A. Doudna (2009) dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *The EMBO Journal* 28:545-555.
- Fukuzawa N., N. Itchoda, T. Ishihara, K. Goto, C. Masuta and T. Matsumura (2010) HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of Cucumber mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virus Genes* 40:440-446.
- Fusaro A. F., R. L. Correa, K. Nakasugi, C. Jackson, L. Kawchuk, M. F. S. Vasilin and P. M. Waterhouse (2012) The Enamovirus p0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* 426:178-187.
- García J. A. and V. Pallás (2015) Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology* 11:21-30.
- García-Cano E., R. O. Resende, R. Fernández-Muñoz and E. Moriones (2006) Synergistic interaction between Tomato chlorosis virus and Tomato spotted wilt virus results in breakdown of resistance in tomato. *Phytopathology* 96:1263-1269.
- García-Ruiz H., A. Takeda, E. J. Chapman, C. M. Sullivan, N. Fahlgren, K. J. Bremel and J. C. Carrington (2010) *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection. *The Plant Cell* 22:481-496.
- Genovés A., J. A. Navarro and V. Pallás (2006) Functional analysis of the five Melon necrotic spot virus genome-encoded proteins. *Journal of General Virology* 87:2371-2380.
- Genovés A., V. Pallás and J. A. Navarro (2011) Contribution of topology determinants of a viral movement protein to its membrane association, intracellular traffic, and viral cell-to-cell movement. *Journal of Virology* 85:7797-7809.
- Geri C., A. J. Love, E. Cecchini, S. J. Barrett, J. Laird, S. N. Covey and J. J. Milner (2004) *Arabidopsis* mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of Cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Molecular Biology* 56:111-124.
- Gillet F. X., D. I. Cattoni, S. Petiot-Bécard, F. Delalande, V. Poignavet, J. P. Briard, Y. Bessin, A. Dorselaer, N. Declercq, S. Sanglier-Cianferani, C. Brugidou and F. Vignols (2013) The RYMV-encoded viral suppressor of RNA silencing P1 is a zinc-binding protein with redox-dependent flexibility. *Journal of Molecular Biology* 425:2423-2435.
- Giner A., L. Lakatos, M. García-Chapa, J. J. López-Moya and J. Burguán (2010) Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathogens* 6:e1000996.
- Glick E., A. Zrachya, Y. Levy, A. Mett, D. Gidoni, E. Belausov, V. Citovsky and Y. Gafni (2008) Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by Tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:157-161.
- González I., L. Martínez, D. V. Rakitina, M. G. Lewsey, F. A. Atencio, C. Llave, N. O. Kalinina, J. P. Carr, P. Palukaitis and T. Canto (2010) Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:294-303.
- González I., D. Rakitina, M. Semashko, M. Taliany, S. Praveen, P. Palukaitis, J. P. Carr, N. Kalinina and T. Canto (2012) RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of Cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* 18:771-782.
- González-Jara P., F. A. Atencio, B. Martínez-García, D. Barajas, F. Tenllado and J. R. Díaz-Ruiz (2005) A single amino acid mutation in the Plum pox virus helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95:894-901.
- González-Jara P., F. Tenllado, B. Martínez-García, F. A. Atencio, D. Barajas, M. Vargas, J. Díaz-Ruiz and J. R. Díaz-Ruiz (2004) Host-dependent differences during synergistic infection by potyviruses with Potato virus X. *Molecular Plant Pathology* 5:29-35.
- Goswami S., N. Sahana, P. Pandey, P. Doblas, R. K. Jain, P. Palukaitis, T. Canto and S. Praveen (2012) Interference in plant defense and development by non-structural protein NSs of Groundnut bud necrosis virus. *Virus Research* 163:368-373.
- Goto K., T. Kobori, Y. Kosaka, T. Natsuaki and C. Masuta (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of Cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant*



- & *Cell Physiology* 48:1050-1060.
- Gouveia P., S. Dandlen, A. Costa, N. Marques and G. Nolasco (2012) Identification of an RNA silencing suppressor encoded by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *European Journal of Plant Pathology* 133:237-245.
- Gouveia P. and G. Nolasco (2012) The p19.7 RNA silencing suppressor from *Grapevine leafroll-associated virus 3* shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes* 45:333-339.
- Guilley H., D. Bortolamiol, G. Jonard, S. Bouzoubaa and V. Ziegler-Graff (2009) Rapid screening of RNA silencing suppressors by using a recombinant virus derived from *Beet necrotic yellow vein virus*. *Journal of General Virology* 90:2536-2541.
- Guo H. S. and S. W. Ding (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *The EMBO Journal* 21:398-407.
- Haag J. R. and C. S. Pikaard (2011) Multisubunit RNA polymerases IV and V: Purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:483-492.
- Haas G., J. Azevedo, G. Moissiard, A. Geldreich, C. Himber, M. Bureau, T. Fukuhara, M. Keller and O. Voinnet (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *The EMBO Journal* 27:2102-2112.
- Haikonen T., M. L. Rajamäki Y. P. Tian and J. P. T. Valkonen (2013a) Interaction of the microtubule-associated host protein HIP2 with viral helper component proteinase is important in infection with *Potato virus A*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:734-744.
- Haikonen T., M. L. Rajamäki, Y. P. Tian and J. P. Valkonen (2013b) Mutation of a short variable region in HC-Pro protein of *Potato virus A* affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:721-733.
- Hamera S., X. Song, L. Su, X. Chen and R. Fang (2012) *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *The Plant Journal* 69:104-115.
- Hamilton A. J. and D. C. Baulcombe (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Hammond R. W. and J. Hammond (2013) Evaluating the silencing suppressor activity of proteins encoded by *Maize rayado fino virus*. In: APS-MSA Joint Meeting. 10 - 14 August. Poster session: Molecular Plant-Microbe Interactions-Viruses. Austin, Texas. pp:623.
- Han Y. H., H. Y. Xiang, Q. Wang, Y. Y. Li, W. Q. Wu, C. G. Han, D. W. Li and J. L. Yu (2010) Ring structure amino acids affect the suppressor activity of *Melon aphid-borne yellows virus* P0 protein. *Virology* 406:21-27.
- Hao X., A. Lu, N. Sokal, B. Bhagwat, E. Leung, R. Mao, R. Reade, Y. Wu, D. Rochon and Y. Xiang (2011) *Cucumber necrosis virus* p20 is a viral suppressor of RNA silencing. *Virus Research* 155:423-432.
- Harries P. A., K. Palanichelvam, S. Bhat and R. S. Nelson (2008) *Tobacco mosaic virus* 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1539-1548.
- Harvey J. J., M. G. Lewsey, K. Patel, J. Westwood, S. Heimstädt, J. P. Carr and D. C. Baulcombe (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS ONE* 6:e14639.
- Havelda Z., C. Hornyik, A. Valoczi and J. Burgyán (2005) Defective interfering RNA hinders the activity of a tombusvirus-encoded posttranscriptional gene silencing suppressor. *Journal of Virology* 79:450-457.
- Hemmes H., L. Lakatos, R. Goldbach, J. Burgyán and M. Prins (2007) The NS3 protein of *Rice hoja blanca tenuivirus* suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* 13:1079-1089.
- Hendelman A., M. Kravchik, R. Stav, M. Zik, N. Lugassi and T. Arazi (2013) The developmental outcomes of P0-mediated ARGONAUTE destabilization in tomato. *Planta* 237:363-377.
- Henderson I. R., A. Deleris, W. Wong, X. Zhong, H. G. Chin, G. A. Horwitz, K. A. Kelly, S. Pradhan and S. E. Jacobsen (2010) The *de novo* cytosine methyltransferase DRM2 requires intact UBA domains and a catalytically mutated paralog DRM3 during RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 6:e1001182.
- Henderson I. R., X. Zhang, C. Lu, L. Johnson, B. C. Meyers, P. J. Green and S. E. Jacobsen (2006) Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics* 38:721-725.
- Hiraguri A., R. Itoh, N. Kondo, Y. Nomura, D. Aizawa, Y. Murai, H. Koiwa, M. Seki, K. Shinozaki and T. Fukuhara (2005) Specific interactions between dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57:173-188.
- Hsieh Y. C., R. T. Omarov and H. B. Scholthof (2009) Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the *Tomato bushy stunt virus* P19 silencing suppressor. *Journal of Virology* 83:2188-2200.
- Hu Q., J. Hollunder, A. Niehl, C. J. Korner, D. Gereige, D. Windels, A. Arnold, M. Kuiper, F. Vazquez, M. Pooggin and M. Heinlein (2011) Specific impact of tobamovirus infection on the *Arabidopsis* small RNA profile. *PLoS ONE* 6:e19549.
- Inaba J., B. M. Kim, H. Shimura and C. Masuta (2011) Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiology* 156:2026-2036.
- Jamous R. M., K. Boonrod, M. W. Fuellgrabe, M. S. Ali-Shtayeh, G. Krczal and M. Wassenegger (2011) The helper component-proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *Journal of General Virology* 92:2222-2226.
- Jaubert M., S. Bhattacharjee, A. F. S. Mello, K. L. Perry and P. Moffett (2011) ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 156:1556-1564.
- Jay F., Y. Wang, A. Yu, L. Tacconat, S. Pelletier, V. Colot, J. P. Renou and O. Voinnet (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens* 7:e1002035.
- Jeong R. D., A. C. Chandra-Shekar, A. Kachroo, D. F. Klessig and P. Kachroo (2008) HRT-mediated hypersensitive response and resistance to *Turnip crinkle virus* in *Arabidopsis* does not require the function of TIP, the presumed guard protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:1316-1324.
- Ji L. H. and S. W. Ding (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by *Cucumber mosaic virus* interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:715-724.
- Jin H. and J. K. Zhu (2010) A viral suppressor protein inhibits host RNA silencing by hooking up with Argonautes. *Genes & Development* 24:853-856.
- Jin Y., D. Ma, J. Dong, D. Li, C. Deng, J. Jin and T. Wang (2007) The HC-Pro protein of *Potato virus Y* interacts with NtMinD of tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1505-1511.
- Kalantidis K., H. T. Schumacher, T. Alexiadis and J. M. Helm (2008) RNA silencing movement in plants. *Biology of the Cell* 100:13-26.
- Karlowski W. M., A. Zielezinski, J. Carrere, D. Pontier, T. Lagrange and R. Cooke (2010) Genome-wide computational identification of WG/GW Argonaute-binding proteins in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 38:4231-4245.
- Karran R. A. and H. Sanfaçon (2014) *Tomato ringspot virus* coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:933-943.
- Karyeija R. F., J. F. Kreuze, R. W. Gibson and J. P. T. Valkonen (2000) Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 269:26-36.
- Kasschau K. D. and J. C. Carrington (1998) A counter-defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470.
- Kasschau K. D., Z. Xie, E. Allen, C. Llave, E. J. Chapman, K. A. Krizan and J. C. Carrington (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4:205-217.
- Kataya A. R. A., M. N. S. Suliman, K. Kalantidis and I. C. Livieratos (2009) *Cucurbit yellow stunting disorder virus* p25 is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Research* 145:48-53.

- Kim V. N. (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells* 19:1-15.
- Király L., A. B. Cole, J. E. Bourque and J. E. Schoelz (1999) Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana glauca* and gene VI of *Cauliflower mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:919-925.
- Koukiekolo R., S. M. Sagan and J. P. Pezacki (2007) Effects of pH and salt concentration on the siRNA binding activity of the RNA silencing suppressor protein p19. *FEBS Letters* 581:3051-3056.
- Kozłowska-Makulska A., H. Guilley, M. S. Szyndel, M. Beuve, O. Lemaire, E. Herrbach and S. Bouzoubaa (2010) P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *Journal of General Virology* 91:1082-1091.
- Kreuze J. F., E. I. Savenkov, W. Cuellar, X. Li and J. P. T. Valkonen (2005) Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of Virology* 79:7227-7238.
- Kubota K. and J. C. Ng (2016) *Lettuce chlorosis virus* p23 suppresses RNA silencing and induces local necrosis with increased severity at raised temperatures. *Phytopathology* 106:653-662 <http://dx.doi.org/sci-hub.io/10.1094/PHYTO-09-15-0219-R>
- Kubota K., S. Tsuda, A. Tamai and T. Meshi (2003) *Tomato mosaic virus* replication protein suppressed virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 77:11016-11026.
- Kumakura N., A. Takeda, Y. Fujioka, H. Motose, R. Takano and Y. Watanabe (2009) SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters* 583:1261-1266.
- Kurihara Y., N. Inaba, N. Kutsuna, A. Takeda, Y. Tagami and Y. Watanabe (2007) Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *Journal of General Virology* 88:2347-2352.
- Lacombe S., M. Bangratz, F. Vignols and C. Brugidou (2010) The *Rice yellow mottle virus* P1 protein exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *The Plant Journal* 61:371-382.
- Lakatos L., T. Csorba, V. Pantaleo, E. J. Chapman, J. C. Carrington, Y. P. Liu, V. V. Dolja, L. Fernández C., J. J. López-Moya and J. Burguán (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO Journal* 25:2768-2780.
- Landeo-Ríos Y., J. Navas-Castillo, E. Moriones and M. C. Cañizares (2016a) The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* 488:129-136.
- Landeo-Ríos Y., J. Navas-Castillo, E. Moriones and M. C. Cañizares (2016b) The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus *Tomato chlorosis virus* is dispensable for local viral replication but important for counteracting an antiviral RDR6-mediated response during systemic infection. *Viruses* 8:182. doi:10.3390/v8070182
- Law S. M., B. W. Zhang and C. L. Brooks (2013) pH-sensitive residues in the P19 RNA silencing suppressor protein from *Carnation italian ringspot virus* affect siRNA binding stability. *Protein Science* 22:595-604.
- Lewsey M., F. C. Robertson, T. Canto, P. Palukaitis and J. P. Carr (2007) Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *The Plant Journal* 50:240-252.
- Li F. and S. W. Ding (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual Review of Microbiology* 60:503-531.
- Li F., C. Huang, Z. Li and X. Zhou (2014) Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression. *PLoS Pathogens* 10:e1003921.
- Li H. W., A. P. Lucy, H. S. Guo, W. X. Li, L. H. Ji, S. M. Wong and S. W. Ding (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The EMBO Journal* 18:2683-2691.
- Lindbo J. A. and W. G. Dougherty (1992) Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:144-153.
- Liu L., J. Grainger, M. C. Cañizares, S. M. Angell and G. P. Lomonosoff (2004) *Cowpea mosaic virus* RNA1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* 323:37-48.
- Llave C., K. D. Kasschau and J. C. Carrington (2000) Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13401-13406.
- Lozano-Durán R., T. Rosas-Díaz, G. Gusmaroli, A. P. Luna, L. Taconnat, X. W. Deng and E. R. Bejarano (2011) Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23:1014-1032.
- Lózsza R., T. Csorba, L. Lakatos and J. Burguán (2008) Inhibition of 3' modification of small RNAs in virus-infected plants require spatial and temporal co-expression of small RNAs and viral silencing-suppressor proteins. *Nucleic Acids Research* 36:4099-4107.
- Lu R., A. Folimonov, M. Shintaku, W. X. Li, B. W. Falk, W. O. Dawson and S. W. Ding (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15742-15747.
- Lukhovitskaya N. I., R. R. Vetukuri, I. Sama, S. Thaduri, A. G. Solovyyev and E. I. Savenkov (2014) A viral transcription factor exhibits antiviral RNA silencing suppression activity independent of its nuclear localization. *Journal of General Virology* 95:2831-2837.
- Mallory A. C., L. Ely, T. H. Smith, R. Marathe, R. Anandalakshmi, M. Fagard, H. Vaucheret, G. Pruss, L. Bowman and V. B. Vance (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *The Plant Cell* 13:571-583.
- Mandadi K. K. and K. B. Scholthof (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell* 25:1489-1505.
- Mangwende T., M. L. Wang, W. Borth, J. Hu, P. H. Moore, T. E. Mirkov and H. H. Albert (2009) The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384:38-50.
- Martínez-Priego L., L. Donaire, D. Barajas and C. Llave (2008) Silencing suppressor activity of the *Tobacco rattle virus*-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* 376:346-356.
- Martínez-Turiño S. and C. Hernández (2009) Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: distinctions from closely related suppressors. *Journal of General Virology* 90:519-525.
- Martín-Hernández A. M. and D. C. Baulcombe (2008) *Tobacco rattle virus* 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *Journal of Virology* 82:4064-4071.
- Mathioudakis M. M., L. Rodríguez-Moreno, R. N. Sempere, M. A. Aranda and I. Livieratos (2014) Multifaceted capsid proteins: multiple interactions suggest multiple roles for *Pepino mosaic virus* capsid protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:1356-1369.
- Mathioudakis M. M., R. S. L. Veiga, T. Canto, V. Medina, D. Mossialos, A. M. Makris and I. Livieratos (2013) *Pepino mosaic virus* triple gene block protein 1 (TGBp1) interacts with and increases tomato catalase 1 activity to enhance virus accumulation. *Molecular Plant Pathology* 14:589-601.
- Matzke M., T. Kanno, L. Daxinger, B. Huettel and A. J. Matzke (2009) RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 21:367-376.
- Mbanziwa D. R., Y. Tian, S. B. Mukasa and J. P. T. Valkonen (2009) Cassava Brown Streak Virus (Potyviridae) encodes a putative Maf/HAM1 pyrophosphatase implicated in reduction of mutations and a P1 proteinase that suppresses RNA silencing but contains no HC-Pro. *Journal of Virology* 83:6934-6940.
- Melnik C. W., A. Molnar and D. C. Baulcombe (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *The EMBO Journal* 30:3553-3563.
- Meng C., J. Chen, S. W. Ding, J. Peng and S. M. Wong (2008) *Hibiscus chlorotic ringspot virus* coat protein inhibits trans-acting small interfering RNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Journal of General Virology* 89:2349-2358.
- Meng C., J. Chen, J. Peng and S. M. Wong (2006) Host-induced avirulence of *Hibiscus chlorotic ringspot virus* mutants correlates with reduced gene-silencing suppression activity. *Journal of General*



- Virology* 87:451-459.
- Mérai Z., Z. Kerényi, S. Kertész, M. Magna, L. Lakatos and D. Silhavy (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80:5747-5756.
- Mérai Z., Z. Kerényi, A. Molnár, E. Barta, A. Válczi, G. Bisztray, Z. Havelda, J. Burgián and D. Silhavy (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of Virology* 79:7217-7226.
- Míngot A., A. Valli, B. Rodamilans, D. San León, D. C. Baulcombe, J. A. García and J. J. López-Moya (2016) The P1N-PISPO trans-frame gene of Sweet potato feathery mottle Potyvirus is produced during virus infection and functions as RNA silencing suppressor. *Journal of Virology* 90:3543-3557.
- Molnár A., T. Csorba, L. Lakatos, E. Várallyay, C. Lacomme and J. Burgián (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79:7812-7818.
- Molnar A., C. W. Melnyk, A. Bassett, T. J. Hardcastle, R. Dunn and D. C. Baulcombe (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872-875.
- Morel J. B., C. Godon, P. Mourrain, C. Béclin, S. Boutet, F. Feuerbach, F. Proux and H. Vaucheret (2002) Fertile hypomorphic *ARGONAUTE* (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant Cell* 14:629-639.
- Mourrain P., C. Béclin, T. Elmayan, F. Feuerbach, C. Godon, J. B. Morel, D. Jouette, A. M. Lacombe, S. Nikic, N. Picault, K. Rémoúé, M. Sanial, T. A. Vo and H. Vaucheret (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101:533-542.
- Mukasa S. B., P. R. Rubaihayo and J. P. T. Valkonen (2006) Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in co-infected sweet potato plants. *Plant Pathology* 55:458-467.
- Murphy J. F. and K. L. Bowen (2006) Synergistic disease in pepper caused by the mixed infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. *Phytopathology* 96:240-247.
- Napoli C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2:279-289.
- Nemes K., A. Gellért, E. Balázs and K. Salánki (2014) Alanine scanning of *Cucumber mosaic virus* (CMV) 2b protein identifies different positions for cell-to-cell movement and gene silencing suppressor activity. *PLoS ONE* 9:e112095.
- Netsu O., A. Hiraguri, T. Uehara-Ichiki, K. Komatsu and T. Sasaya (2015) Functional comparison of RNA silencing suppressor between the p5 protein of *Rice grassy stunt virus* and p3 protein of *Rice stripe virus*. *Virus Research* 203:10-19.
- Okano Y., H. Senshu, M. Hashimoto, Y. Neriya, O. Netsu, N. Minato, T. Yoshida, K. Maejima, K. Oshima, K. Komatsu, Y. Yamaji and S. Namba (2014) *In planta* recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potexviral RNA silencing suppressor. *The Plant Cell* 26:2168-2183.
- Olsperg A., K. Kamsol, C. Sarmiento, J. Gerassimenko and E. Truve (2014) *Cocksfoot mottle virus* coat protein is dispensable for the systemic infection. *Virology Journal* 11:19-29.
- Olsperg A., H. Paves, R. Toomela, T. Tamm and E. Truve (2010) *Cocksfoot mottle sobemovirus* coat protein contains two nuclear localization signals. *Virus Genes* 40:423-431.
- Omarov R., K. Sparks, L. Smith, J. Zindovic and H. B. Scholthof (2006) Biological relevance of a stable biochemical interaction between the Tombusvirus-encoded P19 and short interfering RNAs. *Journal of Virology* 80:3000-3008.
- Pacheco R., A. García-Marcos, A. Manzano, M. García de L., G. Camañes, P. García-Agustín, J. R. Díaz-Ruiz and F. Tenllado (2012) Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:709-723.
- Pallás V. and J. A. García (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92:2691-2705.
- Park J. W., S. Faure-Rabasse, M. A. Robinson, B. Desvoyes and H. B. Scholthof (2004) The multifunctional plant viral suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology* 323:49-58.
- Pasquinelli A. E. and G. Ruvkun (2002) Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 18:495-513.
- Pazhouhandeh M., M. Dieterle, K. Marrocco, E. Lechner, B. Berry, V. Brault, O. Hemmer, T. Kretsch, K. E. Richards, P. Genschik and V. Ziegler-Graff (2006) F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:1994-1999.
- Pérez-Cañamás M. and C. Hernández (2015) Key importance of small RNA binding for the activity of the glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *The Journal of Biological Chemistry* 290:3106-3120.
- Powers J. G., T. L. Sit, C. Heinsohn, C. G. George, K. H. Kim and S. A. Lommel (2008) The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA-2 encoded movement protein is a second suppressor of RNA silencing. *Virology* 381:277-286.
- Pruss G., X. Ge, X. M. Shi, J. C. Carrington and V. B. Vance (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell* 9:859-868.
- Pruss G. J., C. B. Lawrence, T. Bass, Q. Q. Li, L. H. Bowman and V. Vance (2004) The potyviral suppressor of RNA silencing confers enhanced resistance to multiple pathogens. *Virology* 320:107-120.
- Qi X., F. S. Bao and Z. Xie (2009) Small RNA deep sequencing reveals role for *Arabidopsis thaliana* RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS ONE* 4:e4971.
- Qu F., T. Ren and T. J. Morris (2003) The coat protein of *Turnip crinkle virus* suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology* 77:511-522.
- Qu F., X. Ye, G. Hou, S. Sato, T. E. Clemente and T. J. Morris (2005) RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* 79:15209-15217.
- Qu F., X. Ye and T. J. Morris (2008) *Arabidopsis* DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:14732-14737.
- Rahim M. D., I. B. Andika, C. Han, H. Kondo and T. Tamada (2007) RNA4-encoded p31 of *Beet necrotic yellow vein virus* is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology* 88:1611-1619.
- Rajamäki M. L., J. Streng and J. P. T. Valkonen (2014) Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:1199-1210.
- Rajamäki M. L. and J. P. T. Valkonen (2009) Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein A of picorna-like *Potato virus A* in *Nicotiana* species. *The Plant Cell* 21:2485-2502.
- Ratcliff F., B. D. Harrison and D. C. Baulcombe (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560.
- Rawlings R. A., V. Krishnan and N. G. Walter (2011) Viral RNAi suppressor reversibly binds siRNA to outcompete dicer and RISC via multiple-turnover. *Journal of Molecular Biology* 408:262-276.
- Reed J. C., K. D. Kasschau, A. I. Prokhnovsky, K. Gopinath, G. P. Pogue, J. C. Carrington and V. V. Dolja (2003) Suppressor of RNA silencing encoded by *Beet yellows virus*. *Virology* 306:203-209.
- Ren B., Y. Guo, F. Gao, P. Zhou, F. Wu, Z. Meng, C. Wei and Y. Li (2010) Multiple functions of *Rice dwarf phyto-reovirus* Pns10 in suppressing systemic RNA silencing. *Journal of Virology* 84:12914-12923.
- Ren T., F. Qu and T. J. Morris (2000) HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to *Turnip crinkle virus*. *The Plant Cell* 12:1917-1925.
- Rhoades M. W., B. J. Reinhart, L. P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel and D. P. Bartel (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110:513-520.
- Ronde D., A. Pasquier, S. Ying, P. Butterbach, D. Lohuis and R. Kormelink (2014) Analysis of *Tomato spotted wilt virus* NSs protein indicates the importance of the N-terminal domain for avirulence and RNA

- silencing suppression. *Molecular Plant Pathology* 15:185-195.
- Ruiz-Ferrer V. and O. Voinnet (2009) Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology* 60:485-510.
- Ruiz-Ruiz S., N. Soler, J. Sánchez-Navarro, C. Fagoaga, C. López, L. Navarro, P. Moreno, L. Peña and R. Flores (2013) *Citrus tristeza virus* p23: determinants for nucleolar localization and their influence on suppression of RNA silencing and pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:306-318.
- Sahana N., H. Kaur, R. K. Jain, P. Palukaitis, T. Canto and S. Praveen (2014) The asparagine residue in the FRNK box of potyviral helper-component protease is critical for its small RNA binding and subcellular localization. *Journal of General Virology* 95:1167-1177.
- Sarmiento C., E. Gomez, M. Meier, T. A. Kavanagh and E. Truve (2007) *Cocksfoot mottle virus* P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Research* 123:95-99.
- Schnettler E., H. Hemmes, R. Huisman, R. Goldbach, M. Prins and R. Kormelink (2010) Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84:11542-11554.
- Schwach F., F. E. Vaistij, L. Jones and D. C. Baulcombe (2005) An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* 138:1842-1852.
- Senshu H., J. Ozeki, K. Komatsu, M. Hashimoto, K. Hatada, M. Aoyama, S. Kagiwada, Y. Yamaji and S. Namba (2009) Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *Journal of General Virology* 90:1014-1024.
- Senshu H., Y. Yamaji, N. Minato, T. Shiraiishi, K. Maejima, M. Hashimoto, C. Miura, Y. Neriya and S. Namba (2011) A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by *Potato virus M*. *Journal of Virology* 85:10269-10278.
- Shen M., Y. Xu, R. Jia, X. Zhou and K. Ye (2010a) Size-independent and noncooperative recognition of dsRNA by the *Rice stripe virus* RNA silencing suppressor NS3. *Journal of Molecular Biology* 404:665-679.
- Shen W., P. Yan, L. Gao, X. Pan, J. Wu and P. Zhou (2010b) Helper component proteinase (HCPro) protein of *Papaya ringspot virus* interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology* 11:335-346.
- Shibolet Y. M., E. Haronsky, D. Leibman, T. Arazi, M. Wassenegger, S. A. Whitham, V. Gaba and A. Gal-On (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology* 81:13135-13148.
- Shimura H., C. Masuta, N. Yoshida, K. Sueda and M. Suzuki (2013) The 2b protein of *Asparagus virus 2* functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synergy with related cucumoviruses. *Virology* 442:180-188.
- Shivaprasad P. V., H. M. Chen, K. Patel, D. M. Bond, B. A. C. M. Santos and D. C. Baulcombe (2012) A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *The Plant Cell* 24:859-874.
- Shivaprasad P. V., R. Rajeswaran, T. Blevins, J. Schoelz, F. Jr. Meins, T. Hohn and M. M. Pooggin (2008) The CaMV transactivator/viroplasm interferes with RDR6-dependent *trans*-acting and secondary siRNA pathways in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research* 36:5896-5909.
- Silhavy D., A. Molnár, A. Lucioli, G. Szittyá, C. Hornyik, M. Tavazza and J. Burgyn (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal* 21:3070-3080.
- Sun L., I. B. Andika, H. Kondo and J. Chen (2013a) Identification of the amino acid residues and domains in the cysteine-rich protein of *Chinese wheat mosaic virus* that are important for RNA silencing suppression and subcellular localization. *Molecular Plant Pathology* 14:265-278.
- Sun L., I. B. Andika, J. Shen, D. Yang, C. Ratti and J. Chen (2013b) The CUG-initiated larger form coat protein of *Chinese wheat mosaic virus* binds to the cysteine-rich RNA silencing suppressor. *Virus Research* 177:66-74.
- Szabó E. Z., M. Manczinger, A. Göblös, L. Kemény and L. Lakatos (2012) Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to a viral protein. *Journal of Virology* 86:8324-8327.
- Taiwo M. A., K. T. Kareem, I. Y. Nsa and J. D'A. Hughes (2007) Cowpea viruses: effect of single and mixed infections on symptomatology and virus concentration. *Virology Journal* 4:95. doi: 10.1186/1743-422X-4-95
- Takeda A., M. Tsukuda, H. Mizumoto, K. Okamoto, M. Kaido, K. Mise and T. Okuno (2005) A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *The EMBO Journal* 24:3147-3157.
- Tatineni S., F. Qu, R. Li, T. J. Morris and R. French (2012) *Triticum mosaic poacevirus* enlists P1 rather than HC-Pro to suppress RNA silencing-mediated host defense. *Virology* 433:104-115.
- Te J., U. Melcher, A. Howard and J. Verchot-Lubicz (2005) *Soilborne wheat mosaic virus* (SBMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virology Journal* 2:18.
- Thomas C. L., V. Leh, C. Lederer and A. J. Maule (2003) *Turnip crinkle virus* coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306:33-41.
- Torres-Barceló C., J. A. Darós and S. F. Elena (2010) HC-Pro hypo- and hypersuppressor mutants: differences in viral siRNA accumulation in vivo and siRNA binding activity in vitro. *Archives of Virology* 155:251-254.
- Torres-Barceló C., S. Martín, J. A. Darós and S. F. Elena (2008) From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics* 180:1039-1049.
- Uhrig J. F., T. Canto, D. Marshall and S. A. MacFarlane (2004) Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the *Tomato bushy stunt virus* P19 pathogenicity protein. *Plant Physiology* 135:2411-2423.
- Untiveros M., S. Fuentes and L. F. Salazar (2007) Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (*Crinivirus*) with carla-, cucumo-, ipomo-, and potyviruses infecting sweet potato. *Plant Disease* 91:669-676.
- Untiveros M., A. Olsper, K. Artola, A. E. Firth, J. K. Kreuze and J. P. T. Valkonen (2016) A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Molecular Plant Pathology* 17:1111-1123 doi: 10.1111/mp.12366
- Valli A., G. Dujovny and J. A. García (2008) Protease activity, self-interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from *Cucumber vein yellowing ipomovirus*. *Journal of Virology* 82:974-986.
- Valli A., A. M. Martín-Hernández, J. J. López-Moya and J. A. García (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of *Cucumber vein yellowing ipomovirus*, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *Journal of Virology* 80:10055-10063.
- Valli A., J. C. Oliveros, A. Molnár, D. Baulcombe and J. A. García (2011) The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the anti-silencing activity of *Cucumber vein yellowing virus* P1b and perturbs endogenous small RNA populations. *RNA* 17:1148-1158.
- van der Krol A. R., L. A. Mur, P. de Lange, A. G. M. Gerats, J. N. M. Mol and A. R. Stuitje (1990) Antisense chalcone synthase genes in petunia: visualization of variable of transgene expression. *Molecular and General Genetics* 220:204-212.
- van der Vlugt R. A., R. K. Ruiter and R. Goldbach (1992) Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Molecular Biology* 20:631-639.
- Vance V. B. (1991) Replication of *Potato virus X* RNA is altered in coinfections with *Potato virus Y*. *Virology* 182:486-494.
- Vance V. B., P. H. Berger, J. C. Carrington, A. G. Hunt and X. M. Shi (1995) 5' proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206:583-590.
- Várallyay E. and Z. Havelda (2013) Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology* 14:567-575.

- Várallyay E., E. Oláh and Z. Havelda (2014) Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Research* 42:599-608.
- Várallyay E., A. Válczi, A. Ágyi, J. Burgyán and Z. Havelda (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO Journal* 29:3507-3519.
- Vargason J., G. Szittyá, J. Burgyán and T. M. Tanaka-Hall (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115:799-811.
- Vaucheret H. (2006) Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development* 20:759-771.
- Vogler H., R. Akbergenov, P. V. Shivaprasad, V. Dang, M. Fasler, M. O. Kwon, S. Zhanybekova, T. Hohn and M. Heinlein (2007) Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *Journal of Virology* 81:10379-10388.
- Voinnet O. (2001) RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17:449-459.
- Voinnet O. (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6:206-220.
- Voinnet O. (2008) Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Plant Science* 13:317-328.
- Voinnet O., Y. M. Pinto and D. Baulcombe (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:14147-14152.
- Wang H., K. J. Buckley, X. Yang, R. C. Buchmann and D. M. Bisaro (2005) Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Journal of Virology* 79:7410-7418.
- Wang H., L. Hao, C. Y. Shung, G. Sunter and D. M. Bisaro (2003) Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *The Plant Cell* 15:3020-3032.
- Wang K. D., R. Empleo, T. T. Nguyen, P. Moffetta and M. A. Sacco (2015) Elicitation of hypersensitive responses in *Nicotiana glutinosa* by the suppressor of RNA silencing protein P0 from poleroviruses. *Molecular Plant Pathology* 16:435-448.
- Wang L. Y., S. S. Lin, T. H. Hung, T. K. Li, N. C. Lin and T. L. Shen (2012a) Multiple domains of the *Tobacco mosaic virus* p126 protein can independently suppress local and systemic RNA silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:648-657.
- Wang M. B., C. Masuta, N. A. Smith and H. Shimura (2012b) RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:1275-1285.
- Wang M. B. and M. Metzlaiff (2005) RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8:216-222.
- Wang X. B., J. Jovel, P. Udornporn, Y. Wang, Q. Wu, W. X. Li, V. Gascioli, H. Vaucheret and S. W. Ding (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23:1625-1638.
- Wang X. B., Q. Wu, T. Ito, F. Cillo, W. X. Li, X. Chen, J. L. Yu and S. W. Ding (2010) RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:484-489.
- Wang Y., K. C. Lee, V. Gaba, S. M. Wong, P. Palukaitis and A. Gal-On (2004) Breakage of resistance to *Cucumber mosaic virus* by co-infection with *Zucchini yellow mosaic virus*: enhancement of CMV accumulation independent of symptoms expression. *Archives of Virology* 149:379-396.
- Weber H., S. Ohnesorge, M. V. Silber and A. J. P. Pfitzner (2004) The *Tomato mosaic virus* 30 kDa movement protein interacts differentially with the resistance genes *Tm-2* and *Tm-2<sup>2</sup>*. *Archives of Virology* 149:1499-1514.
- Weinheimer I., K. Boonrod, M. Moser, M. Zwiebel, M. Füllgrabe, G. Krczal and M. Wassenegger (2010) Analysis of an autoproteolytic activity of *Rice yellow mottle virus* silencing suppressor P1. *Biological Chemistry* 391:271-281.
- Weinheimer I., Y. Jiu and M. L. Rajamäki, O. Matilainen, J. Kallijärvi, W. J. Cuelar, R. Lu, M. Saarma, C. I. Holmberg, J. Jäntti and J. P. T. Valkonen (2015) Suppression of RNAi by dsRNA-degrading RNaseIII enzymes of viruses in animals and plants. *PLoS Pathogens* 11:e1004711.
- Xia Z., Z. Zhu, J. Zhu and R. Zhou (2009) Recognition mechanism of siRNA by viral p19 suppressor of RNA silencing: a molecular dynamics study. *Biophysical Journal* 96:1761-1769.
- Xie Z., L. K. Johansen, A. M. Gustafson, K. D. Kasschau, A. D. Lellis, D. Zilberman, S. E. Jacobsen and J. C. Carrington (2004) Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* 2:0642-0652.
- Xiong R., J. Wu, Y. Zhou and X. Zhou (2009) Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by rice stripe tenuivirus. *Virology* 387:29-40.
- Yaegashi H., T. Takahashi, M. Isogai, T. Kobori, S. Ohki and N. Yoshikawa (2007) *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 88:316-324.
- Yaegashi H., A. Tamura, M. Isogai and N. Yoshikawa (2008) Inhibition of long-distance movement of RNA silencing signals in *Nicotiana benthamiana* by *Apple chlorotic leaf spot virus* 50 kDa movement protein. *Virology* 382:199-206.
- Yan F., Y. Lu, L. Lin, H. Zheng and J. Chen (2012) The ability of PVX p25 to form RL structures in plant cells is necessary for its function in movement, but not for its suppression of RNA silencing. *PLoS ONE* 7:e43242.
- Yang J. Y., M. Iwasaki, C. Machida, Y. Machida, X. Zhou and N. H. Chua (2008)  $\beta$ C1, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. *Genes & Development* 22:2564-2577.
- Yang X., Y. Xie, P. Raja, S. Li, J. N. Wolf, Q. Shen, D. M. Bisaro and X. Zhou (2011) Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by  $\beta$ C1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathogens* 7:e1002329.
- Ye K., L. Malinina and D. J. Patel (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426:874-878.
- Yelina N. E., E. I. Savenkov, A. G. Solovveyev, S. Y. Morozov and J. P. Valkonen (2002) Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyvirus: complementary functions between virus families. *Journal of Virology* 76:12981-12991.
- Young B. A., D. C. Stenger, F. Qu, T. J. Morris, S. Tatineni and R. French (2012) Triticumovirus p1 functions as a suppressor of RNA silencing and enhancer of disease symptoms. *Virus Research* 163:672-677.
- Yu B., E. J. Chapman, Z. Yang, J. C. Carrington and X. Chen (2006) Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 580:3117-3120.
- Zeng R., Q. Liao, J. Feng, D. Li and J. Chen (2007) Synergy between *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* on Cucurbitaceae hosts tested by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39:431-437.
- Zhai Y., S. Bag, N. Mitter, M. Turina and H. R. Pappu (2014) Mutational analysis of two highly conserved motifs in the silencing suppressor encoded by *Tomato spotted wilt virus* (genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). *Archives of Virology* 159:1499-1504.
- Zhang W., S. Gao, X. Zhou, J. Xia, P. Chellappan, X. Zhou, X. Zhang and H. Jin (2010) Multiple distinct small RNAs originated from the same microRNA precursors. *Genome Biology* 11:R81.
- Zhang X., P. Du, L. Lu, Q. Xiao, W. Wang, X. Cao, B. Ren, C. Wei and Y. Li (2008) Contrasting effects on HC-Pro and 2b viral suppressors from *Sugarcane mosaic virus* and *Tomato aspermy cucumovirus* on the accumulation of siRNAs. *Virology* 374:351-360.
- Zhang X., Y. R. Yuan, Y. Pei, S. S. Lin, T. Tuschl, D. J. Patel and N. H. Chua (2006) *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20:3255-3268.
- Zhang X., X. Zhang, J. Singh, D. Li and F. Qu (2012) Temperature-dependent survival of *Turnip crinkle virus*-infected *Arabidopsis* plants relies on an RNA silencing based defense that requires DCL2, AGO2 and HEN1. *Journal of Virology* 86:6847-6854.
- Zhou Z. Sh., M. Dell'Orco, P. Saldarelli, C. Turturo, A. Minafra and G. P. Martelli (2006) Identification of an RNA silencing suppressor in the genome of *Grapevine virus A*. *Journal of General Virology*

- 87:2387-2395.
- Zhu S., G. H. Lim, K. Yu, R. D. Jeong, A. Kachroo and P. Kachroo (2014) RNA silencing components mediate resistance signaling against *Turnip crinkle virus*. *Plant Signal & Behaviour* 9:e28435.
- Zhu S., R. D. Jeong, G. H. Lim, K. Yu, C. Wang, A. C. Chandra-Shekara, D. Navarre, D. F. Klessig, A. Kachroo and P. Kachroo (2013) Double-stranded RNA-binding protein 4 is required for resistance signaling against viral and bacterial pathogens. *Cell Reports* 4:1168-1184.
- Ziebell H., A. M. Murphy, S. C. Groen, T. Tungadi, J. H. Westwood, M. G. Lewsey, M. Moulin, A. Kleczkowski, A. G. Smith, M. Stevens, G. Powell and J. P. Carr (2011) *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports* 1:187.

