

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de factores de virulencia determinantes de  
necrosis en infecciones compatibles planta-virus y su papel en  
la respuesta a estreses abióticos asociados al cambio climático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Emmanuel Aguilar Parras**

Director

**Francisco Tenllado Peralo**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR I



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de factores de virulencia determinantes  
de necrosis en infecciones compatibles planta-virus y  
su papel en la respuesta a estreses abióticos asociados  
al cambio climático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Emmanuel Aguilar Parras**

DIRECTOR

**Dr. Francisco Tenllado Peralo**

**Madrid, 2017**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA  
MOLECULAR I



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS**

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (CIB-CSIC)

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MEDIOAMBIENTAL



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de factores de virulencia determinantes  
de necrosis en infecciones compatibles planta-virus y  
su papel en la respuesta a estreses abióticos asociados  
al cambio climático**

**Emmanuel Aguilar Parras**

**Madrid, 2017**



*A mis padres*



«La ciencia no es perfecta. Con frecuencia es mal utilizada. No es más que una herramienta, pero, aun así, es la mejor herramienta que tenemos. Se autocorrigue, siempre está evolucionando y se puede aplicar a todo. Con esta herramienta conquistamos lo imposible»

*Carl Sagan (1934-1996)*

«...to boldly go where no one has gone before»

*Jean-Luc Picard (Star Trek, The Next Generation 2364-2370)*



## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se ha realizado en el marco del programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, dependiente del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense. El trabajo se ha llevado a cabo en el grupo de *Interacciones Moleculares Planta/Virus/Vector* del Departamento de Biología Medioambiental del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los proyectos en los que este trabajo ha encontrado cobertura financiera son “Prediction of the impact of climate change on the outcome of diseases caused by plant RNA viruses” (PJ00946102) de la Rural Development Administration de la República de Corea, en cooperación con el CSIC, y en “Función de determinantes de patogenicidad viral en los balances que se establecen en interacciones compatibles virus RNA-planta” (BIO2013-47940-R) del Ministerio de Economía y Competitividad de España (MINECO). Del MINECO también procede la beca FPU disfrutada por un servidor a lo largo de estos cuatro años. Para la realización de este trabajo ha sido imprescindible la colaboración de muchas otras personas. Los análisis de fluorescencia en plantas estresadas no se habrían obtenido sin la ayuda de Matilde Barón, Marisa Pérez y Mónica Pineda, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC) en Granada. Los estudios metabólicos se realizaron con la ayuda de Sonia Osorio, de la Universidad de Málaga. A J.A. García, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) en Madrid, corresponde la cesión de la construcción pGWBInPPV-3XHA; a L. Peña, del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), la cesión de la construcción para la expresión de CTV P23; a F. Aparicio, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) en Valencia, la obtención del clon NtVPE-1a; y a M. Castellano, del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) en Madrid, el vector pGWB2.

Me gustaría mostrar toda mi gratitud a mi director de tesis, Francisco Tenllado, gran científico y mejor persona. Gracias por tu plena

confianza en mí a lo largo de estos años, por tu ayuda y apoyo, y por haberme dado la oportunidad de formarme como científico. También me gustaría agradecer a Tomás R. Canto, la otra cabeza de este grupo bicéfalo, por su ayuda y buenas ideas. Para el Dr. Francisco Javier del Toro (Pran), compañero de penas, de alegrías y maestro de la comunicación no verbal, no tengo palabras que le hagan justicia. Gracias por tus consejos, científicos y no científicos, por cuidar de mi bonsái y por tu compañía. El día a día sería mucho peor sin esas charlas inconfesables al calor de mi ordenador. Gracias también a la Dra. Meme Pacheco, fuente inagotable de ciencia y vida, con la que me hubiera gustado coincidir más tiempo. Tampoco me puedo olvidar de dar las gracias al Dr. César Llave, del Grupo de *Regulación Génica y Estrés* y a sus integrantes, pasados y presentes. Gracias a la Dra. Livia, a Irene y a la Dra. Virginia, por todas las buenas conversaciones y buenos ratos vividos. Me alegro de que os guste Star Trek. Y Laura, compatriota manchega, gracias por tus visitas en las tardes solitarias, por tener siempre algo interesante que contarme y sobre todo por quererme como soy, con mis enormes virtudes y mis pequeños defectos.

Me gustaría dar las gracias a toda la gente que de un modo u otro me ha aportado algo en estos años, y sin los que la *experiencia CIB* hubiera sido muy diferente: Gracias a Refrán, Gosa, Arantxa, Bea y Alicia. Gracias también a los funguitos, por haberme acogido como a uno más. Nombrarlos aquí sería imposible por cuestiones de espacio, pero ellos conocen mi aprecio. No me olvido tampoco de los Manolos: Juan, *globito azul*; David, *el figure*; Jezú, hijo predilecto de Barbate; y Fran, *el reserva*. Familia madrileña sin igual. Gracias por supuesto a Manu y a Martiña, *os meus galegos*, mis dos amigos antes, ahora y siempre. Sin vosotros no hubiera llegado hasta aquí.

Finalmente, pero ante todo, gracias a mis padres, mi hermano y mi familia. Sin vuestro apoyo y cariño ni esto hubiera sido posible ni sería la persona que soy hoy. De verdad, gracias.

*Madrid, 14 de marzo de 2017*

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
ACRÓNIMOS DE VIRUS Y VIROIDES .....	XIII
RESUMEN .....	XV
SUMMARY.....	XXIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. VIRUS, ENTORNO Y CAMBIO CLIMÁTICO.....	3
1.2. LA INTERACCIÓN PLANTA-VIRUS .....	10
1.2.1. PTI ( <i>pattern-triggered immunity</i> ) .....	11
1.2.2. Silenciamiento génico y defensa antiviral .....	14
1.2.3. Contra-defensa viral. Supresión del silenciamiento.....	17
1.2.4. ETI ( <i>Effector-triggered immunity</i> ).....	20
1.2.5. Proteínas R. Hipótesis “del guardián” .....	24
1.2.6. PTI y ETI en infecciones víricas. El modelo de zig-zag .....	25
1.2.7. ER, HR, SHR y SN con virus. Defensa y muerte celular.....	27
1.3. POTEXVIRUS Y POTYVIRUS.....	31
1.3.1. Potexvirus. PVX.....	32
1.3.2. Las proteínas del TGB de PVX. P25.....	35
1.3.3. PVX. Respuestas defensivas y muerte celular .....	37
1.3.4. Potyvirus. PPV .....	39
1.4. INFECCIONES MÚLTIPLES. EL SINERGISMO.....	44
1.4.1. El sinergismo PVX-potyvirus.....	47
1.4.2. El sinergismo PVX-potyvirus. SN y regulación hormonal .....	49
1.5. INTERACCIONES PLANTA-VIRUS Y EL CAMBIO CLIMÁTICO .....	53

1.5.1. Efectos del incremento de temperatura .....	53
1.5.2. Efectos del incremento en la [CO <sub>2</sub> ] .....	57
1.5.3. La tolerancia a la sequía. Control hormonal y metabolitos.....	61
1.5.4. La interacción planta-virus y la tolerancia a la sequía .....	67
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	71
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.1. MATERIAL VEGETAL, AGROINFILTRACIÓN Y AGROINOCULACIÓN .....	77
3.1.1. Cultivo de <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i> .....	77
3.1.2. Agroinfiltración de <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i> .....	77
3.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. thaliana</i> .....	78
3.1.4. Agroinoculación <i>in vitro</i> de <i>A. thaliana</i> .....	79
3.1.5. Cultivo de <i>A. thaliana</i> .....	79
3.1.6. Cultivo y agroinfiltración/agroinoculación de <i>N. benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i> bajo condiciones alteradas, asociadas al cambio climático .....	80
3.2. CONSTRUCCIONES DE VECTORES BINARIOS .....	81
3.2.1. Clonaciones de P25.....	83
3.2.2. Clonaciones de virus y quimeras .....	84
3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE P25 .....	85
3.4. TRATAMIENTO HORMONAL DE <i>N. benthamiana</i> CON ÁCIDO SALICÍLICO (SA).....	85
3.5. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE ELECTROLITOS, ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVIDAD LIPOXIGENASA EN <i>N.</i> <i>benthamiana</i> .....	86
3.5.1. Liberación de electrolitos.....	86
3.5.2. Tinción con DAB.....	86
3.5.3. Actividad lipoxigenasa (LOX).....	87
3.6. ANÁLISIS DE RNA Y PROTEÍNAS .....	88
3.6.1. Extracción, <i>northern blot</i> y cuantificación de RNA .....	88

3.6.2. <i>Western blot</i> .....	90
3.7. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS).....	92
3.8. ANÁLISIS DE TERMOGRAFÍA Y FLUORESCENCIA.....	94
3.8.1. Análisis de fluorescencia multicolor (MCFI).....	94
3.8.2. Análisis de fluorescencia de la clorofila (Chl-F).....	95
3.8.3. Análisis de termografía.....	95
3.9. ANÁLISIS DE CONTENIDO EN AGUA.....	96
3.10. ANÁLISIS DE TRANSPIRACIÓN, ESTOMAS Y ARQUITECTURA RADICULAR.....	97
3.10.1. Curvas de pérdida de agua.....	97
3.10.2. Conductancia estomática y análisis de estomas.....	97
3.10.3. Análisis de la arquitectura radicular.....	98
3.11. ANÁLISIS DE LA EFICACIA BIOLÓGICA ( <i>FITNESS</i> ).....	99
3.12. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METABOLITOS Y HORMONAS EN <i>A. thaliana</i> .....	100
3.12.1. Niveles de metabolitos.....	101
3.12.2. Niveles hormonales.....	101
3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	102
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. La proteína P25 de <i>Potato virus X</i> (PVX) es el principal determinante de patogenicidad responsable de la necrosis sistémica en los sinergismos asociados a PVX.....	109
4.1. RESULTADOS.....	111
4.1.1. La agroinfiltración de PVX con supresores del silenciamiento génico induce respuestas de tipo HR (de <i>Hypersensitive response</i> ), que correlacionan con incrementos en la acumulación de los RNAs subgenómicos de PVX.....	111
4.1.2. La proteína P25 de PVX induce respuestas de tipo HR en <i>Nicotiana</i> spp. ....	115

4.1.3. P25 es el principal determinante de patogenicidad implicado en la inducción de respuestas de tipo HR en los sinergismos asociados a PVX.....	119
4.1.4. La actividad supresora del silenciamiento de P25 es necesaria para la inducción de respuesta de tipo HR.....	123
4.1.5. Los factores RAR1 y SGT1 regulan la respuesta de tipo HR inducida por P25 y la virulencia de la quimera PVX-HC .....	126
4.1.6. La coexpresión de P25 con VSRs potencia la actividad lipoxigenasa (LOX).....	130
4.2. DISCUSIÓN .....	133
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Efectos de la elevación de la concentración de CO <sub>2</sub> o la temperatura sobre la virulencia y los determinantes de patogenicidad del sinergismo <i>Potato virus X</i> (PVX)-potyvirus.....	141
5.1. RESULTADOS .....	143
5.1.1. Efecto de la concentración de CO <sub>2</sub> ([CO <sub>2</sub> ]) en la virulencia de los sinergismos asociados a PVX.....	143
5.1.2. Efecto de la [CO <sub>2</sub> ] en la respuesta de tipo HR inducida por la proteína P25 de PVX .....	148
5.1.3. Efecto de la temperatura (T) en la virulencia del sinergismo asociado a PVX .....	151
5.1.4. Efecto de la T en la respuesta de tipo HR inducida por la proteína P25 de PVX .....	155
5.2. DISCUSIÓN .....	161
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. Las infecciones víricas inducen efectos beneficiosos en las plantas durante el estrés por sequía, a través de la producción de ácido salicílico .....	167
6.1. RESULTADOS .....	169
6.1.1. Tolerancia a la sequía en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infectadas con virus .....	169
6.1.2. La transpiración disminuye en plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas por virus.....	173

6.1.3. Tolerancia a la sequía en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> infectadas con virus.....	178
6.1.4. La transpiración se incrementa en plantas de <i>A. thaliana</i> infectadas por virus .....	183
6.1.5. Eficacia reproductiva ( <i>fitness</i> ) en plantas infectadas por virus	188
6.1.6. Análisis metabólico y hormonal de <i>A. thaliana</i> infectada por virus y sometida a estrés por sequía .....	194
6.1.7. La tolerancia a la sequía inducida por la infección viral se ve modificada en plantas alteradas en rutas hormonales.....	203
6.2. DISCUSIÓN .....	208
7. DISCUSIÓN GENERAL.....	219
7.1. Comportamiento de PVX en el sinergismo .....	221
7.2. Papel de P25 en la SN .....	223
7.3. Hipótesis sobre la naturaleza de la necrosis inducida por P25 ....	225
7.4. El sinergismo ante el cambio climático .....	230
7.5. Sinergismo y CO <sub>2</sub> .....	231
7.6. Sinergismo y temperatura .....	233
7.7. Infecciones víricas y respuestas al estrés por sequía .....	237
7.8. Infecciones víricas, virulencia y tolerancia a la sequía .....	240
7.9. Infecciones víricas y eficacia biológica en el estrés por sequía.....	243
7.10. Infecciones víricas y transpiración en el estrés por sequía .....	244
7.11. Infecciones víricas y aclimatación al estrés por sequía .....	245
8. CONCLUSIONES .....	251
CONCLUSIONES .....	253
CONCLUSIONS .....	255
9. BIBLIOGRAFÍA .....	257



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIG 1</b>	Gráficos recogidos en la última edición del informe realizado por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC), relativos a las predicciones para niveles de CO <sub>2</sub> en la atmósfera, incremento de temperatura media global y cambios en la humedad del suelo, en los años 2081-2100	9
<b>FIG 2</b>	Modelo en zig-zag de la evolución de la respuesta inmune frente a patógenos, modificado para incluir a virus	26
<b>FIG 3</b>	Organización genómica de PVX	33
<b>FIG 4</b>	Organización genómica de PPV	43
<b>FIG 5</b>	Ejemplos de interacciones sinérgicas con aparición de necrosis sistémica (SN)	48
<b>FIG 6</b>	La expresión de PVX junto con VSRs induce necrosis de tipo HR en <i>N. benthamiana</i> .	113
<b>FIG 7</b>	La expresión de PVX P25 junto con VSRs induce una necrosis de tipo HR en <i>Nicotiana</i> spp	116
<b>FIG 8</b>	La expresión de PVX P25 a partir de un vector PPV incrementa la gravedad de los síntomas en <i>N. benthamiana</i> .	120
<b>FIG 9</b>	PVXΔP25 expresado en combinación con VSRs no induce respuestas de tipo HR	123
<b>FIG 10</b>	La inducción de respuestas de tipo HR correlaciona con la actividad supresora de PVX P25	124
<b>FIG 11</b>	El silenciamiento de los factores SGT1 o RAR1 en <i>N. benthamiana</i> atenúa la respuesta de tipo HR inducida por la combinación PVX P25/PPV HC	127
<b>FIG 12</b>	El silenciamiento de los factores SGT1 o RAR1 en <i>N. benthamiana</i> atenúa la SN inducida por la quimera PVX-HC	129
<b>FIG 13</b>	La agroinfiltración de las combinaciones PVX P25/VSRs potencia en <i>N. benthamiana</i> la actividad lipoxigenasa (LOX)	131
<b>FIG 14</b>	Análisis del grado de virulencia realizado sobre plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo concentraciones de dióxido de carbono ([CO <sub>2</sub> ]) ambientales (401 ppm) o elevadas (970 ppm)	144
<b>FIG 15</b>	Análisis de la virulencia de distintas infecciones sobre plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo [CO <sub>2</sub> ] elevada o ambiental	145
<b>FIG 16</b>	Comparación de los niveles de acumulación viral relativos en plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo [CO <sub>2</sub> ] ambientales o elevadas	147

<b>FIG 17</b>	Expresión transitoria de la proteína PVX P25 junto con VSRs en plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo [CO <sub>2</sub> ] ambientales o elevadas	150
<b>FIG 18</b>	Análisis del grado de virulencia de las infecciones sobre plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo T estándar o elevada	152
<b>FIG 19</b>	Comparación de los niveles de acumulación viral relativos en plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo T estándar o elevada	154
<b>FIG 20</b>	Expresión transitoria de la proteína PVX P25 junto con VSRs en plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo condiciones de T elevada o estándar	156
<b>FIG 21</b>	Expresión de la proteína PVX P25 junto con PPV HC en plantas de <i>N. benthamiana</i> crecidas bajo condiciones de T estándar o a baja T	158
<b>FIG 22</b>	Análisis de la actividad supresora del silenciamiento ejercida por P25-T7 en plantas crecidas a T elevada o estándar	159
<b>FIG 23</b>	La actividad de PVX P25 como supresor del silenciamiento por RNA es necesaria para el incremento en la respuesta de tipo HR inducido por temperatura T	160
<b>FIG 24</b>	Comparación de la tolerancia a la sequía entre plantas de <i>N. benthamiana</i> no infectadas e infectadas por virus	171
<b>FIG 25</b>	Impacto de la infección viral en la fotosíntesis y el metabolismo secundario de <i>N. benthamiana</i>	172
<b>FIG 26</b>	Comparaciones de pérdida de agua entre plantas de <i>N. benthamiana</i> no infectadas o infectadas con virus	175
<b>FIG 27</b>	Efectos de la infección en <i>A. thaliana</i> y acumulación viral	179
<b>FIG 28</b>	Comparación de la tolerancia a la sequía entre plantas de <i>A. thaliana</i> no infectadas e infectadas por virus	180
<b>FIG 29</b>	Impacto de la infección viral en la fotosíntesis y el metabolismo secundario de <i>A. thaliana</i> .	182
<b>FIG 30</b>	Comparaciones de pérdida de agua entre plantas de <i>A. thaliana</i> no infectadas o infectadas con virus	185
<b>FIG 31</b>	La arquitectura radicular en <i>A. thaliana</i> no se altera por la infección	187
<b>FIG 32</b>	Efectos de la infección con virus en la producción de semillas (eficacia biológica o <i>fitness</i> ) en plantas de <i>A. thaliana</i> crecidas bajo distintos regímenes hídricos	189
<b>FIG 33</b>	Análisis del estatus hídrico del suelo en sequía moderada y sequía extendida	190
<b>FIG 34</b>	Efecto de la infección en la viabilidad de las semillas y en el peso individual de la semilla en <i>A. thaliana</i> crecida bajo estrés por sequía moderada o extendida	192

<b>FIG 35</b>	Efectos de la infección con virus en la producción de semillas y en el número de plantas productoras de semillas (eficacia biológica o <i>fitness</i> ) en plantas de <i>N. benthamiana</i>	193
<b>FIG 36</b>	Perfil metabólico de plantas de <i>A. thaliana</i> infectadas con virus o no infectadas, crecidas bajo diferentes regímenes hídricos	195
<b>FIG 37</b>	Análisis de componentes principales (PCA)	199
<b>FIG 38</b>	Perfil hormonal de plantas de <i>A. thaliana</i> infectadas con virus o no infectadas, crecidas bajo diferentes regímenes hídricos	201
<b>FIG 39</b>	Análisis de correlación entre niveles de hormonas	202
<b>FIG 40</b>	Tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección con PPV-P25 en plantas de <i>A. thaliana</i> afectadas en la señalización hormonal	204
<b>FIG 41</b>	Sensibilidad al estrés por sequía en plantas infectadas de <i>N. benthamiana</i> NahG	207



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1</b>	Oligonucleótidos cebadores empleados en las clonaciones de proteínas de este trabajo	105
<b>TABLA 2</b>	Oligonucleótidos cebadores empleados en análisis de expresión génica	106
<b>TABLA 3</b>	Oligonucleótidos cebadores empleados para la construcción y el análisis de los vectores VIGS para el silenciamiento de SGT1 y RAR1	107
<b>TABLA 4</b>	Efectos de las infecciones víricas sobre el número (%) de plantas de <i>A. thaliana</i> productoras de semillas según régimen hídrico	191
<b>TABLA 5</b>	Número de metabolitos cuyos niveles se alteraron significativamente	199
<b>TABLA S1</b>	Nivel de metabolitos y test de Dunnett	*
<b>TABLA S2</b>	Pesos de metabolitos según PC	*

\* en soporte electrónico



**ABREVIATURAS**

13-LOX, 13-lipoxigenasa

2b, supresor del silenciamiento codificado por cucumovirus

3'-poliA, polinucleótido de adenina (cola poliA)

<sup>32</sup>P-sonda, sonda DNA marcada con <sup>32</sup>P

5'-CAP, caperuza 5'-metilguanosina

9-LOX, 9-lipoxigenasa

$\alpha$ -DOX,  $\alpha$ -dioxigenasa

$\psi_w$ , potencial hídrico

**A**

A, plantas de *Arabidopsis thaliana* no infectadas (agroinoculadas con GUS)

ABA, ácido abscísico

ADC (de *Arginine decarboxylase*), Arginina descarboxilasa

AGO (de *ARGONAUTE protein*), proteína de la familia ARGONAUTA

AUX, auxina

*Avr/Avr* (de *Avirulence gene/factor*), gen/factor de avirulencia

**B**

B, plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con PPV

BiP (de *ER luminal binding protein*), Proteína de unión luminal del ER

bZIP60 (de *basic leucine zipper 60*), [factor de transcripción] cremallera de leucina básica 60

**C**

C, plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con PPV-P25

CaM (de *calmodulin*), Calmodulina

CDK (de *Calcium-dependent kinase*), Kinasa dependiente de calcio

Chl-F (de *Chlorophyll fluorescence*), análisis de fluorescencia de la clorofila

CI (de *Cylindrical inclusion protein*), Proteína de inclusión cilíndrica

CK, citoquinina

CMV 2b (o simplemente 2b), supresor 2b de *Cucumber mosaic cucumovirus*.

## Abreviaturas

CMVΔ2b, virus CMV deletado en la secuencia codificante de 2b

COI-1 (de *Coronatine-insensitive 1*), factor Insensible a la coronatina-1

CP sgRNA3, RNA subgenómico de PVX a partir del cual se expresa la CP

CP, proteína de la cápsida

CTV P23 (o simplemente P23), supresor P23 de *Citrus tristeza closterovirus*

## D

D, plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con PVX-PPV

D, tratamiento de sequía suave de *Arabidopsis thaliana*

DAB, 3,3'-Diaminobenzidina

DAMP (de *Damage-associated molecular pattern*), patrón molecular asociado a daño

DCL (de *Dicer-like protein*), proteína tipo Dicer

DIG-ribosonda, ribosonda marcada con digoxigenina

dpa, días post-agroinfiltración (para *Nicotiana* spp.) o post-agroinoculación (para *Arabidopsis thaliana*)

dpr, días tras el último riego (días post-riego)

dsRNA (de *double-stranded RNA*), RNA de doble cadena

## E

ER (*Extreme resistance*), resistencia extrema

ET, etileno

ETI (de *Effector-triggered immunity*), inmunidad inducida por efectores

## F

Fru, fructosa

F<sub>v</sub> / F<sub>M</sub>, máxima eficiencia cuántica del fotosistema II

## G

GA, giberelina

Glc, glucosa

GolS2 (de *Galactinol synthase 2*), Galactinol (Gol) sintasa 2

gRNA (de *genomic RNA*), RNA genómico

GUS, β-glucuronidasa

**H**

HC (de HCPPro, *Helper component proteinase*), Componente auxiliar proteínasa, supresor del silenciamiento codificado por potyvirus

HR (de *Hypersensitive response*), respuesta hipersensible

HSP90 (de *Heat shock protein 90*), Proteína de choque térmico 90

**I**

Ile, isoleucina

IRE1 (de *Inositol-requiring protein-1*), Proteína dependiente de inositol-1

**J**

JA (de *Jasmonic acid*), ácido jasmónico

JA-Ile, JA-isoleucina

JAX-1 (de *Jacalin-type lectin required for potyvirus resistance 1*), lectina de tipo Jacalin necesaria para la resistencia a potyvirus 1

**L**

LOX, Actividad lipoxigenasa

LRR (de *Leucine-rich repeat*), dominio con repeticiones ricas en leucina

Lys, lisina

**M**

MAPK (de *Mitogen-activated protein kinase*), Kinasa activada por mitógenos

MCFI (de *Multicolor fluorescence imaging*), análisis de fluorescencia multicolor mediante la toma de imágenes

MeJA, ácido metiljasmónico

MES, ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico

miRNAs o miR (de *microRNA*), micro RNA

MS (de *Murashige and Skoog medium*), medio Murashige y Skoog

**N**

NahG, gen que expresa la enzima bacteriana salicilato hidroxilasa

NB (de *nucleotide binding domain*), dominio de unión a nucleótidos

NBT (de *nitroblue tetrazolium*), nitroazul de tetrazolio

NIa (de *Nuclear inclusion protein a*), Proteína de inclusión nuclear a

NIb (de *Nuclear inclusion protein b*), Proteína de inclusión nuclear b

## Abreviaturas

NLR (de *NB and LRR containing protein*), proteína [receptora] con dominios NB y LRR

## O

ORF (de *Open reading frame*), marco de lectura abierto

## P

P19, supresor del silenciamiento codificado por tombusvirus

P25 (o TGB1, de *Triple gene block 1*), supresor del silenciamiento codificado por potexvirus

P3N-PIPO, porción N-terminal de P3 fusionada a PIPO

PAMP (de *Pathogen-associated molecular pattern*), patrón molecular asociado a patógeno

PC (de *Principal component*), componente principal

PCA (de *Principal component analysis*), análisis de componentes principales

PCD (de *Programmed cell death*), Muerte celular programada

Phe, fenilalanina

PI-I (de *Proteinase inhibitor-I*), Inhibidor de proteinasa-I

PIPO (de *Pretty interesting Potyvirus ORF*), ORF muy interesante de potyvirus

PPV HC sgRNA, RNA subgenómico adicional en PVX-HC para la expresión de PPV HC

PPV HC, supresor HC de *Plum pox potyvirus*

PPV HCLH (o simplemente HCLH), mutante puntual L134H de PPV HC

PPV-P25, quimera de PPV que expresa la proteína P25 de PVX (PVX P25)

PR (de *Pathogenesis-related*), Proteína relacionada con la patogénesis

Pro, prolina

PRR (de *Pattern recognition receptor*), Receptor de reconocimiento de patrones

PTGS (de *post-transcriptional gene silencing*), silenciamiento génico post-transcripcional

PTI (de *Pattern-triggered immunity*), inmunidad inducida por patrones [moleculares]

Put, putrescina

PVX P25 (o simplemente P25), supresor P25 de *Potato virus X*

PVX-HC, quimera de PVX que expresa el HC del potyvirus PPV (PPV HC)

PVX $\Delta$ P25, virus PVX delecionado en la secuencia codificante de P25

PVX $\Delta$ TGB, PVX delecionado en el bloque de genes del TGB (de *Triple gene block*)

## R

R/R (de *Resistance gene/factor*), gen/factor de resistencia

## X

- R, tratamiento de rehidratación de *Arabidopsis thaliana*
- RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*), necesario para la resistencia mediada por MLA12
- RD29B (de *Responsive to desiccation 29B*), factor Sensible a la desecación 29B
- RDR (de *RNA-dependent RNA polymerase*), RNA polimerasa dependiente de RNA (celular)
- RdRp (de *RNA-dependent RNA polymerase*), RNA polimerasa dependiente de RNA (vírica)
- RISC (de *RNA-induced silencing complex*), complejo de silenciamiento inducido por RNA
- RITS (de *RNA-induced transcriptional silencing*), complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA
- RL (de *Rod-like structure*), estructura en forma de “barra”
- ROS (de *Reactive oxygen specie*), especie reactiva del oxígeno
- rpm, revoluciones por minuto
- Rubisco, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
- S**
- SA (de *Salicylic acid*), ácido salicílico
- SAR (de *Systemic acquired resistance*), respuesta sistémica adquirida
- SD, tratamiento de sequía intensa de *Arabidopsis thaliana*
- Ser, serina
- sgRNA (de *subgenomic RNA*), RNA subgenómico
- SGS3 (de *Suppressor of gene silencing3*), Supresor del silenciamiento génico 3
- SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*), Supresor del alelo G2 de SKP1
- SHR (de *Hypersensitive systemic response*), respuesta hipersensible sistémica
- SID2 (de *SA induction-deficient 2*), factor Deficiente en inducción de SA-2
- SIPK (de *Salicylic acid-induced protein kinase*), Proteína kinasa inducida por ácido salicílico
- siRNA (de *small interfering RNA*), pequeño RNA de interferencia
- SIZ-1 (de *SIZ-type small ubiquitin-related modifier E3 ligase*), SUMO E3 ligasa SIZ-1
- SN (de *Systemic necrosis*), necrosis sistémica
- SPVD (de *Sweet potato virus disease*), Enfermedad vírica de la batata
- sRNA (de *small RNA*), pequeño RNA
- siRNA (de *small interfering RNA*), pequeño RNA de interferencia

## Abreviaturas

ssRNA (de *Single-stranded RNA*), RNA de cadena sencilla (ssRNA+, de polaridad positiva; o ssRNA-, de polaridad negativa)

## T

T, temperatura

TBSV P19 (o simplemente P19), supresor P19 de *Tomato bushy stunt tombusvirus*

TD, enzima treonina desaminasa

TGB (de *Triple gene block*), Bloque génico triple, conjunto de secuencias de potexvirus, y de las correspondientes proteínas codificadas por las mismas (TGB1, TGB2 y TGB3).

TGB1 sgRNA1, RNA subgenómico de PVX a partir del cual se expresa TGB1 (P25)

TGS (de *transcriptional gene silencing*), silenciamiento génico transcripcional

Thr, treonina

Trp, triptófano

TUNEL (de *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), Marcado de final de corte con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal

## V

VIGS (de *Virus-induced gene silencing*), silenciamiento génico inducido por virus

VPE (de *Vacuolar processing enzyme*), Enzima de procesamiento vacuolar

VPg (de *Viral protein genome-linked*), proteína viral unida al genoma

VRC (de *Viral replication complex*), Complejo de replicación viral

vRNP (de *viral Ribonucleoprotein*), ribonucleoproteína viral

vsRNA (de *virus-derived small interfering RNA*), pequeño RNA de interferencia derivado de virus

VSR (de *viral suppressors of RNA silencing*), supresor vírico del silenciamiento por RNA

## W

W, tratamiento hidratado de *Arabidopsis thaliana*

wt (de *mild type*), genotipo silvestre

## ACRÓNIMOS DE VIRUS Y VIROIDES

### B

BCMV (de *Bean common mosaic potyvirus*), Potyvirus del mosaico común de la judía

BMV (de *Brome mosaic bromovirus*), Bromovirus del mosaico del bromo

BYDV (de *Barley yellow dwarf luteovirus*), Luteovirus del enanismo amarillo de la cebada

### C

CaMV (de *Cauliflower mosaic caulimovirus*), Caulimovirus del mosaico de la coliflor

CIYMV (de *Clover yellow mosaic potexvirus*), Potexvirus del mosaico amarillo del trébol

CMV (de *Cucumber mosaic cucumovirus*), Cucumovirus del mosaico del pepino

CTV (de *Citrus tristeza closterovirus*), Closterovirus de la tristeza de los cítricos

CymRSV (de *Cymbidium ringspot tombusvirus*), Tombusvirus de las manchas anulares de *Cymbidium*

### M

MDMV (de *MaiZe dwarf mosaic potyvirus*), Potyvirus del mosaico enanizante del maíz

### P

PepMoV (de *Pepper mottle potyvirus*), Potyvirus del moteado del pimiento

PepMV (de *Pepino mosaic potexvirus*), Potexvirus del mosaico del pepino dulce

PepRSV (de *Pepper ringspot tobnavirus*), Tobnavirus de las manchas anulares del pimiento

PIAMV (de *Plantago asiatica mosaic potexvirus*), Potexvirus del mosaico de *Plantago asiatica*

PLMVd (de *Peach latent mosaic viroid*), viroide del mosaico latente del melocotonero

PLRV (de *Potato leafroll polerovirus*), Polerovirus del enrollamiento de la hoja de patata

PNRSV (de *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*), Ilarvirus de los anillos necróticos de los *Prunus*

PPV (de *Plum pox potyvirus*), Potyvirus de la sharka (*plum pox*)

PVX (de *Potato virus X*), Potexvirus X de la patata

PVY (de *Potato virus Y*), Potyvirus Y de la patata

### S

SPCSV (de *Sweet potato chlorotic stunt crinivirus*), Crinivirus del enanismo clorótico de la batata

SPFMV (de *Sweet potato feathery mottle potyvirus*), Potyvirus del moteado plumoso de la batata

**T**

TAV (de *Tomato aspermy cucumovirus*), Cucumovirus de la aspermia del tomate

TBSV (de *Tomato bushy stunt tombusvirus*), Tombusvirus del enanismo ramificado del tomate

TCV (de *Turnip crinkle carmovirus*), Carmovirus del arrugamiento del nabo

TEV (de *Tobacco etch potyvirus*), Potyvirus del grabado del tabaco

TMV (de *Tobacco mosaic tobamovirus*), Tobamovirus del mosaico del tabaco

ToCV (de *Tomato chlorosis crinivirus*), Crinivirus de la clorosis del tomate

ToRSV (de *Tomato ringspot nepovirus*), Nepovirus de las manchas anulares del tomate

TRV (de *Tobacco rattle tobnavirus*), Tobnavirus del cascabeleo del tabaco

TSWV (de *Tomato spotted wilt tospovirus*), Tospovirus del bronceado del tomate

TuMV (de *Turnip mosaic potyvirus*), Potyvirus del mosaico del nabo

TVCV (de *Turnip vein-clearing tobamovirus*), Tobamovirus del aclaramiento de las venas del nabo

TYLCV (de *Tomato yellow leaf curl begomovirus*), Begomovirus del rizado amarillo del tomate

**W**

WCIMV (de *White clover mosaic potexvirus*), Potexvirus del mosaico del trébol blanco

**Z**

ZYMV (de *Zucchini yellow mosaic potyvirus*), Potyvirus del mosaico amarillo del calabacín

## RESUMEN

La presente Tesis Doctoral expone y discute una serie de trabajos en los que se estudia, por una parte, el factor vírico responsable de la inducción de necrosis en la interacción sinérgica que se da entre el virus PVX (de *Potato virus X*, un potexvirus) y virus del género *Potyvirus*; por otra parte, se analiza el efecto de diversos estreses ambientales asociados al cambio climático, como son la elevada concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera ([CO<sub>2</sub>]), el aumento de la temperatura (T) o la sequía, sobre el resultado de la interacción compatible planta-virus, en infecciones sencillas o mixtas, con los virus participantes en la interacción PVX-potyvirus mencionada más arriba, o con quimeras derivadas de ellos.

Las infecciones múltiples de virus en un hospedador compatible son habituales en la naturaleza; de hecho, constituyen más bien la norma. Cuando más de un virus se establece en un mismo hospedador, pueden tener lugar una serie de interacciones que, en su mayoría, presentan implicaciones epidemiológicas y patológicas pobremente caracterizadas, frecuentemente imprevisibles, y ampliamente dependiente de factores ambientales. Entre estos factores ambientales se encuentran precisamente la [CO<sub>2</sub>] en la atmósfera, la T y la disponibilidad de agua, cuyos valores se encuentran en permanente cambio como consecuencia de la actividad humana y del calentamiento global asociado.

Una de estas interacciones víricas, el sinergismo viral, suele conducir a un incremento en la acumulación de uno de los virus durante la infección mixta; además, este sinergismo suele ir acompañado de unos síntomas mucho más graves que aquellos provocados por las infecciones sencillas, lo que se conoce también como sinergismo en patología. Uno de los síntomas más extremos se corresponde con la aparición de necrosis sistémica (SN, de *Systemic necrosis*). PVX-potyvirus constituye un par sinérgico que cumple esta pauta de comportamiento en un hospedador susceptible como es *Nicotiana tabacum*. En este sinergismo, solo PVX incrementa de forma notable su acumulación en presencia del potyvirus, en relación a la infección sencilla, y va acompañado de la aparición de SN. Este incremento se ha relacionado con el factor HC (de

HCPro, *Helper component proteinase*) derivado de potyvirus, el cual es una proteína que actúa como supresor del silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs (VSR, de *Viral suppressor of RNA silencing*). Esta variante del silenciamiento génico es una de las principales respuestas defensivas en plantas frente a las infecciones por virus, cuya misión es degradar el RNA viral, impedir su generación o evitar su expresión. En presencia de HC, la supresión del silenciamiento potenciaría en la planta la acumulación de PVX.

Sin embargo, en otro huésped susceptible, como es *Nicotiana benthamiana*, el sinergismo en patología de PVX-potyvirus no va acompañado de un incremento en la carga viral. En muchos otros casos de sinergismos en patología tampoco se observa un incremento en la acumulación de ninguno de los virus. Por tanto, estas observaciones, en general, permiten cuestionar una conexión directa entre mayor virulencia y acumulación viral en este tipo de interacciones sinérgicas. Las quimeras de PVX portadoras del VSR de potyvirus (PVX-HC) son capaces de reproducir el sinergismo en patología observado en las infecciones mixtas PVX-potyvirus, lo que señala a este factor potyviral como suficiente y necesario para la manifestación de la SN. Estas quimeras, a su vez, sugieren la existencia de uno o más factores en PVX con capacidad para inducir necrosis cuando su acción es potenciada en presencia del HC potyviral, durante la infección mixta PVX-potyvirus.

El primer objetivo de la presente tesis ha sido determinar el factor o factores de PVX responsables últimos de la inducción de SN. Para ello, se intentó reproducir a nivel local la necrosis inducida por PVX-potyvirus, coexpresando PVX junto con HC de PPV (de *Plum pox potyvirus*) en *N. benthamiana*. PVX, en presencia de este VSR en *trans*, fue capaz de inducir necrosis en los parches agroinfiltrados. Esta necrosis se analizó a través de medidas de liberación de electrolitos y tinciones histoquímicas indicativas de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, de *Reactive oxygen species*), en muestras de tejido agroinfiltrado. El análisis mediante *northern blot* de la acumulación de los RNAs de PVX, genómico (gRNA) y subgenómicos (sgRNAs), en presencia de HC, puso de manifiesto que la actividad de este VSR afecta preferente al nivel de acumulación de estos últimos, estabilizándolo o

incrementándolo. Este efecto también fue confirmado a nivel sistémico, en el contexto de la interacción sinérgica PVX-PPV. Uno de los sgRNAs afectados, el sgRNA1 de PVX, codifica la proteína P25 (TGB1, de *Triple gene block 1*). P25 es una proteína multifunción con participación en procesos tales como replicación, movimiento dentro de la célula y entre células, y supresión del silenciamiento génico, como VSR de PVX. La expresión aislada de P25, en presencia de HC, o de otros VSRs no potyvirales, fue suficiente para inducir necrosis tanto en *N. benthamiana* como en *N. tabacum*. Además, esta necrosis fue dependiente de dosis de P25.

Para determinar si P25 induce necrosis en un contexto de infección con potyvirus, de forma sistémica, se empleó un vector derivado del virus PPV modificado para incluir la ORF de P25 (quimera PPV-P25). PPV-P25 fue capaz de originar focos necróticos a nivel sistémico, aparte de ocasionar un empeoramiento general de los síntomas, en comparación con plantas infectadas con PPV. Para descartar la contribución de cualquier otra proteína distinta a P25 en la necrosis producida por PVX en presencia de HC, se hizo uso del mutante PVX $\Delta$ P25, el cual expresa una forma no funcional de P25, delecionada en posición C-terminal. La agroinfiltración simultánea de PVX $\Delta$ P25 con HC no fue capaz de inducir necrosis, al contrario que la agroinfiltración de PVX silvestre con HC. De este modo, P25 emerge como el principal determinante de patogenicidad responsable de la necrosis observada en los sinergismos asociados a PVX. En la interacción PVX-PPV, la actividad de HC como VSR estabilizaría los niveles de acumulación del sgRNA1 de PVX, y por tanto podría incrementar los niveles de P25, ocasionando SN.

El empleo de diversas formas mutadas de P25 puso de manifiesto que la capacidad de esta proteína para inducir necrosis parece estar asociada a su actividad como VSR. Esta actividad supresora se determinó a través del efecto que P25 ejerce sobre los niveles de acumulación del mRNA de una proteína reportera, como es GFP, cuando se agroinfiltran simultáneamente. También, mediante estudios de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, de *Virus-induced gene silencing*) de SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) y RAR1 (de *Required for MLA12 resistance*

1), factores asociados a la respuesta hipersensible (HR, de *Hypersensitive response*), se puso de manifiesto que la necrosis inducida por P25 se ejecuta a través de mecanismos que implican a factores comunes con esta respuesta, lo que sugiere la existencia de un factor de resistencia R implicado en el reconocimiento de P25 como factor de avirulencia Avr. Sin embargo, esta posibilidad no descarta otras, como que la necrosis sea debida a una respuesta de estrés en el retículo inducida por la acumulación de proteína mal plegada (UPR, de *Unfolded protein response*), como consecuencia de la remodelación a la que se encuentra sometido por la acción de P25.

El incremento constante de la concentración de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, y el aumento de T asociado al mismo, son responsables de un calentamiento global cuyas consecuencias seguramente se vean agudizadas en el futuro. Según el IPCC (de *Intergovernmental panel on climate change*), en el año 2100 se podría alcanzar una [CO<sub>2</sub>] en la atmósfera de hasta 1000 ppm, en relación a las 400 ppm actuales, lo que iría ligado a incrementos de la temperatura media del planeta de 3-4°C. Por todo ello, es relevante el estudio de interacciones planta-virus modelo en escenarios que contemplen variables asociadas al cambio climático. En cuanto al efecto de estos factores sobre el resultado de las interacciones sinérgicas, ningún análisis se ha realizado al respecto hasta el presente trabajo. En esta tesis, se analizaron plantas de *N. benthamiana* infectadas con PVX, PPV, o con la infección mixta PVX-PPV, bajo atmósferas con 970 ppm de CO<sub>2</sub>, en relación a los controles mantenidos a la concentración habitual de 401 ppm; también se analizaron las mismas infecciones a temperaturas de 30°C, en relación a los controles mantenidos a T estándar de 25°C.

La elevada [CO<sub>2</sub>] ocasionó una disminución de la virulencia solo en las infecciones sencillas, mientras que en las mixtas no se observaron variaciones a este respecto, en relación a las infecciones a la [CO<sub>2</sub>] habitual. La virulencia se estimó a través de la liberación de electrolitos y de tinciones histoquímicas indicativas de la producción de ROS. La atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> presentó también efectos dispares sobre la carga viral, analizada mediante *northern blot* y PCR cuantitativa. La alta T ocasionó una disminución de la virulencia y de la carga viral en la

infección sencilla con PPV, y en la mixta con PVX-PPV, en relación a las infecciones analizadas a la T estándar. Para la infección sencilla con PVX, sin embargo, no se registró ningún cambio en la virulencia a elevada T, pese a que este estrés sí determinó una reducción de la carga viral. Posteriormente, se estudió la capacidad necrogénica de P25 en estas condiciones ambientales, para lo que se agroinfiltró en presencia del factor HC de PPV. P25 indujo menos necrosis en elevada [CO<sub>2</sub>], mientras que la T la aumentó, y ocasionó una aparición más temprana de la misma. Esta mayor capacidad necrogénica de P25 a elevada T podría explicar la ausencia de cambios en la virulencia de PVX en estas mismas condiciones, pese a registrarse una menor carga viral. Cuando se analizó la actividad supresora de P25 no se observaron diferencias relevantes bajo la acción de ninguno de los dos estreses estudiados. Por tanto, otros procesos distintos al silenciamiento génico deben de estar operando bajo la elevada [CO<sub>2</sub>] o las altas T, modulando los niveles de acumulación viral y la necrosis inducida por P25. En cualquier caso, estos estudios apuntan a un comportamiento diferencial entre las infecciones sencillas y las infecciones mixtas bajo la acción de cada uno de estos factores ambientales. Debido al cambio climático, una mayor ocurrencia de infecciones mixtas es esperable en el futuro, por lo que este comportamiento diferencial podría acarrear importantes implicaciones epidemiológicas y patológicas.

Un estrés abiótico frecuente en cultivos, y cuyos efectos podrían agudizarse en numerosas regiones del planeta, es el correspondiente a la falta de agua. El IPCC contempla para el año 2100 un incremento en la frecuencia e intensidad de fenómenos extremos tales como sequías prolongadas, como consecuencia de un sistema climático más inestable en un mundo más cálido. Los cambios metabólicos y hormonales que ocasiona una infección en el hospedador pueden alterar su respuesta a un estrés por déficit hídrico sobrevenido. Para explorar esta posibilidad, en el presente trabajo de tesis se emplearon los hospedadores experimentales *N. benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*, sanos o infectados con los virus indicados más arriba, y sometidos a distintos grados de privación de agua. Se realizaron estimaciones de la tolerancia a la sequía medida como el contenido (%) en agua de la planta, en relación a su peso

total. Se determinó la eficacia reproductiva a través del análisis de la producción de semillas y del número de plantas productoras de semillas por tratamiento. Una estimación de la inducción de respuestas de estrés a las infecciones se realizó a través de sus efectos sobre la acumulación de metabolitos secundarios y sobre la eficiencia fotosintética, analizados mediante medidas de fluorescencia. También se realizaron análisis de transpiración (curvas de deshidratación, termografía y análisis conductimétricos) y de parámetros morfológicos (número de estomas, índice estomático y arquitectura radicular), con el objetivo de encontrar posibles correlaciones entre ellos y las variaciones observadas en la tolerancia a la sequía. En *A. thaliana* también se analizó la modificación del perfil metabólico y hormonal en las plantas sanas o infectadas, y sometidas a los siguientes tipos de regímenes hídricos: plantas hidratadas, plantas sometidas a un período de sequía breve o a uno de sequía intensa, y plantas rehidratadas tras el período de sequía intensa. El papel de las hormonas en el incremento de la tolerancia al estrés hídrico se analizó mediante el empleo de mutantes de *A. thaliana* y *N. benthamiana* infectados con la quimera PPV-P25.

Todas las infecciones incrementaron la tolerancia a la deshidratación en mayor o menor grado, en ambos hospedadores. Sin embargo, este efecto fue más pronunciado para las infecciones más virulentas, esto es para PPV-P25 y PVX-PPV en *N. benthamiana*, y para PPV-P25 en *A. thaliana*. Este incremento en la tolerancia no fue seguido, sin embargo, de una mayor eficacia biológica para las infecciones más virulentas. Sólo en *A. thaliana*, las infecciones de virulencia moderada fueron capaces de incrementar la eficacia biológica bajo estrés hídrico, en relación a las plantas no infectadas. Estos datos sugieren que no debe inferirse una conexión directa entre un incremento en la tolerancia a la deshidratación en plantas infectadas con virus y una mayor eficacia biológica, sin considerar una posible contribución negativa de la virulencia. Los incrementos en eficacia biológica son, además, dependientes de hospedador.

En *N. benthamiana*, la mayor tolerancia a la deshidratación en plantas infectadas con virus podría relacionarse con la menor tasa de transpiración observada en estas plantas. En el caso de *A. thaliana*, se

determinó una mayor tasa de transpiración en las plantas infectadas, por lo que este factor podría no ser relevante en este hospedador para la adquisición de tolerancia. Esto sugiere que la tolerancia a la deshidratación inducida por los virus podría residir sobre mecanismos esencialmente diferentes en ambos hospedadores, en lo que concierne a la transpiración.

En *A. thaliana*, el estrés hídrico determina la acumulación de numerosos metabolitos protectores, como azúcares, poliaminas y aminoácidos. Estos compuestos reducen el potencial hídrico facilitando la adquisición de agua del sustrato, y están implicados en la desactivación de ROS y en la estabilización de estructuras celulares durante la deshidratación. En el análisis de perfiles metabólicos del presente estudio, se identificaron galactinol, triptófano, fructosa y prolina, entre otros, como metabolitos destacados. El tipo de régimen hídrico al que fueron sometidas las plantas representó el principal modulador de su perfil metabólico, mayor que la infección viral. Sin embargo, las plantas infectadas, de forma previa a la exposición a la sequía, ya presentaban alterados los niveles de numerosos metabolitos, siendo esta alteración más notable en la infección más virulenta, PPV-P25. Este estatus diferenciado de las plantas infectadas con PPV-P25 también fue evidente en el análisis de agrupamiento jerárquico realizado sobre el total de datos metabólico. En este tipo de infección se acumularon compuestos protectores destacados como la putrescina. Esta aclimatación metabólica previa puede ser la responsable de la mayor tolerancia al estrés por sequía observado en las plantas de *A. thaliana* infectadas, efecto más pronunciado en la infección con PPV-P25.

Las distintas infecciones también otorgaron a *A. thaliana* un estado hormonal diferenciado en los distintos regímenes hídricos estudiados. En general, el incremento en la acumulación de ácido abscísico (ABA) que se produjo en plantas sanas a medida que aumentó el estrés hídrico, no fue observado en las plantas infectadas, las cuales sí acumularon ácido salicílico (SA). Esta observación está en consonancia con el comportamiento antagónico que se ha propuesto para la interacción SA-ABA. Los mutantes de *A. thaliana* y *N. benthamiana* afectados en la síntesis o en la acumulación de SA, infectados con PPV-P25, no

mostraron una mayor tolerancia a la sequía. De este modo, el incremento en la tolerancia a sequía inducido por las infecciones virales parece estar mediado por la hormona SA en estos dos huéspedes.

## SUMMARY

This PhD Thesis exposes and discusses research work consisting of the following topics: i) the viral factor responsible for systemic necrosis elicited during viral synergistic interactions between PVX (*Potato virus X*, a potexvirus) and viruses belonging to *Potyvirus* genus, and ii) the effect of environmental stresses associated to climate change, such as high levels of CO<sub>2</sub> in the atmosphere ([CO<sub>2</sub>]), elevated temperatures (T) or drought, on the outcome of compatible plant-virus interactions, on single or mixed infections, with viruses taking part in the PVX-potyvirus interaction mentioned above, or chimeric viruses deriving from them.

Mixed infections in a compatible host are common phenomena in nature; in fact, they are the rule rather than the exception. A number of different viral interactions can take place when several viruses are established in the same host. These interactions have epidemiological and pathological implications that are poorly characterized, frequently unpredictable, and largely influenced by environmental factors. Among these environmental factors are [CO<sub>2</sub>] in the atmosphere, T and water availability, whose values are continuously being modified as a result of human activities and the associated global warming.

One of these interactions, viral synergism, usually lead to increased titre of one of the viruses during mixed infections; in addition, this synergism usually is accompanied by increased severity of symptoms, more severe than those observed in single infections with each of the viruses, a phenomenon also known as synergism in pathology. One of the most extreme symptoms induced by these synergistic infections is systemic necrosis (SN). PVX-potyvirus is a classical synergistic pair following this behaviour in the susceptible host *Nicotiana tabacum*. This synergism leads to remarkably increased titres of PVX in the presence of the potyvirus, in comparison with single infection, remaining the potyvirus unchanged, and eliciting SN. This increased level of PVX has been attributed to the HC factor (HCPro, *Helper component proteinase*) derived from potyviruses; HC acts as a viral suppressor of the RNA silencing (VSR) mediated by small RNAs. This type of gene silencing is

the main mechanism involved in plant defence against viruses; RNA silencing acts promoting the degradation of targeted RNA, avoiding its generation or precluding its expression. The presence of HC could also enhance PVX titres as a result of its suppressor activity.

Nevertheless, in *Nicotiana benthamiana*, another susceptible host, synergism in pathology induced by PVX-potyriviruses is not associated with increased viral titres. Many different synergistic interactions apart from the one mentioned above show increases in severity of symptoms that are not accompanied by increases in viral titres. So, all of these observations call into question that enhanced virulence associated with synergistic interactions is the consequence of an increase in viral titres. Chimeric forms of PVX expressing VSR derived from potyriviruses (PVX-HC) are able to induce the synergism in pathology observed in mixed infections with PVX-potyrivirus, which point out to this potyvirial factor as necessary and sufficient to induce SN. At the same time, the behaviour of these chimeric viruses suggests the presence of one or more pathogenicity factors encoded by PVX, which are able to induce necrosis when their activities are enhanced by potyvirial HC during PVX-potyrivirus mixed infections.

The first objective of the present thesis has been the isolation of the factor(s) encoded by PVX responsible for SN. In order to do so, it was attempted to reproduce at local level the necrotic response elicited by PVX-potyrivirus, by co-expressing PVX together with HC from PPV (*Plum pox potyrivirus*) in *N. benthamiana*. In agroinfiltrated patches, PVX was able to induced necrosis in the presence of this VSR *in trans*. The necrotic response was analyzed in samples taken from agroinfiltrated tissue by measuring electrolyte leakage, and by histochemical staining indicative of the generation of oxygen reactive species (ROS). Northern blot analyses of the accumulation of the different PVX RNAs, i. e., genomic RNA (gRNA) and subgenomic RNAs (sgRNAs), in the presence of HC, identified the sgRNAs as the main targets affected by the VSR activity of HC; the potyvirial factor stabilized or increased sgRNA levels. This effect was also confirmed at systemic level, in the context of a PVX-PPV synergistic interaction. One of the sgRNAs whose level was stabilized was sgRNA1. This sgRNA1 encodes the P25

protein (TGB1, *Triple gene block 1*). P25 behaves as a multifunctional protein involved in replication, intracellular and cell-to-cell movement, and, as the PVX VSR, is responsible for suppression of gene silencing. When P25 was expressed individually, in the presence of HC or together with other non-potyviral VSRs, a necrotic response was induced in *N. benthamiana* and *N. tabacum*. This necrosis was also P25 dose-dependent.

In order to analyze if P25 can induce necrosis in the context of a potyviral infection, in systemic locations, a PPV-derived vector was modified to include the P25 ORF (PPV-P25 chimera). PPV-P25 was able to produce necrotic foci and to induce a general worsening of symptoms, when compared with PPV-infected plants. To discard the contribution of PVX proteins other than P25 in eliciting necrosis with potyviral HC, a PVX $\Delta$ P25 mutant was obtained. This mutant expresses a non-functional P25 protein, deleted at the C-terminus. Simultaneous agroinfiltration of PVX $\Delta$ P25 together with HC was not able to induce necrosis, as was wild type PVX with HC. So, P25 arises as the main pathogenicity factor responsible for necrosis in PVX-associated synergisms. In the context of a PVX-PPV synergistic interaction, the VSR activity of HC stabilizes the level of accumulation of PVX sgRNA1, which could lead to higher levels of P25 in the cell, and in turn eliciting SN.

The ability of P25 to elicit necrosis seems to be associated with its suppressor activity, as was determined by using different mutant forms of P25. The suppressor activity of P25 was estimated by measuring the effect of this VSR on the accumulation of a reporter GFP mRNA, when the VSR and the reporter protein were co-agroinfiltrated. Also, the involvement of factors like SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) and RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*) in the induction of SN response was analyzed by virus-induced gene silencing (VIGS). These two factors are associated with the hypersensitive response (HR). These studies demonstrated that both HR and SN are executed through mechanisms involving shared factors like RAR1 and SGT1. So, these results suggest the existence of a putative resistance (R) factor responsible for recognizing P25 as an avirulence (Avr) factor. However, these findings are compatible with other explanations. In this regard, the

accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER), whose modification and rearrangement are induced by P25, could induce the activation of the 'unfolded protein response' (UPR), leading to necrosis when this stress is not resolved.

The rising [CO<sub>2</sub>] in the atmosphere, and the increasing T associated, are responsible for a global warming whose effects may be magnified in the future. In 2100, IPCC (*Intergovernmental panel on climate change*) predicts a [CO<sub>2</sub>] in the atmosphere of around 1000 ppm, compared with the current 400 ppm, which may lead to increases of 3-4°C in average global temperatures. Because of this reason, it is important to analyze model plant-virus interactions under environmental parameters associated to climate change. Regarding to the effects of these environmental factors in the outcome of synergistic interactions, no analysis has been previously carried out until the present work. In this thesis, *N. benthamiana* plants infected with PVX, PPV or the mixed infection with PVX-PPV, were analyzed under a 970 ppm CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere, and were compared with plants kept at standard concentration of 401 ppm; in addition, the same kind of infections were analyzed at temperature of 30°C, and were also compared with the ones kept at standard temperature of 25°C.

Elevated [CO<sub>2</sub>] led to decreased levels of virulence in single infections, while the virulence of mixed synergistic infections remained unchanged, when compared with the corresponding infections at standard [CO<sub>2</sub>]. Virulence was estimated through electrolyte leakage measurements and histochemical staining indicative of ROS production. The effects of the CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere on viral titres varied among infections, as revealed by quantitative PCR and northern blot analyses. High T led to decreased levels of virulence and viral titres in plants singly infected with PPV, and in mixed infections with PVX-PPV, when compared with infections kept at standard T. Unlike the others, virulence of single infection by PVX remained unchanged, even though this abiotic stress reduced viral titre. Afterwards, the necrogenic property of P25 in combination with HC from PPV was studied under variable environmental conditions. P25-induced necrosis was reduced at high [CO<sub>2</sub>] levels, and conversely elevated T led to an earlier and increased

expression of necrosis. This higher necrotic potential of P25 at elevated T could explain why PVX virulence remained unchanged under the same conditions, even though viral titres were decreased. When the suppressor activity of P25 was analyzed, no differences were observed under the examined environmental conditions. These results point out mechanisms other than gene silencing in modulating viral accumulation and P25-induced necrosis under high [CO<sub>2</sub>] or elevated T. Anyway, these observations indicate a differential behaviour of single infections versus mixed synergistic ones under each of these environmental factors. Because of climate change, a higher frequency of mixed infections is expected in the future; so, the aforementioned differences on virulence may have pathological and epidemiological relevance.

Drought is a common abiotic stress affecting crops, whose detrimental effects may be worse in the future. IPCC predicts for 2100 a higher frequency and intensity of extreme phenomena, like long periods of drought, as a result of a much more unstable climatological system in a warmer world. Metabolic and hormonal changes in the host produced by viral infections can potentially modify its responses to subsequent drought stresses. In order to explore these possibilities, in the present work *N. benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* were used as model hosts. These plants were mock-inoculated or inoculated with the viruses mentioned above, and subjected to different degrees of water deprivation. The level of tolerance to drought exhibited by these plants was estimated based mainly on water (%) content measurements, relative to total weight. Reproductive efficiency (fitness) was estimated through seed production and the number of plants producing seeds. Stress responses to viral infections were studied by determining the accumulation of secondary metabolites and the photosynthetic efficiency, parameters that were analyzed by fluorescence analysis. Transpiration rates (through dehydration curves, thermography and stomatal conductance) and morphological parameters (stomata number, stomatal index and root architecture) were also determined in these plants, to seek out correlations between these parameters and changes in tolerance to drought. In *A. thaliana*, metabolic and hormonal changes associated with infection and with different water regimes were also

analyzed; these water regimes were: watered plants, plants subjected to moderated drought or to severe drought, and plants re-watered after a period of severe drought. In addition, the role of hormonal regulation in enhanced tolerance to drought stress was analyzed by using *A. thaliana* and *N. benthamiana* mutant plants infected with PPV-P25.

All virus-infected plants exhibited higher tolerance to drought than mock-inoculated plants, in both *A. thaliana* and *N. benthamiana*, although to different extent. Plants infected with the most virulent infections showed the highest tolerance to drought, that is, infections by PPV-P25 and PVX-PPV in *N. benthamiana* and infection by PPV-P25 in *A. thaliana*. In spite of this increased tolerance, the most virulent infections did not confer an increased fitness to the host. In *A. thaliana*, only infections with moderate virulence led to higher fitness in drought-stressed plants, when compared with mock-inoculated plants. All of these data suggest that increased fitness cannot be inferred directly from an increase in the level of tolerance to drought, because a probable negative contribution of virulence should be taken into account. In addition, the increase in fitness caused by virus infection is host-dependent.

In *N. benthamiana*, higher levels of tolerance to drought stress in virus-infected plants might be related with reduced transpiration rates. However, in *A. thaliana* an increase of transpiration rates was observed upon viral infection, which probably rules out a direct contribution of this parameter to drought tolerance in this host. These results also suggest that tolerance induced by viral infection may be executed through different mechanisms in these two experimental hosts, at least with regard to transpiration.

*A. thaliana* accumulates protective metabolites like sugars, polyamines and amino acids under stresses induced by water deficit. All these compounds decrease water potential, which in turn makes it easier for the plant to uptake water from the substrate. These compounds are also involved in ROS detoxification and the stabilization of cell structures during dehydration processes. In the metabolic profiling analysis carried out in the present work, *A. thaliana* accumulated galactinol, tryptophan, fructose and proline as relevant drought stress-

induced compounds. Water regime was the main parameter determining metabolic shifting among samples, and more important than viral infection. Nevertheless, infected plants showed high levels of these compounds even before being subjected to water deprivation; moreover, the levels of these metabolites were higher in plants with the most virulent infection, i. e., PPV-P25. The altered metabolic status of PPV-P25-infected plants was also evident when a hierarchical clustering analysis was done over the entire metabolic dataset. Infections with this chimeric virus led to high accumulation levels of some prominent protective compounds like putrescine. So, metabolic acclimation prior to water deprivation may be responsible for the increased tolerance to drought stress exhibited by virus-infected *A. thaliana*, which is more evident in PPV-P25-infected plants.

Viral infections also conferred a differential hormonal status in *A. thaliana* subjected to the distinct water regimes analyzed. In general, an increase of abscisic acid (ABA) content followed the worsening of drought symptoms in mock-inoculated plants. This increase in ABA was not observed in virus-infected plants; instead, they showed elevated levels of salicylic acid (SA). This observation is in line with the antagonistic interaction proposed for SA-ABA. *A. thaliana* and *N. benthamiana* mutant plants defective for SA synthesis or accumulation did not show enhanced tolerance to drought when they were infected by PPV-P25. Therefore, the increased tolerance to drought induced by virus infection could be mediated by the hormone SA in these two experimental hosts.



# 1. INTRODUCCIÓN

---





## 1.1. VIRUS, ENTORNO Y CAMBIO CLIMÁTICO

Los organismos autótrofos, entre los que se encuentran las plantas, introducen energía en los ecosistemas: constituyen la base de estos al actuar como productores primarios, transformando la energía solar en energía química. De igual modo, las numerosas especies vegetales domesticadas y cultivadas por el hombre, constituyen la base de su propia cadena alimentaria. El estudio de la Patología Vegetal se erige así en una disciplina capital dentro de la Biología, no solo desde una perspectiva teórica, sino también desde su vertiente puramente aplicada, ya que resulta clave para garantizar ese suministro de alimentos.

Las plantas, como organismos sésiles, se encuentran sometidas a situaciones de estrés biótico o abiótico frecuentes a los que deben hacer frente. Uno de los factores de estrés biótico recurrente es el debido a las infecciones víricas, muchas de las cuales derivan en enfermedades con implicaciones económicas y agronómicas significativas.

De los más de 700 virus de plantas conocidos, muchos de ellos ocasionan importantes pérdidas de cantidad y/o calidad en la producción (Strange y Scott, 2005). De este modo, las pérdidas económicas en la producción a nivel mundial asociadas a infecciones víricas se han estimado en torno a los 30 mil millones de dólares anuales (Sastry y Zitter, 2014). Algunas cifras, a modo de ejemplo, son: en patata, las infecciones producidas por PLRV (*Potato leafroll polerovirus*) ocasionan pérdidas anuales de 100 millones de dólares en Estados Unidos, y de 30-50 millones de libras en Reino Unido (Wale *et al.*, 2008; Sastry y Zitter, 2014); las infecciones producidas por CTV (*Citrus tristeza closterovirus*) conllevan la pérdida anual de más de 100 millones de árboles en cultivo de cítricos, a nivel mundial (Moreno *et al.*, 2008; Harper, 2013); y una estimación eleva a más de 10 mil millones de euros el coste global correspondiente al manejo de la enfermedad de la sharka, debida a PPV (*Plum pox potyvirus*), en frutales del género *Prunus*, desde los años 70 (Cambra *et al.*, 2006). Además, muchos de estos virus pueden presentar una amplia gama de hospedadores, así como disponer de numerosos vectores implicados en la diseminación de los mismos, cuando no de la mala praxis o del desconocimiento de los mecanismos de transmisión

por parte del agricultor. Estos dos últimos factores resultan decisivos en la extensión de enfermedades víricas de plantas en países en vías de desarrollo (Schreinemachers *et al.*, 2015). Por todo ello, el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la aparición de enfermedad y manifestación de síntomas, en interacciones planta-virus modelo, resulta fundamental, ya que permite entender y por lo tanto abordar eficientemente estos problemas.

La mayoría de los virus de plantas están constituidos por una o más moléculas de ácidos nucleicos protegidos por una cubierta proteica o cápsida (CP), en una o más partículas víricas. Dentro del genoma, las secuencias codificantes de unas pocas proteínas se encuentran ampliamente compactadas y en muchos casos superpuestas, dando lugar a genomas discretos que se empaquetan fácilmente por las proteínas CP (Gopal *et al.*, 2014). Los genomas pueden presentarse en forma de RNA de cadena sencilla (y polaridad positiva o negativa, ssRNA+ o ssRNA-), de DNA de cadena sencilla, o de RNA o DNA de doble cadena. Los más comunes en cuanto a número de especies se refiere son los correspondientes a virus con genomas de ssRNA+ (Hull, 2002). Además, estos virus de RNA presentan una elevada tasa de recombinación y de mutación, de  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  sustituciones por nucleótido y por evento de replicación, en comparación con las  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  sustituciones por nucleótido y por evento de replicación característicos de los virus de DNA, debido a la ausencia de RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRp) con actividad correctora de pruebas. Estas altas tasas de mutación posibilitan la aparición de nuevas formas víricas y pueden favorecer la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador (Elena *et al.*, 2008; Sanjuán *et al.*, 2010).

Para que el virus penetre en la planta debe producirse algún tipo de daño mecánico o herida que comprometa la integridad de la cutícula y la pared celular (Shaw, 1999). Este tipo de eventos ocurren bien de forma fortuita debido a factores climatológicos o como resultado del daño ocasionado por los herbívoros en su alimentación, o a consecuencia de las labores agrícolas en el caso de plantas cultivadas. De especial relevancia es sin embargo la transmisión debida a organismos vectores tales como hongos, ácaros, nematodos, o más habitualmente insectos,

por ejemplos pulgones, que se alimentan de la savia y deben atravesar la superficie vegetal para tener acceso a ella. Una vez en la planta, la partícula vírica se desensambla liberando el material genético y permitiendo la expresión de las proteínas que codifica. Esto posibilita la replicación y movimiento del virus tanto a corta como a larga distancia (Hull, 2002). Todo ello conlleva la interacción con numerosas proteínas del hospedador que determinan, entre otros parámetros, la especificidad de la infección y la capacidad de inducir alteraciones en la homeostasis del mismo. Estas alteraciones pueden desembocar en la aparición de enfermedad, pero también llevar aparejadas cambios metabólicos y hormonales responsables, por ejemplo, de una modificación en el patrón de emisión de compuestos volátiles por parte de la planta, haciéndola más atractiva a insectos vectores potenciales (Blanc y Michalakis, 2016).

Las interacciones virus-vector pueden ser notablemente complejas. Parámetros como el tiempo de permanencia del virus en el vector y la replicación en el mismo -si la hay-, o la facilidad con la que el virión se libera a la nueva célula hospedadora, determinan el éxito de la infección. El virus también puede modificar el comportamiento de sus insectos vectores, por ejemplo alterando sus hábitos de alimentación, consiguiendo de este modo maximizar el número de adquisiciones y transmisiones de partículas víricas (Blanc y Michalakis, 2016).

De igual importancia que los elementos extracelulares en la infección son los factores intracelulares, uno de los cuales puede ser la presencia simultánea de otros virus en la misma célula. Las coinfecciones interespecíficas son un fenómeno habitual en la naturaleza, y bajo este tipo de interacciones un virus puede condicionar parámetros tales como el nivel de acumulación, la tasa de transmisión, el tropismo celular o la gama de hospedadores del otro (Elena *et al.*, 2014); esto último favorece que infecciones simultáneas de determinados conjuntos de virus en un hospedador dado sean más frecuentes de lo esperado por azar (Malpica *et al.*, 2006). Así mismo, estas coinfecciones pueden dar lugar a fenómenos que van desde una disminución en la gravedad de los síntomas hasta una exacerbación de los mismos, desembocando incluso en la muerte de la planta en pocos días (Hammond *et al.*, 1999). En este contexto, también pueden tener lugar eventos de recombinación entre

diferentes cepas o especies de virus, dando como resultado importantes cambios en la gama de hospedadores o en la patogenicidad.

Este triángulo de interacciones planta-virus-vector es el producto de un largo proceso coevolutivo, ampliamente dinámico, condicionado fuertemente por la acción de diversos factores ambientales, como la presión parcial de CO<sub>2</sub>, la temperatura o la disponibilidad de agua, entre otros. Se sabe desde hace tiempo que bajo altas concentraciones de CO<sub>2</sub> (alta [CO<sub>2</sub>]), las plantas tienden a incrementar su tamaño debido a un aumento en el tamaño y número de células (Madsen, 1973), generando más biomasa. Estos cambios son el resultado de un incremento en la tasa fotosintética (Amthor, 1995; Prior *et al.*, 2011), y este efecto sobre el crecimiento se ha aprovechado en agricultura a través del cultivo de plantas en ambientes enriquecidos en este gas (Prior *et al.*, 2011). Los niveles de [CO<sub>2</sub>] elevados también producen un incremento en la proporción carbono:nitrógeno de los tejidos, e importantes cambios en el perfil metabólico y hormonal (Teng *et al.*, 2006), ocasionando perturbaciones en la interacción planta-virus-vector habitual (Fu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2016). En el caso de las infecciones por virus, se conoce desde hace tiempo que las altas temperaturas pueden tener un efecto inhibitorio o de reducción de los síntomas, fenómeno conocido como “enmascaramiento por calor” (Johnson, 1922; Hull, 2002). Y las temperaturas elevadas inciden también en el comportamiento y ciclo biológico de muchos insectos vectores, entre ellos los propios pulgones, los cuales presentan cortas generaciones y bajos umbrales térmicos de desarrollo (Harrington *et al.*, 2007).

Desde su descubrimiento, la mayor parte del estudio de virus de plantas se ha realizado bajo el supuesto clásico que los considera por defecto “patógenos” intracelulares obligados. Sin embargo, en los últimos años, y gracias al auge de disciplinas como la Ecología de virus, está emergiendo una nueva visión de los mismos en la que ya no se les considera sólo como meros agentes productores de enfermedad, sino también como elementos promotores, incluso puede que claves, del éxito del hospedador en su interacción con el ambiente. Desde el punto de vista ecológico, los virus pueden considerarse endosimbiontes obligados del hospedador vegetal, entendiendo endosimbiosis como la relación

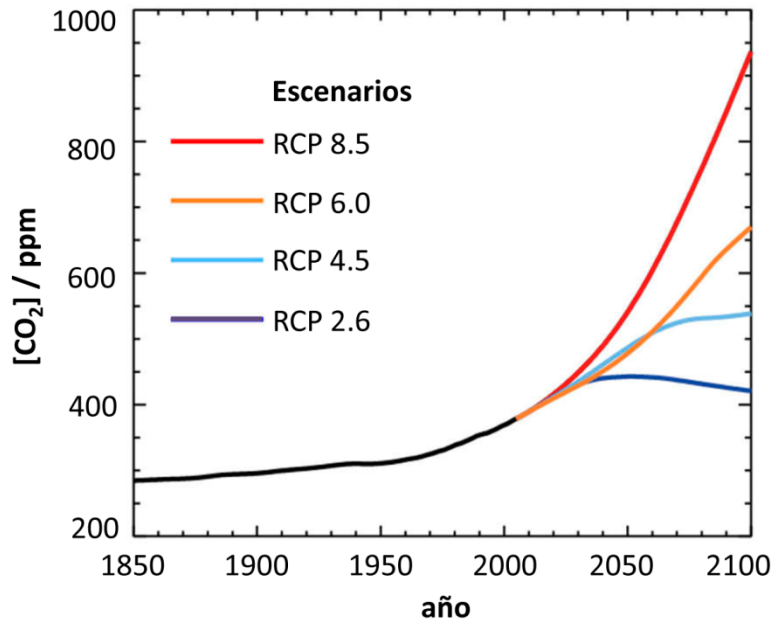
íntima que se establece entre estas dos entidades biológicas, claramente disímiles, en la que una de ellas –el virus- vive en la otra. El resultado de esta relación se encuentra en algún punto dentro de un continuo que va desde una situación de mutualismo, beneficioso por tanto para ambas especies, hasta una situación de parasitismo, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrolle dicha interacción (Roossinck, 2015). Así, se conocen algunos ejemplos en los que las infecciones pueden resultar beneficiosas para el hospedador. TRV (*Tobacco rattle tobravirus*) induce en *Arabidopsis thaliana* la acumulación de poliaminas, entre ellas la putrescina, lo cual redundaría en un incremento de la resistencia a las bajas temperaturas y la congelación (Fernández-Calvino *et al.*, 2014). Este mismo virus, así como CMV (*Cucumber mosaic cucumovirus*), incrementan la tolerancia al estrés por sequía en el hospedador modelo *Nicotiana benthamiana*. CMV también aporta tolerancia a la deshidratación en un hospedador de interés agronómico como es la remolacha, *Beta vulgaris* (Xu *et al.*, 2008).

Desde mediados de la década de los 80, pero sobre todo en la de los 90 y comienzos del siglo XXI se ha documentado un incremento en la temperatura media del planeta, aumento que ha ido parejo a la acumulación en la atmósfera de gases de efecto invernadero, entre ellos el CO<sub>2</sub>. Este calentamiento global, probablemente de origen antropogénico, ha acarreado cambios en el patrón de temperaturas y de lluvias característico de numerosas regiones del planeta (IPCC, 2013). Si se cumplen las previsiones que diversos modelos contemplan para finales de este siglo, la [CO<sub>2</sub>] en la atmósfera podría dispararse desde las 400 ppm actuales hasta las 1000 ppm, y la temperatura media incrementarse hasta 3-4°C (**FIG. 1A y 1B**). Esto podría hacer que en el futuro eventos meteorológicos extremos tales como fuertes olas de calor y sequías prolongadas sean acontecimientos relativamente frecuentes, afectando fundamentalmente a las latitudes medias del planeta (**FIG. 1C**).

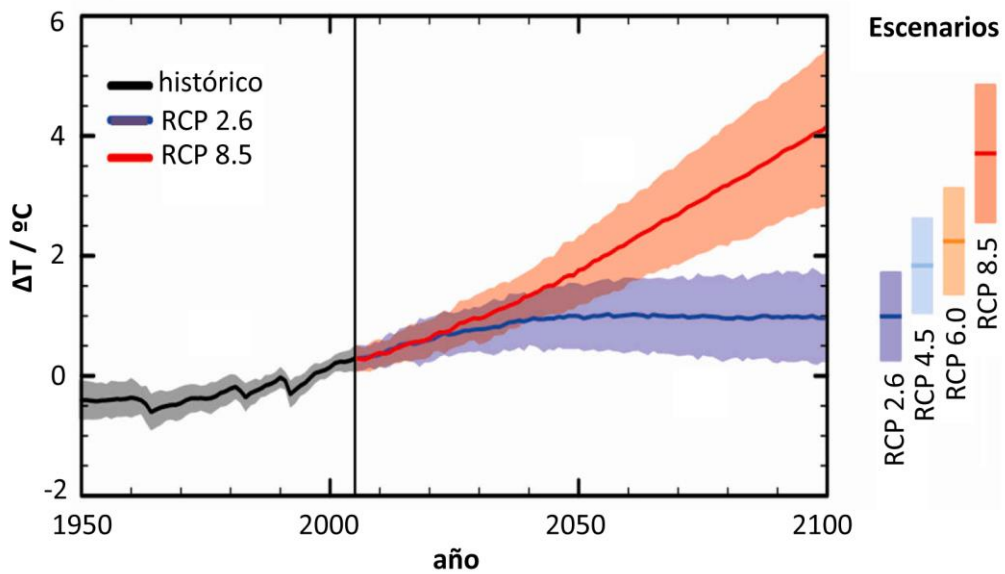
Los profundos cambios en los parámetros ambientales [CO<sub>2</sub>], temperatura y disponibilidad de agua, con toda probabilidad darán lugar a alteraciones en ese triángulo de interacciones planta-virus-vector. En la mayoría de los casos, el efecto de estas alteraciones sobre el resultado de la interacción planta-virus se desconoce. Por todo ello, el estudio de

interacciones planta-virus modelo en escenarios que contemplan variables asociadas al cambio climático adquiere una especial relevancia.

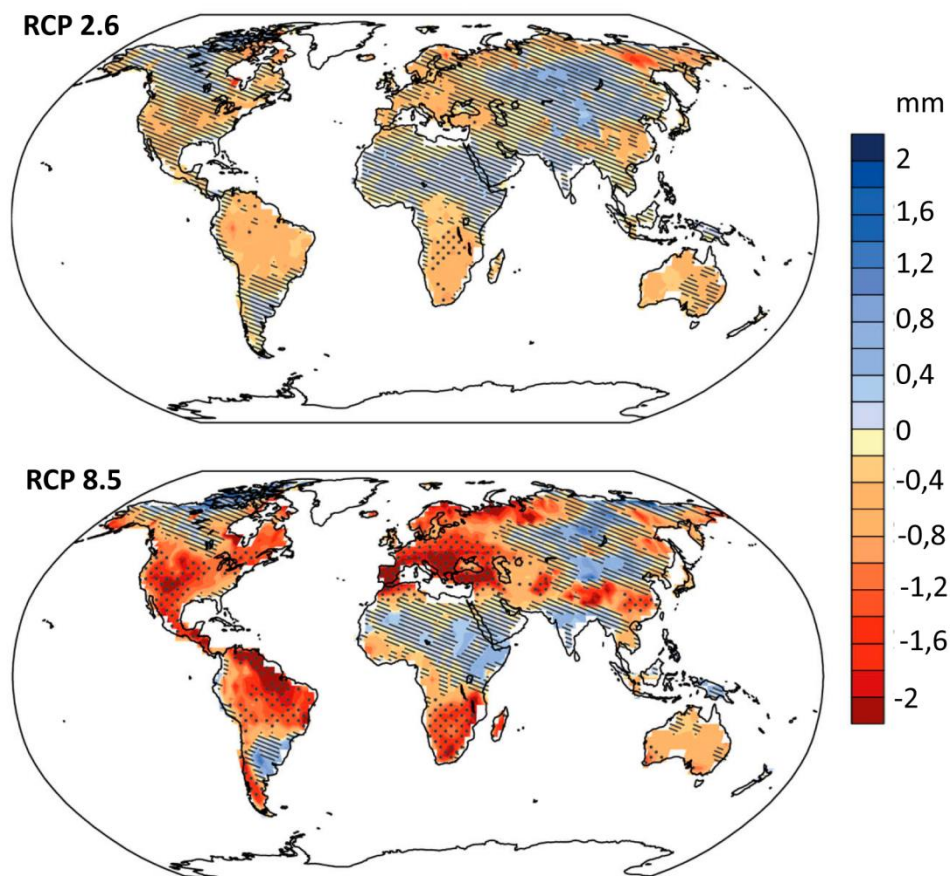
**A**



**B**



C



**FIGURA 1** (comienza en la página anterior). Gráficos recogidos en la última edición del informe realizado por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC), relativos a las predicciones para niveles de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera, incremento de temperatura media global y cambios en la humedad del suelo, en los años 2081-2100. **A.** Predicciones de concentración de  $\text{CO}_2$  alcanzadas en la atmósfera en 2081-2100 ofrecidas por una serie de modelos que contemplan distintos escenarios de emisión de gases de efecto invernadero, e identificados como “RCP”, ordenados de menor a mayor como RCP2.6, RCP4.5, RCP6.0 y RCP8.5. **B.** Predicciones sobre el incremento de temperatura media global para 2081-2100, tomando como referencia ( $\Delta T = 0^\circ\text{C}$ ) los valores promedios para el período 1986-2005, según escenarios de emisión menor (línea morada, RCP2.6) y mayor (línea roja, RCP8.5). El sombreado de las líneas representa la incertidumbre asociada, y para el resto de escenarios las predicciones se muestran en el margen derecho del gráfico, a modo de barras. **C.** Predicciones sobre el cambio en la humedad media anual de los 10 centímetros más superficiales del suelo, para el año 2081-2100, considerando como referencia el promedio registrado en el período 1986-2005, medido en milímetros (mm) de agua, y según escenarios de emisión menor (RCP2.6) y mayor (RCP8.5). Con:  $[\text{CO}_2]$ , concentración de  $\text{CO}_2$ ; ppm, partes por millón;  $\Delta T$ ,

incremento de temperatura; °C, grados centígrados; mm, milímetros; RCP, de *Representative Concentration Pathways*, escenarios hipotéticos de emisión de gases de efecto invernadero contemplados por el IPCC para la realización de predicciones, con RCP2.6 como escenario con mitigación de emisiones, RCP4.5 y 6.0 como escenarios de estabilización de las emisiones, y RCP8.5 como escenario de incremento de emisiones. *Adaptado de IPCC, 2013*

## 1.2. LA INTERACCIÓN PLANTA-VIRUS

Una planta presenta inmunidad a un virus cuando ofrece resistencia completa a su infección, lo cual se manifiesta generalmente mediante la ausencia de replicación viral. Cuando esta resistencia la presentan todas las variedades de una especie vegetal frente a todas las variantes genéticas del virus, recibe el nombre de resistencia de tipo “no-huésped” (de *non-host resistance*), y la especie vegetal pasa a calificarse como no-huésped. Este tipo de resistencia es la más común y persistente y, en general, es la que muestra cada planta hacia la mayoría de sus patógenos potenciales (Heath, 2000; Palukaitis y Carr, 2008). En algunos casos, esta resistencia puede ser debida a la ausencia de compatibilidad con algunos factores celulares que son vitales para que el virus complete su ciclo de infección (Nieto *et al.*, 2011; Calvo *et al.*, 2014). Sin embargo, en otros casos, parece que esta resistencia no es sólo pasiva, y deriva de la puesta en marcha de una serie de mecanismos defensivos por parte de la planta no-huésped (Fujisaki *et al.*, 2009; Ishibashi *et al.*, 2009). En el otro extremo se encuentra la resistencia de tipo “huésped” (de *host resistance*): se habla de este tipo de resistencia cuando genotipos particulares de planta, dentro de, por lo demás, una especie susceptible, desarrollan respuestas defensivas frente a un genotipo de virus específico (Heath, 2000).

Las plantas carecen de células especializadas en defensa, de modo que la protección frente a los patógenos, que incluye reconocimiento y activación de la respuesta defensiva, ha de llevarse a cabo en cada célula. Esta defensa se estructura en dos niveles, y está mediada por una serie de proteínas receptoras. En un primer nivel, algunos de estos receptores, generalmente superficiales, reconocen patógenos potenciales de forma inespecífica a través de patrones moleculares conservados, y activan un conjunto de respuestas que constituyen la denominada PTI (de *Pattern-*

*triggered immunity*). Frente a virus, la defensa reside fundamentalmente en la activación de las rutas de silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs, los cuales se originan a partir de RNAs bicatenarios de origen vírico. Cuando el patógeno supera este primer conjunto de respuestas defensivas, pueden entrar en juego otros mecanismos basados en un reconocimiento específico de la variedad o cepa del patógeno en cuestión, generalmente a través de receptores intracelulares que reconocen proteínas efectoras liberadas durante la infección; este segundo conjunto de respuestas defensivas constituyen la denominada ETI (de *Effector-triggered immunity*) (Jones y Dangl, 2006).

### 1.2.1. PTI (*pattern-triggered immunity*)

La célula vegetal se encuentra protegida del medio externo por una gruesa pared celular, en cuya superficie externa se deposita una capa de estructura compleja y naturaleza lipídica, denominada cutícula (Fernández *et al.*, 2016). La continuidad de esta barrera garantiza la protección frente a la desecación, pero también frente a las infecciones por hongos, bacterias y virus; estos últimos, como se mencionó, penetran en la célula de forma pasiva, tras producirse heridas que interrumpen la continuidad de esta capa. Además de su papel como barreras físicas, la cutícula y la pared celular participan activamente en defensa, pues la degradación que experimentan, en la mayoría de las ocasiones asociada a la actividad invasiva del patógeno, libera constituyentes estructurales (endógenos o modificados) que actúan a modo de moléculas señalizadoras, y que reciben el nombre de DAMPs (de *Damage-associated molecular patterns*) (Hématy *et al.*, 2009).

Uno de los mecanismos de defensa en plantas, que se encuentra conservado evolutivamente con el Reino Animal, lo constituye la presencia de una serie de receptores capaces de reconocer estructuras moleculares comunes de elementos constituyentes de muchos patógenos. Entre estos compuestos se encuentran, por ejemplo, componentes de la pared celular (quitina, mureína, lipopolisacáridos), o de flagelos (flagelina), liberados durante el proceso de infección. Estos patrones moleculares reciben el nombre de PAMPs (de *Pathogen-associated molecular*

*patterns*), y las proteínas receptoras de membrana que los reconocen reciben colectivamente el nombre de PRRs (de *Pattern recognition receptors*). Las DAMPs también pueden reconocerse a través de este tipo de receptores, y se cree que actúan a modo de amplificadores de la respuesta defensiva.

Tras la activación de las rutas de señalización por PAMPs y DAMPs, se inducen de forma rápida, en cuestión de minutos, una serie de respuestas defensivas que implican la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en lo que se conoce como estallido oxidativo (de “*oxidative burst*”), y la acumulación de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) (Zvereva y Pooggin, 2012). ROS y  $\cdot\text{NO}$  actúan como compuestos antimicrobianos y producen un aumento en el número de entrecruzamientos covalentes que unen los distintos polímeros constituyentes de la pared celular; este entrecruzamiento junto con la acumulación de calosa incrementan la resistencia de la pared, lo que puede evitar la propagación del patógeno (Newman *et al.*, 2013). Además,  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS y  $\cdot\text{NO}$  actúan en sí mismos como factores de señalización que activan muchas otras rutas defensivas. Varias proteínas reguladoras como las CaMs (calmodulinas) o proteínas kinasas, como las CDKs (de *Calcium-dependent kinases*) y MAPKs (de *Mitogen-activated protein kinases*), se activan ante estos flujos iónicos y cambios en el estado redox de la célula, lo cual finalmente induce modificaciones importantes en el estado de fosforilización de diversas proteínas celulares y subsiguientes cambios en la expresión génica (Bigeard *et al.*, 2015). Las ROS resultan fundamentales, puesto que solapan con otras rutas de señalización que implican a fitohormonas clave en defensa, entre las que se encuentran el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA), cuya señalización también se activa (Torres, 2010). Los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  que se activan ante el reconocimiento de DAMPs y PAMPs también inducen la acumulación de SA (Seyfferth y Tsuda, 2014). La activación de estas rutas de señalización implica la expresión de genes que codifican, entre otras, proteínas defensivas denominadas PR (de *Pathogenesis-related*), y enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos antimicrobianos, denominados genéricamente fitoalexinas (Spoel y Dong, 2012; Li *et al.*, 2015). La expresión de las PRs se induce no solo bajo la acción de un

patógeno, sino también en presencia de diversas señales inmunes, como por ejemplo ante la acumulación de SA en ausencia de infección. PR-1, cuya actividad aún se desconoce, se induce específicamente en presencia de esta fitohormona, y se utiliza tradicionalmente como marcador de la activación de la señalización por SA (Takahashi *et al.*, 2004).

El conjunto de respuestas defensivas inducidas por las DAMPs y las PAMPs es lo que se denomina PTI (de *Pattern-triggered immunity*, o inmunidad inducida por patrones moleculares). La PTI no suele desembocar en la muerte celular, aunque algunos de los componentes implicados en ambos procesos son comunes, existiendo casos en los que PTI efectivamente induce muerte (Petutschnig *et al.*, 2014).

La interacción planta-virus puede activar, generalmente, el conjunto de respuestas asociadas a la PTI (ROS, flujos iónicos, expresión de PRs, etc.) a través de DAMPs endógenos, o a través de la alteración en los balances hormonales y del estrés oxidativo que se producen durante la infección (Zvereva y Pooggin, 2012; Calil y Fontes, 2016). Un PAMP característico de virus de plantas, y que podría desempeñar un papel relevante en la activación de la PTI, es el RNA de doble cadena (dsRNA, de *double-stranded RNA*). La presencia de este dsRNA en la planta infectada se asocia, generalmente, a la replicación viral (Ding y Voinnet, 2007) y al elevado grado de estructuras secundarias presentes en los RNAs derivados de virus (Molnár *et al.*, 2005; Donaire *et al.*, 2009). Recientemente, en *A. thaliana*, se ha caracterizado la inducción de respuestas defensivas dependientes de dsRNA, en las que interviene SERK1 (de *Somatic embryogenesis receptor-like kinase 1*); SERK1 es un correceptor asociado habitualmente a receptores de tipo PRR, lo que une eventos de señalización de membrana característicos de la PTI con la defensa inducida por dsRNA. Esta respuesta, además, es independiente de la ruta de silenciamiento génico (Niehl *et al.*, 2016). Otro receptor de tipo PRR, denominado NIK1 (de *Nuclear shuttle protein [NSP]-interacting kinase 1*), se encuentra implicado en la defensa frente a virus de DNA a través de mecanismos de supresión traduccional (Zorzatto *et al.*, 2015; Calil y Fontes, 2016).

### 1.2.2. Silenciamiento génico y defensa antiviral

Las plantas han desarrollado un sofisticado sistema de reconocimiento y restricción de la replicación viral, con especificidad de secuencia, basado en el silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs bicatenarios (sRNA). Este silenciamiento puede actuar a nivel post-transcripcional (PTGS, de *post-transcriptional gene silencing*), afectando a los niveles de traducción o a la estabilidad de un RNA, o a nivel transcripcional (TGS, de *transcriptional gene silencing*), reduciendo los niveles de expresión de un gen (Pumplin y Voinnet, 2013). En plantas, el silenciamiento es un proceso celular no autónomo, ya que aunque se inicie en unas pocas células, acaba propagándose al resto de tejidos donde también se silencian las secuencias homólogas. Esto es debido a la transmisión de sRNAs a través de plasmodesmos (movimiento a corta distancia) y a través de haces vasculares (movimiento a larga distancia), que actúan así como señales de silenciamiento (Molnar *et al.*, 2010; Mermigka *et al.*, 2016).

De entre la amplia familia de sRNAs, los siRNAs derivados de virus, o vsiRNAs (de *virus-derived small interfering RNAs*), son los elementos centrales de la ruta de silenciamiento génico en la defensa antiviral (Hamilton, 1999). Se obtienen a través del procesamiento de dsRNA asociado a virus, con complementariedad perfecta, y presentan tamaños comprendidos entre los 21-24 nucleótidos (nt) (Vaucheret y Fagard, 2001; Ding y Voinnet, 2007).

El silenciamiento génico consta de tres fases (Csorba *et al.*, 2015). La primera fase, o *iniciación*, comienza con la acumulación de dsRNA en la célula infectada, y consiste en la generación de vsiRNAs primarios a través del procesamiento de dicho dsRNA por enzimas DCLs (de *Dicer-like proteins*) (Bernstein *et al.*, 2001; Donaire *et al.*, 2008). En la segunda fase, o *fase efectora*, los vsiRNAs generados se unen a proteínas de la familia ARGONAUTA (AGO) y, junto a otras proteínas accesorias, forman complejos RITS (de *RNA-induced transcriptional silencing*) o complejos RISC (de *RNA-induced silencing complex*). Una vez en el complejo, el vsiRNA pierde una de las hebras (la hebra “pasajera”), y dirige a los complejos RITS/RISC hacia RNAs diana total o

parcialmente complementarios, donde estos ejercen su acción. RITS es el complejo efector del TGS, y RISC el complejo efector del PTGS. Una vez movilizado, RISC corta o bloquea la traducción del mRNA diana; RITS silencia al gen homólogo a través de la maquinaria de metilación y/o de modificación de histonas (Voinnet, 2008; Verdel *et al.*, 2009). La tercera fase, o *amplificación*, consiste en la generación de dsRNA a partir de ssRNA vírico, bajo la acción de diversas RNA polimerasas dependientes de RNA (RDR) celulares (en contraposición con las RdRp, víricas); este segundo paso origina por tanto más sustrato para las DCLs, que de esta manera originan vsiRNAs secundarios, complementarios a secuencias víricas adicionales distintas a las que reconocían los vsiRNAs primarios. Estos vsiRNAs secundarios se consideran fundamentales para llevar a cabo el silenciamiento génico a nivel sistémico, extendiéndose así por toda la planta (Llave, 2010; Csorba *et al.*, 2015). En total, en *A. thaliana* se han descrito cuatro DCLs, 10 AGOs y hasta seis RDRs (Brodersen y Voinnet, 2006).

Entre las DCLs, DCL4 es la más relevante en defensa antiviral, actuando a modo de sensor de la infección; es la mayor productora de vsiRNAs de 21 nt, el tamaño más habitual en tejido infectado. DCL3 genera vsiRNAs de 24 nt poco relevantes en la defensa frente virus de RNA, pero fundamentales frente a virus de DNA (Alvarado y Scholthof, 2009; Llave, 2010; Fukudome y Fukuhara, 2016).

AGO1 y AGO2 unen vsiRNAs de 21-22 nt, y comparten función en la defensa frente a virus a través de mecanismos de PTGS (Alvarado y Scholthof, 2012; Ma *et al.*, 2015). AGO2 es la principal responsable de la resistencia de *A. thaliana* frente al potexvirus PVX (de *Potato virus X*) (Jaubert *et al.*, 2011), o de *N. benthamiana* frente al tombusvirus TBSV (de *Tomato bushy stunt tombusvirus*) (Scholthof *et al.*, 2011). AGO4 une preferentemente vsiRNAs de 24 nt, y es responsable de los mecanismos de TGS frente a virus de DNA (Raja *et al.*, 2008), y de represión traduccional en virus de RNA (Bhattacharjee *et al.*, 2009; Hamera *et al.*, 2012; Brosseau *et al.*, 2016). Otras AGOs, como AGO5 y 7, también se han relacionado con la defensa frente a virus de RNA (Mi *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2008; Mallory y Vaucheret, 2010; Brosseau y Moffett, 2015).

En la defensa antiviral, RDR6 y RDR1 intervienen de forma destacada (García-Ruiz *et al.*, 2010). Son las principales polimerasas encargadas de generar el dsRNA sustrato de DCL4, a partir del cual se generan vsiRNAs secundarios. RDR1, en *N. tabacum* y en *A. thaliana*, es inducible por SA, lo que supone la existencia de una conexión entre ambos mecanismos defensivos (Xie *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003).

En la ruta de silenciamiento génico intervienen otras proteínas accesorias, como HEN1 (de *HUA enhancer 1*) y SGS3 (de *Suppressor of gene silencing 3*). HEN1 añade grupos metilo a los extremos 3' de los vsiRNAs generados por las DCLs, estabilizándolos (Yang *et al.*, 2006; Vogler *et al.*, 2007). SGS3, junto con otros cofactores, une y estabiliza el RNA sustrato sobre el que ha de actuar RDR6 (Mourrain *et al.*, 2000; Kumakura *et al.*, 2009).

Los miRNAs (o miR, de *microRNA*), otro grupo de sRNAs, presentan tamaños de 20-24 nt y complementariedad imperfecta; están codificados en el genoma de la planta y sus precursores son largos RNAs monocatenarios, con segmentos complementarios intramoleculares (estructuras en tallo-horquilla imperfectas). Los miRNAs tienen como diana otros mRNAs que regulan procesos endógenos tales como desarrollo, crecimiento y fisiología de la planta. Son importantes en la tolerancia a estreses abióticos y bióticos, ya que regulan la expresión de componentes clave de rutas hormonales, de proteínas receptoras con funciones defensivas y de componentes de la ruta de silenciamiento (Rogers y Chen, 2013; Bologna y Voinnet, 2014; Ramesh *et al.*, 2014). Respecto a esto último, un ejemplo ilustrativo es el silenciamiento de un elemento clave de la ruta de silenciamiento como es AGO1 a través del miR168 (Várallyay *et al.*, 2010).

Los virus activan la ruta de silenciamiento de forma robusta y con efectos sistémicos, lo que ha permitido utilizarlos como herramienta en estudios de genética reversa para silenciar de forma rápida y efectiva genes endógenos de la planta, técnica conocida como VIGS (de *Virus-induced gene silencing*). Para ello, se inserta en el genoma del virus una secuencia del gen endógeno que se desea analizar. En la infección con estos virus quiméricos se generan siRNAs correspondientes tanto al

genoma del virus como al gen endógeno, silenciándose ambos. Como vectores VIGS, se han utilizado frecuentemente a los virus TRV (de *Tobacco rattle tobravirus*, en esta misma tesis) y PVX, en el hospedador *N. benthamiana* (Liu *et al.*, 2002a; Lacomme y Chapman, 2005).

El silenciamiento génico no es el único mecanismo defensivo que podría actuar sobre el RNA de origen vírico, ya que el proteasoma 20S tiene actividad endonucleasa, aparte de la actividad proteolítica habitual. Así, la subunidad  $\alpha_5$  de *A. thaliana* muestra actividad RNasa, y es capaz de degradar *in vitro* RNAs de naturaleza vírica (Dielen *et al.*, 2011). En cambio, la degradación proteolítica a través de la ruta ubiquitina-proteasoma no parece ejercer efectos tan claros, ya que se han encontrado ejemplos tanto beneficiosos como perjudiciales para la replicación viral (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012). En algunos casos, esta ruta podría reducir el estrés que se induce en el retículo endoplasmático (ER, de *endoplasmatic reticulum*) por la acumulación de proteína mal plegada durante la infección (Ye *et al.*, 2011). También podría optimizar la replicación viral al mantener la proporción adecuada entre los diversos componentes del virus, modulando la acumulación de determinadas proteínas (Alcaide-Loridan y Jupin, 2012). En otros casos, la ruta ubiquitina-proteasoma se ha relacionado directamente con la degradación de ciertas proteínas víricas y la defensa (Reichel y Beachy, 2000; Camborde *et al.*, 2010).

### 1.2.3. Contra-defensa viral. Supresión del silenciamiento

Frente a los mecanismos defensivos de la planta, los virus han desarrollado diversas estrategias para minimizar sus efectos. En algunos grupos, la replicación tiene lugar asociada a sistemas membranosos que aíslan al virus del entorno celular, lo que seguramente dificulte el acceso de la maquinaria de silenciamiento a los ácidos nucleicos (Schwartz *et al.*, 2002). Aunque esta estrategia no se ha estudiado en detalle, sí existen ejemplos en los que su contribución podría ser relevante. Así, en *A. thaliana*, la sobreexpresión de la mayoría de las AGOs reduce la acumulación de PVX $\Delta$ TGB, la forma de PVX delecionada en el conjunto de genes TGB (de *Triple gene block*); en cambio, sólo AGO2 y

AGO5 reducen los niveles de PVX. TGB codifica el conjunto de proteínas encargadas de remodelar el sistema de endomembranas celular, aislando al complejo de replicación, y seguramente impidiendo el acceso de la mayor parte de las AGOs al RNA viral (Tilsner *et al.*, 2012; Brosseau y Moffett, 2015). Además, la mayor parte de los virus codifican una o más proteínas cuya misión es interferir con la ruta de silenciamiento, e incluso subvertirla en su propio beneficio; a estas proteínas clave se las denomina supresores del silenciamiento por RNA, o VSRs (de *viral suppressors of RNA silencing*). Así, para la mayoría de los virus, el éxito en el ciclo de infección depende de estos VSRs. Existe una amplia diversidad de esta clase de proteínas, y pueden actuar prácticamente sobre cualquier nivel de la ruta de silenciamiento, o sobre más de uno a la vez. Esta acción la pueden ejercer de forma directa sobre componentes de la ruta, por ejemplo mediante el secuestro de vsRNAs o el bloqueo de la actividad de alguna proteína, o de forma indirecta, regulando el metabolismo de componentes clave, por ejemplo promoviendo su degradación a través de la ruta ubiquitina-proteasoma o modulando su expresión a través de la acción sobre miRNAs reguladores (Alvarado y Scholthof, 2009; Csorba *et al.*, 2015).

Para analizar la actividad supresora de una proteína dada se suelen realizar ensayos de coexpresión en hojas, infiltrando a modo de parches (en inglés, *patch assay*) cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* que expresan transitoriamente la proteína VSR junto a una proteína reportera, por ejemplo la GFP. La sobreexpresión de un gen exógeno (GFP) en la planta pone en marcha los mecanismos de silenciamiento génico descritos. En consecuencia, la expresión simultánea de una proteína VSR junto con la proteína GFP mantendrá la acumulación de esta última (Valli *et al.*, 2006; Tena Fernández *et al.*, 2013).

Algunos de los VSRs más estudiados, e incluidos en este trabajo de tesis, se describen a continuación.

-P25 (o TGB1, de *Triple gene block protein 1*). Es el VSR presente en potexvirus, proteína de ca. 25 kDa. En ensayos de coexpresión en parche con GFP, la intensidad de su actividad supresora del silenciamiento varía de forma considerable entre distintos potexvirus, siendo la de PVX

(PVX P25) la más débil (Senshu *et al.*, 2009). PVX P25 actúa en la fase efectora del silenciamiento, a nivel de AGO. Interactúa físicamente con AGO1,2,3 y 4, y no con AGO5 y 9, e induce la degradación de AGO1 dependiente de proteasoma (Chiu *et al.*, 2010). En otro trabajo reciente, AGO7 también reduce su acumulación cuando se expresa en presencia de PVX P25 (Brosseau y Moffett, 2015). Para otra P25, en este caso la correspondiente a PLAMV (de *Plantago asiatica mosaic potexvirus*), se ha demostrado su intervención en la fase de amplificación, a nivel de RDR; en concreto, PLAMV P25 secuestra a RDR6 y SGS3 en inclusiones citoplasmáticas, anulando sus actividades (Okano *et al.*, 2014).

-HC (de HCPPro, *Helper component proteinase*). Es el VSR presente en potyvirus, proteína de ca. 50 kDa. Los mecanismos a través de los cuales ejerce su actividad supresora todavía no se han determinado con exactitud. En experimentos *in vitro*, se demostró que HC es capaz de unir largos dsRNA sintéticos (Maia y Bernardi, 1996; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2000), así como pequeños dsRNAs (Méraï *et al.*, 2006; Shibolet *et al.*, 2007), pero en los casos analizados lo hace en una proporción molar proteína:RNA muy superior a la de otros VSRs (Tena Fernández *et al.*, 2013). Estudios recientes en *A. thaliana* muestran como el HC de TuMV (de *Turnip mosaic potyvirus*) es capaz de unir *in vivo* vsRNAs de 21-22 nt, evitando así su incorporación en las proteínas AGO (García-Ruiz *et al.*, 2015). Además, se ha descrito la acción de HC a otros niveles. TuMV HC interfiere también con la biogénesis y la acción de miRNAs, aunque no se ha demostrado su interacción directa con ellos (Chapman *et al.*, 2004). HC también actúa a nivel de HEN1, evitando la metilación de los vsRNAs por parte de esta proteína, como se ha caracterizado para el HC de ZYMV (de *Zucchini yellow mosaic potyvirus*) (Jamous *et al.*, 2011).

-P19. Es el VSR presente en tombusvirus, proteína de ca. 19 kDa. P19 desempeña su actividad supresora actuando a nivel de la fase efectora. Para ello, forma dímeros que se organizan en una estructura a modo de “pinza” molecular, uniendo específicamente sRNAs de 21 nt por sus extremos, y evitando así su incorporación a las proteínas AGO (Scholthof, 2006; Danielson y Pezacki, 2013). Además, P19 actúa sobre la regulación por microRNAs: la expresión de P19 incrementa los niveles de miR168, reduciendo por tanto la acumulación de AGO1 (Várallyay

*et al.*, 2010). De este modo, la supresión que ejerce este factor viral parece desarrollarse a través de dos frentes, uno impidiendo la unión de los vsiRNAs a AGO1, y el otro reduciendo los niveles de esta proteína, siendo ambas actividades independientes y necesarias para sortear de forma efectiva el silenciamiento (Várallyay *et al.*, 2014).

-2b. Es el VSR presente en cucumovirus, proteína de ca. 16 kDa. 2b inhibe la actividad de corte de complejos efectores AGO1-RISC reconstituidos *in vitro* (Zhang *et al.*, 2006), para lo que se requiere la interacción física 2b-AGO (Duan *et al.*, 2012). Aparte de este posible mecanismo de acción, 2b también es capaz de unir pequeños y largos dsRNAs, tanto *in vitro* como *in vivo* (González *et al.*, 2010, 2012; Duan *et al.*, 2012). Además, su capacidad para unir dsRNA sintéticos *in vitro* desaparece en aquellos mutantes sin actividad supresora, sugiriendo que la unión a vsiRNAs puede ser el mecanismo más relevante por el que 2b ejerce la supresión del silenciamiento (González *et al.*, 2010, 2012).

#### **1.2.4. ETI (*Effector-triggered immunity*)**

Con el objetivo de contrarrestar los efectos de las respuestas defensivas iniciadas en la PTI, y de este modo establecerse en hospedadores susceptibles, muchos patógenos liberan en la célula una serie de proteínas efectoras. Estas proteínas pueden interferir en la puesta en marcha de la PTI a distintos niveles, como por ejemplo induciendo la degradación o la inactivación de componentes clave de rutas de señalización, como receptores PRRs o MAPKs (Spoel y Dong, 2012). En el proceso coevolutivo planta-patógeno, a su vez, las plantas han desarrollado una serie de receptores inmunes intracelulares, denominados factores de resistencia (producto de genes *R*), capaces de reconocer a alguna proteína asociada a un genotipo particular del patógeno en cuestión, denominada en este contexto factor de avirulencia (producto de genes *Avr*). Este reconocimiento *Avr-R* desencadena un conjunto de respuestas defensivas denominadas ETI (de *Effector-triggered immunity*), puesto que la mayor parte de las proteínas que actúan a modo de *Avr* son precisamente proteínas efectoras (Moffett, 2009; Spoel y Dong, 2012). Estos factores *R* son proteínas altamente variables, tanto

entre especies como dentro de las mismas, y esta variabilidad se manifiesta igualmente como diferencias en la resistencia o en la susceptibilidad al patógeno (Moffett, 2009). Cuando existe este reconocimiento Avr-R la interacción planta-patógeno se denomina incompatible, dando lugar, la mayoría de las veces, a la restricción del patógeno en el sitio de infección. Cuando este reconocimiento no existe, el patógeno puede establecerse de forma local o sistémica, dando lugar a interacciones compatibles y, en numerosas ocasiones, a la aparición de síntomas asociados a la enfermedad (Hammond-Kosack y Jones, 1997; Takács *et al.*, 2014).

El conjunto de respuestas de la ETI suele considerarse una versión amplificada y más rápida de la PTI (Jones y Dangl, 2006; Zvereva y Pooggin, 2012). En cambio, la ETI, a diferencia de la PTI, a menudo finaliza con la inducción de muerte celular programada (PCD, de *Programmed cell death*), limitada al tejido infectado, en una primera fase, y a las células inmediatamente adyacentes, en una segunda; esta respuesta de muerte recibe el nombre de respuesta hipersensible (HR, de *Hypersensitive response*) (Wright *et al.*, 2000). La HR podría evitar así la proliferación de patógenos biotrofos, entre los que se podrían incluir a los virus (Hammond-Kosack y Jones, 1996). Sin embargo, el papel de la HR se discute aún hoy día, pues existen múltiples ejemplos en los que la HR permite contener al patógeno en el lugar de infección, en otros casos no es eficaz, y en algunos otros la restricción del patógeno puede tener lugar en ausencia de PCD (Greenberg y Yao, 2004; Mur *et al.*, 2008; Künstler *et al.*, 2016).

La interacción Avr-R desencadena la activación de flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la subsiguiente acumulación de ROS,  $\cdot\text{NO}$  y SA. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula conduce a una alcalinización del apoplasto, lo que podría activar a enzimas generadoras de ROS tales como NADPH oxidasas. Las ROS que liberan estas NADPHs se localizan fundamentalmente en el apoplasto (Torres *et al.*, 2006; Mur *et al.*, 2008). En el interior de la célula, cloroplastos y mitocondrias podrían ser fuentes relevantes generadoras de ROS. En la mitocondria, la elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y la acumulación de SA, serían responsables de una despolarización de la membrana mitocondrial y de la interrupción de la

cadena transportadora de electrones, respectivamente, conduciendo a un incremento en la producción de ROS. Esta despolarización podría ser responsable, también, de la formación de poros transitorios que condujeran a la liberación del citocromo C, evento que en animales es señal inequívoca de activación de rutas de muerte celular (Mur *et al.*, 2008).

La acumulación elevada de ROS es uno de los rasgos característicos de la HR. En las interacciones planta-patógeno incompatibles se observa una acumulación bifásica de ROS, con una primera fase, rápida pero transitoria, de baja acumulación de estas especies oxidantes, seguida de una segunda fase mucho más amplia en cuanto a duración y acumulación, y que ha sido relacionada con la defensa. Las interacciones compatibles activan la producción de ROS, pero sólo de una forma equivalente a la de esta primera fase transitoria y de baja amplitud; diversos estudios sugieren que la fase transitoria y de baja amplitud podría estar relacionada con la activación de la señalización celular, con ROS actuando como mensajeros (Torres *et al.*, 2006). La acumulación de ROS y  $\cdot\text{NO}$  sería responsable también de una fuerte oxidación de lípidos en la célula, lo cual se ha asociado con la disrupción de la membrana celular (Mur *et al.*, 2008); el incrementando de la permeabilidad de la membrana debido a ROS, entre otros factores, se asocia a la liberación de electrolitos (Goodman, 1968; Mur *et al.*, 2006).

SA y ROS solapan sus respectivas rutas de señalización, y se ha propuesto su acción sinérgica sobre la HR. Sin embargo, también se ha observado su interacción antagónica sobre la HR, dependiendo de parámetros tales como tiempo, concentración y ubicación celular (Torres *et al.*, 2006; Herrera-Vásquez *et al.*, 2015). Un tercer componente, el JA, también debe contemplarse, pues dependiendo de las concentraciones relativas JA-SA se observa antagonismo o sinergismo, siendo la interacción sinérgica entre ambos la que conduce a incrementos de ROS y muerte celular (Mur *et al.*, 2006). En la interacción Avr-R, el estallido oxidativo precede a la acumulación de SA, y se correlaciona con la expresión de la isocorismato sintasa, enzima clave de la ruta de biosíntesis del SA (Herrera-Vásquez *et al.*, 2015). A su vez, en función del contexto, el SA puede actuar como prooxidante, promoviendo la

generación de ROS, o como antioxidante, induciendo la biosíntesis de compuestos reductores y enzimas desactivadoras de compuestos reactivos (Mur *et al.*, 2008; Herrera-Vásquez *et al.*, 2015).

No se conocen con claridad las rutas de señalización de HR que conducen a la muerte de la célula vegetal. Sin embargo, sí se han podido definir dos tipos principales de PCD atendiendo a criterios bioquímicos y morfológicos. Estas dos formas de PCD son la necrosis y la muerte vacuolar (van Doorn *et al.*, 2011). La apoptosis, un tipo de PCD claramente definido y caracterizado en animales, no se ha observado como tal en plantas, pese a que en algunos casos la muerte celular en ambos tipos de organismos comparte rasgos, como son la condensación-segmentación del DNA nuclear y la activación de enzimas con actividad tipo caspasa. La necrosis suele ir acompañada de un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, producción de ROS, disminución en la producción de ATP y ruptura temprana de la membrana celular, liberando el contenido del protoplasto (Mur *et al.*, 2008; van Doorn *et al.*, 2011). La muerte vacuolar, por otra parte, se caracteriza por incluir eventos de micro y macroautofagia, el mantenimiento de la integridad de la membrana celular hasta los momentos finales y la presencia de actividad enzimática tipo caspasa, ligada a la ruptura del tonoplasto (van Doorn *et al.*, 2011; Hatsugai *et al.*, 2015). Aunque la PCD de la mayor parte de las HRs puede adscribirse a la necrosis, en muchos otros casos presenta también características propias de la muerte vacuolar. Así, parece segura la participación de rutas de autofagia y de actividad enzimática caspasa en numerosos casos de PCD asociada a la HR (van Doorn *et al.*, 2011; Hatsugai *et al.*, 2015).

Un ejemplo de la participación de proteínas con actividad caspasa en el desarrollo de la HR se da en la interacción incompatible entre TMV y plantas de tabaco con el gen de resistencia *N*; la muerte celular inducida por TMV (de *Tobacco mosaic tobamovirus*) en este hospedador va precedida de la desintegración del tonoplasto, hasta finalizar con el colapso completo de la vacuola. Sin embargo, cuando se silencia VPE (de *Vacuolar processing enzyme*), una cisteín proteasa con actividad tipo caspasa-1, no se observa colapso vacuolar ni rastro de marcadores de PCD (Hatsugai *et al.*, 2004). VPE se localizada en la vacuola y se sintetiza

como precursor inactivo. Tras su activación, interviene en la maduración de muchas otras proteínas vacuolares, y se considera responsable de la ruptura del tonoplasto, dando lugar así al inicio de cascadas proteolíticas que culminan con la PCD de la HR. VPE también se ha relacionado con la PCD asociada a otros procesos, tales como estrés en el ER, desarrollo y respuesta a estreses abióticos (Carvalho *et al.*, 2014; Hatsugai *et al.*, 2015).

La HR, inducida de forma local, genera una serie de señales que se transportan sistémicamente, induciendo la activación de respuestas defensivas en tejidos de la planta que no han sufrido una exposición previa al patógeno. Esta defensa sistémica recibe el nombre de SAR (de *Systemic acquired resistance*) (Spoel y Dong, 2012; Fu y Dong, 2013).

### **1.2.5. Proteínas R. Hipótesis “del guardián”**

La mayor parte de los genes R aislados y caracterizados codifican proteínas citoplasmáticas receptoras, las cuales presentan, al menos, dos dominios característicos: un dominio de unión a nucleótidos (NB, de *nucleotide binding domain*), y un dominio de tipo LRR (de *Leucine-rich repeat*), altamente polimórfico e implicado en el reconocimiento del factor Avr. Debido a ello, estos receptores se denominan habitualmente NLRs (de *NB and LRR containing proteins*) (Moffett, 2009, 2016; Shirasu, 2009; Spoel y Dong, 2012). En el citosol, y en ausencia de ligando, estos NLRs se encuentran inactivos y plegados a través de interacciones intramoleculares, cuya estabilidad depende de su asociación a complejos de proteínas accesorias con actividad chaperona. Entre estas chaperonas se encuentran HSP90 (de *Heat shock protein 90*), SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) y RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*) (Azevedo *et al.*, 2002; Shirasu, 2009; Meldau *et al.*, 2011).

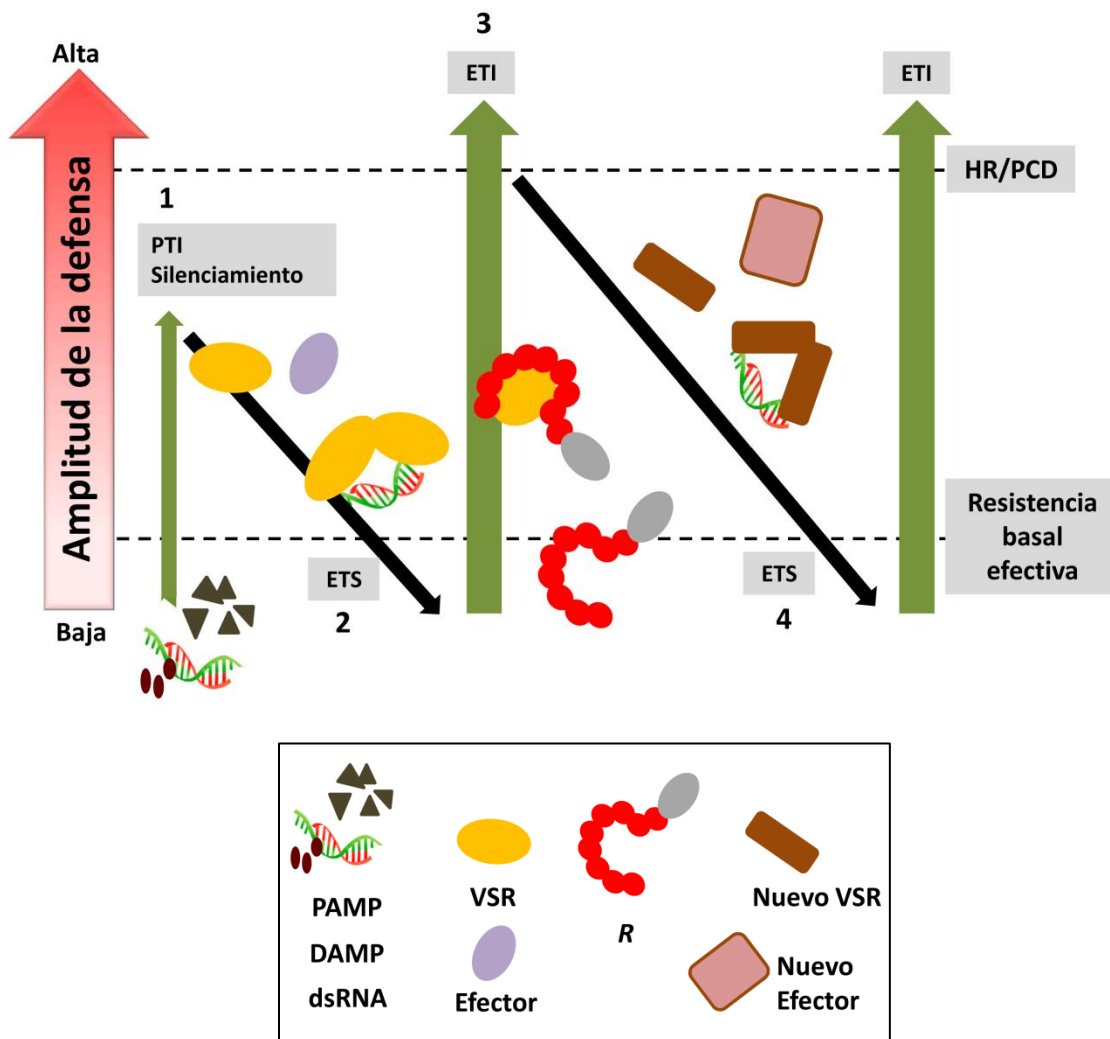
Aunque la inmunidad que aportan los factores R es altamente específica, parece improbable un reconocimiento directo y único entre un factor R y un factor Avr aislados. Este modelo, conocido como “modelo de interacción gen-a-gen” (Flor, 1956; Spoel y Dong, 2012), y propuesto inicialmente para explicar esta especificidad, no puede

explicar, sin embargo, la amplia capacidad inmune que presentan las plantas pese a contar con un número muy limitado de genes *R* en su genoma (Spoel y Dong, 2012). Por ello, se propuso la “hipótesis del guardián” (de *guard hypothesis*). Esta hipótesis se basa en la idea de que la misión fundamental de los factores *R*, o “*guards*”, más que unir factores *Avr* en la célula, consiste en monitorizar el estado de factores clave del hospedador, o “*guardees*”, con los cuales interaccionan. En este modelo, los efectores que el patógeno libera en la célula ejercen su acción sobre estos *guardees*, modificándolos o induciendo su degradación, lo cual ocasiona cambios conformacionales en los factores *R* a los que están asociados, y su activación (Jones y Dangl, 2006; Spoel y Dong, 2012; Moffett, 2016). De este modo, las plantas serían capaces de reconocer grupos específicos de patógenos que emplean estrategias de infección similares, ampliando enormemente su capacidad defensiva (Spoel y Dong, 2012).

### 1.2.6. PTI y ETI en infecciones víricas. El modelo de zig-zag

La visión actual del funcionamiento del sistema inmune contempla el proceso coevolutivo planta-patógeno como una sucesión de mecanismos de “defensa” y “contra-defensa”, y queda representada a través de un modelo en “zig-zag” en el que se distinguen hasta cuatro etapas (**FIG. 2**) (Jones y Dangl, 2006). En la primera etapa, los PAMPs y DAMPs son reconocidos a través de PRRs, activando la PTI. En la segunda, los patógenos resistentes pueden liberar proteínas efectoras que interfieran con el desarrollo de la PTI, contribuyendo a su virulencia y originando de nuevo susceptibilidad en el hospedador (ETS, de *effector-triggered susceptibility*). En la tercera etapa, las plantas desarrollan factores *R* capaces de reconocer algunos de estos efectores, activando la ETI, que generalmente desemboca en la HR. En la última etapa, la presión selectiva sobre el patógeno da lugar a la aparición de nuevas cepas capaces de evadir este reconocimiento. El esquema anterior puede revisarse y ampliarse para dar cabida a las particularidades de la interacción planta-virus. Así, en la primera etapa habría que señalar, aparte de PAMPs y DAMPs clásicos, al dsRNA como otro motivo

molecular conservado asociado a virus, y reconocido como tal en la planta, dando lugar a la activación de, además de la PTI, al silenciamiento génico como principal línea defensiva. En la segunda etapa, las proteínas efectoras liberadas por los virus serían los VSRs. En la tercera etapa, cualquier proteína vírica es potencialmente susceptible de ser reconocida por un factor R, incluido los VSRs, activando la ETI. Finalmente, en la tercera etapa, la presión selectiva daría lugar a la aparición de nuevas cepas de virus capaces de eludir esta ETI (Zvereva y Pooggin, 2012).



**FIGURA 2. Modelo en zig-zag de la evolución de la respuesta inmune frente a patógenos, modificado para incluir a virus.** En la **etapa 1**, PAMPs, DAMPs y dsRNA asociados a microorganismos potencialmente patogénicos, también a virus, interactúan con moléculas receptoras que en última instancia activan los mecanismos defensivos de la PTI y el silenciamiento génico. En la **etapa 2**, los patógenos liberan en la célula una serie de

proteínas efectoras, capaces de interferir con el desarrollo de la PTI; en el caso de los virus, estas moléculas efectoras son los supresores del silenciamiento, o VSRs. Estas proteínas incrementan la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del hospedador, o ETS (de *Effector-triggered susceptibility*). En la **etapa 3**, algunas plantas resistentes desarrollan factores de resistencia, producto de genes R, consistentes en proteínas con capacidad para detectar algunas de estas moléculas efectoras, como VSRs, u otras proteínas asociadas a un patógeno concreto. Este reconocimiento pone en marcha la ETI, la cual desemboca habitualmente en la HR. En la **etapa 4**, bajo la presión selectiva a la que se somete el patógeno, surgen nuevas variedades del mismo capaces de sortear el reconocimiento por parte de los factores R, modificando o desarrollando nuevos efectores/VSRs, evitando de este modo la ETI. Este proceso coevolutivo de “defensa” y “contra-defensa” se mantiene de forma permanente. Con: PAMP, patrón molecular asociado a patógenos (de *Pathogen-associated molecular pattern*); DAMP, patrón molecular asociado a daño celular (de *Damage-associated molecular pattern*); dsRNA, RNA de doble cadena (de *double-stranded RNA*); PTI, inmunidad inducida por patrones (de *Pattern-triggered immunity*); ETI, inmunidad inducida por efectores (de *Effector-triggered immunity*); ETS, susceptibilidad inducida por efectores (de *Effector-triggered susceptibility*); VSR, supresor del silenciamiento génico por RNA (de *Viral suppressor of RNA silencing*); R, factor de resistencia; HR, respuesta hipersensible (de *Hypersensitive response*); PCD, muerte celular programada (de *Programmed cell death*). Adaptado de Jones y Dangl, 2006, y Zvereva y Pooggin, 2012.

### 1.2.7. ER, HR, SHR y SN con virus. Defensa y muerte celular

Existen casos en los que el reconocimiento Avr-R evita la replicación del patógeno en el tejido infectado en ausencia de muerte celular. Este fenómeno tiene lugar, por ejemplo, en la interacción entre PVX y genotipos de patata portadores del gen de resistencia  $R_x$ , en las que se produce un reconocimiento de la proteína CP del virus. Esta resistencia recibe el nombre de resistencia extrema (ER, de *extreme resistance*) (Bendahmane *et al.*, 1999; Palukaitis y Carr, 2008). No obstante, la expresión de un factor Avr en un contexto de infección distinto al habitual, puede dar lugar a alteraciones en este reconocimiento. Así, cuando se expresa PVX CP a partir de un transgén y no de forma asociada a la replicación viral, la interacción Avr-R en estas mismas plantas de patata  $R_x$  determina la activación de una respuesta tipo HR, y no de la ER habitual (Bendahmane *et al.*, 1999). La ER, al contrario que la HR, puede ser independiente de la acumulación de SA, pero puede ir asociada a una acumulación temprana y vigorosa de ROS y a la expresión de genes defensivos (Künstler *et al.*, 2016).

Algunos sistemas Avr-R que habitualmente conducen a la HR también pueden mostrar distintos comportamientos en función de diversos factores. Un ejemplo bien estudiado lo constituye el gen de resistencia *N*, cuyo producto es capaz de reconocer al fragmento P50 de la proteína helicasa de TMV (Erickson *et al.*, 1999). *N* se aisló originalmente en *Nicotiana glutinosa*, y se introgresó posteriormente en distintas variedades de *N. tabacum* susceptibles a TMV (Whitham *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 2004), donde induce una respuesta de tipo HR en presencia de este virus. Esta HR retiene al patógeno en la zona de infección e impide su propagación sistémica (Whitham *et al.*, 1994). El análisis de mutaciones en los distintos dominios funcionales de *N* pone de manifiesto que, en muchos casos, se puede producir una pérdida de la capacidad de retener al patógeno en el sitio de infección sin que se pierda la capacidad de inducir PCD. Así, en tabacos mutados en el gen *N* este comportamiento puede dar lugar a la dispersión del patógeno y a la aparición de HR en diversas localizaciones sistémicas de la planta. Esta HR ineficaz recibe el nombre de respuesta hipersensible sistémica (SHR, de *Hypersensitive systemic response*) (Dinesh-Kumar *et al.*, 2000).

La expresión de un gen *R* en un fondo genético distinto al habitual, también da lugar a cambios en la respuesta obtenida. Así, en otros estudios, la resistencia a TMV debida a *N* se manifiesta de forma distinta en *N. benthamiana* que en los fondos genéticos habituales, *N. tabacum* o *N. glutinosa*. En *N. tabacum* y *N. glutinosa* resistentes, TMV ocasiona respuestas HR definidas; en *N. benthamiana*, la resistencia asociada al gen *N* se manifiesta a través de la aparición de parches cloróticos, con una HR poco definida (Peart *et al.*, 2002).

Además de HR y SHR, existe una tercera respuesta que implica la aparición de PCD, denominada necrosis sistémica (SN, de *Systemic necrosis*). La SN es quizá el síntoma más grave que un virus pueda inducir en su hospedador, y conlleva no solo la paralización del crecimiento, sino también la muerte sistémica de muchas de las hojas jóvenes, pudiendo desembocar, en ocasiones, en la muerte de toda la planta en pocos días (García-Marcos *et al.*, 2009; Künstler *et al.*, 2016). A diferencia del resto de respuestas comentadas más arriba, la SN se da, en principio, frente a virus compatibles, para los cuales no se ha caracterizado ningún factor de

resistencia concreto, ni se ha determinado, en la mayoría de los casos, la expresión de efectores por parte del virus que puedan ser reconocidos específicamente. Aunque la muerte celular inducida en interacciones incompatibles ha sido ampliamente estudiada, la asociada a patógenos compatibles permanece pobremente caracterizada.

La SHR y la SN presentan similitudes fenotípicas y moleculares. En la SN, al igual que en la SHR, se induce PCD en ubicaciones alejadas del lugar inicial de la infección, ligada a una pobre restricción de la dispersión viral, o a la ausencia de la misma, que permite al virus invadir sistémicamente la planta (Künstler *et al.*, 2016). Al igual que la HR y la SHR, la SN va acompañada de la condensación y fragmentación del DNA, la expresión de genes relacionados con la defensa, la acumulación de SA, la producción de ROS y la liberación de electrolitos (Xu y Roossinck, 2000; Kim *et al.*, 2008; Komatsu *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2012).

La SN puede inducirse en presencia de un solo virus compatible, o como resultado de la interacción de dos o más de ellos. Así, ejemplos de SN inducida por virus compatibles en hospedadores experimentales son la debida al potexvirus PLAMV en *N. benthamiana* (Ozeki *et al.*, 2006), o al tombusvirus TBSV en *Nicotiana clevelandii* y *N. benthamiana* (Chu *et al.*, 2000). En cuanto a las interacciones víricas que derivan en la aparición de necrosis, una de las más conocidas es la correspondiente al sinergismo PVX-potyvirus en *Nicotiana* spp., y es el objeto de estudio de esta tesis; otro ejemplo conocido es el correspondiente a la interacción entre CMV y su satélite RNA-D (satRNA-D), en tomate (Xu y Roossinck, 2000).

PLAMV-*N. benthamiana* constituye un patosistema modelo habitual en el estudio de la SN; en este caso, el determinante viral de la SN se localiza en la RNA polimerasa vírica, RdRp. Mediante la obtención de mutantes de delección de esta RdRp, y su expresión local de forma aislada, se ha determinado que la capacidad de inducir necrosis reside en el dominio helicasa (HEL), y depende del grado de acumulación de RdRp. En el virus completo, mutaciones en el dominio polimerasa de esta RdRp (POL) también afectan a la capacidad del virus para inducir SN, pese a que el dominio POL por sí mismo, expresado de forma

aislada, no produce necrosis. Esto sugiere que, en un contexto de infección, el dominio POL de la RdRp modula la replicación viral, y esto determina a su vez el grado de acumulación de la polimerasa, la cual induce la respuesta de SN a través de su dominio HEL, en función de su acumulación (Ozeki *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2010, 2011). En este patosistema, además, la SN depende de SGT1 y RAR1, chaperonas asociadas a factores R; el silenciamiento de estos dos factores conduce a una reducción en la necrosis inducida por PLAMV, pese a que el virus se acumula en mayor cantidad (Komatsu *et al.*, 2010). La SN va acompañada en este caso específico de cierto grado de restricción de la replicación viral; sin embargo, estudios de silenciamiento ponen de manifiesto que la inducción de necrosis y la resistencia al virus se desarrollan a través de rutas independientes (Komatsu *et al.*, 2010). No obstante, en otros casos de SN, como la presente en el sinergismo PVX-potyvirus, la muerte celular es ineficaz en el control de la replicación viral (García-Marcos *et al.*, 2013).

Numerosos estudios sugieren que en algunas de las interacciones planta-virus que derivan en SN podría producirse, al menos en cierto grado, un reconocimiento del patógeno, el cual sería responsable del inicio de una respuesta de resistencia. Aparte de la implicación de factores relacionados con la HR en la interacción PLAMV-*N. benthamiana* comentada más arriba, también se ha podido establecer una asociación directa entre la SN y la presencia de ciertos genes R. Uno de estos genes R es RT4-4, aislado originalmente a partir de *Phaseolus vulgaris* cv. Othello, y cuya expresión, como la de muchos otros genes R, se induce en plantas infectadas (Seo *et al.*, 2006). Este gen, expresado de forma transgénica en *N. benthamiana*, induce una respuesta de SN en infecciones con cepas específicas del cucumovirus CMV. Esta misma especificidad de infección, con alguna diferencia, se observa en *P. vulgaris*, de donde procede RT4-4: las cepas que inducen síntomas de mosaico en *P. vulgaris* también inducen mosaico en *N. benthamiana* transgénica, pero aquellas cepas para las que *P. vulgaris* es completamente resistente inducen SN en *N. benthamiana* transgénica. Este hecho pone de manifiesto que, pese a que la mayor parte de los genes R están limitados en su rango de acción a especies dentro de una misma familia, algunos pueden actuar en distintas

familias de plantas, aunque el contexto genético altere la respuesta que inducen, siendo más o menos efectivas en la restricción del patógeno (Seo *et al.*, 2006). Otro ejemplo de la implicación de genes R en SN ocurre con el gen *I*, también de *P. vulgaris*. Así, el gen *I* en homocigosis, confiere ER frente a BCMV (de *Bean common mosaic potyvirus*) a bajas temperaturas, mientras que a altas ocasiona HR; sin embargo, en heterocigosis, son las bajas temperaturas las que inducen HR frente a este virus, mientras que las altas ocasionan una respuesta de SN (Collmer *et al.*, 2000).

Las observaciones anteriores sugieren que, en realidad, todas estas respuestas podrían representar un continuo de posibilidades en el que el proceso molecular subyacente es el mismo, un reconocimiento Avr-R, que puede ser más o menos efectivo (Pacheco *et al.*, 2012; Künstler *et al.*, 2016). Así, un reconocimiento rápido y eficaz podría ir ligado a la acumulación temprana de ROS e inducción de genes defensivos que permitirían una contención exitosa del patógeno, en ausencia de muerte, en la respuesta ER. La HR sería fruto de una activación más tardía y lenta de las respuestas defensivas, que aún puede ser efectiva en la contención del patógeno. Finalmente, un reconocimiento tardío e ineficaz daría lugar a respuestas defensivas intensas y sostenidas sólo en las etapas avanzadas de la infección, que podrían verse, en parte, como un intento fallido del hospedador para limitar al patógeno. En estos casos, la aparición de necrosis sería un fenómeno colateral, como consecuencia del estrés celular debido a una activación prolongada de estas respuestas defensivas, originando SHR o, en casos extremos, SN (Künstler *et al.*, 2016).

### 1.3. POTEXVIRUS Y POTYVIRUS

Los virus *Potato virus X* (PVX), y *Plum pox potyvirus* (PPV), pertenecientes a los géneros *Potexvirus* y *Potyvirus*, respectivamente, se encuentran entre los virus más estudiados. Se trata de virus capaces de establecer interacciones compatibles en hospedadores experimentales tales como *N. benthamiana* o *A. thaliana*. Estos virus se han modificado para convertirlos en vectores, posibilitando la expresión sistémica de

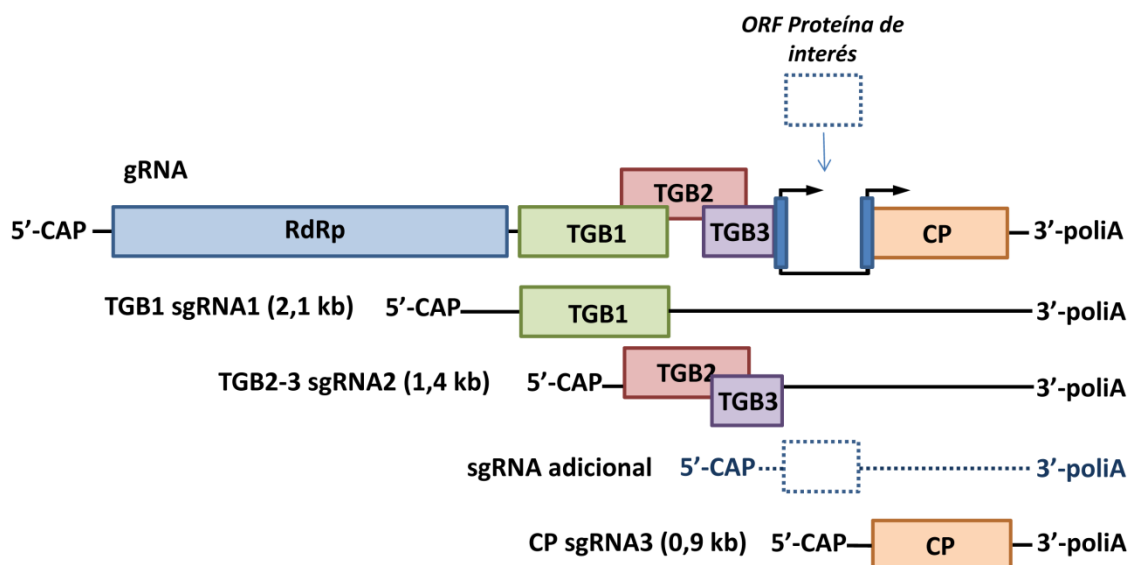
proteínas de interés en la planta. En esta tesis, se emplean PVX, PPV y quimeras obtenidas a partir de los mismos. A continuación, se describe brevemente cada uno de ellos, con especial énfasis en algunos de los factores víricos y detalles relevantes para el presente estudio.

### 1.3.1. Potexvirus. PVX

PVX es el virus modelo del género *Potexvirus*, uno de los ocho géneros pertenecientes a la familia *Flexiviridae*. Los potexvirus se caracterizan por presentar partículas filamentosas, flexuosas, de entre 470-580 nm de longitud. Presentan un genoma monopartito de ssRNA+, de 5,9-7,0 kilobases (kb), codificante de cinco proteínas. El extremo 5' presenta una caperuza 5'-metilguanosina (5'-CAP) y el extremo 3' finaliza en un polinucleótido de adenina o cola poliA (3'-poliA). El RNA genómico se encuentra recubierto por proteínas de la cápsida (CP) dispuestas de forma helicoidal (Adams *et al.*, 2004; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Los potexvirus pueden ocasionar infecciones en un elevado número de especies de interés agronómico, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, incluyendo entre estas últimas a patata, papaya, tomate y fresa, y en algunas plantas ornamentales. Entre los síntomas ocasionados se encuentran clorosis y mosaico clorótico, lesiones necróticas y reducción del crecimiento (Alam *et al.*, 2014). PVX, en el hospedador modelo *N. benthamiana*, produce una leve disminución del crecimiento y la aparición de mosaico y moteados cloróticos. PVX se transmite principalmente de forma mecánica, por el contacto de plantas infectadas con plantas sanas, a través de heridas (Alam *et al.*, 2014). Aparte de PVX, otros potexvirus tales como PLAMV se utilizan ampliamente en investigación. Otro de ellos, PepMV (de *Pepino mosaic potexvirus*), es un potexvirus emergente, que actualmente está recibiendo una elevada atención, debido a que supone una importante amenaza para el cultivo de tomate a nivel mundial (Sempere *et al.*, 2015).

En el genoma de los potexvirus existen cinco ORFs que, en dirección 5'-3', codifican la replicasa vírica, las proteínas del TGB (de *Triple Gene Block*), que incluye a TGB1, TGB2 y TGB3, y en el extremo 3' la secuencia codificante de CP. Las ORFs correspondientes al TGB

solapan entre ellas, y mientras que la replicasa se expresa directamente a partir del RNA genómico (gRNA), que hace las veces de mRNA, el resto de proteínas lo hacen a través de RNAs subgenómicos (sgRNAs), coterminales en 3' (**FIG. 3**). La replicasa vírica (RdRp), es una proteína de unos 166 kDa y presenta, en dirección N-terminal-C-terminal, un dominio con actividad metiltransferasa, asociado a la adición de la CAP, al que le sigue un dominio con actividad helicasa, y finalmente un dominio con actividad RNA-polimerasa dependiente de RNA (Li *et al.*, 1998; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2013). TGB1 es una proteína de 25 kDa, denominada también P25 o p25K; TGB2 y TGB3 son proteínas de 12 y 9 kDa, respectivamente. Las tres proteínas del TGB actúan de forma coordinada en la formación de complejos de replicación y en el movimiento del virus, tanto dentro de la célula como entre células, a través de los plasmodesmos (Solovyev *et al.*, 2012). La CP es una proteína de 25 kDa y podría estar implicada también en el movimiento del virus dentro de la célula y entre células, en colaboración con las proteínas del TGB (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007).



**FIGURA 3. Organización genómica de PVX.** En la parte superior, se representa el gRNA de PVX, codificante de cinco ORFs. La expresión de RdRp se efectúa a través del gRNA, que hace las veces de mRNA. La expresión del resto de ORFs se lleva a cabo a través de sgRNAs coterminales en 3', que aparecen representados bajo el gRNA, y cuyos tamaños (kb) para la forma PVX silvestre se indican entre paréntesis. PVX ha sido modificado para permitir la expresión sistémica de proteínas de interés; esto se ha logrado duplicando el promotor de la CP, lo que se refleja en el esquema en la posición localizada

entre TGB3 y CP, a través de rectángulos en azul oscuro con flechas de inicio. La expresión de una proteína de interés se realiza mediante la inserción de su secuencia codificante bajo la acción del promotor duplicado de la CP, lo que se refleja en el esquema como un rectángulo azul de borde punteado. La expresión de esta proteína adicional se realiza a través de un “sgRNA adicional”, cuyo tamaño está comprendido entre el del sgRNA2 y el del sgRNA3, cuyos tamaños en kb se ven incrementados a su vez según el tamaño del inserto. Con: 5'-CAP, caperuza 5-metilguanosina; 3'-poliA, cola de polinucleótido de adenina; gRNA, RNA genómico; RdRp, polimerasa vírica; TGB1,2 y 3, *Triple gene block 1, 2 y 3*; CP, proteína de la cápsida; sgRNA, RNA subgenómico; kb, kilobase; ORF, marco de lectura abierto (de *open reading frame*).

A lo largo del genoma de potexvirus existen elementos reguladores encargados del anclaje de la RdRp y del inicio de la replicación viral. Otros elementos se encargan de regular la expresión de los sgRNAs. Dos secuencias promotoras se han caracterizado en el gRNA como orígenes para el inicio de la síntesis del sgRNA1 (2,1 kb) y del sgRNA3 (0.9 kb), responsables de la expresión de P25 y de CP, respectivamente (Batten *et al.*, 2003; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). En estudios de expresión *in vitro*, un tercer subgenómico, el sgRNA2 (1,4 kb), se necesita para expresar TGB2 y TGB3, habiéndose confirmado su presencia en protoplastos de tabaco infectados con PVX (Verchot *et al.*, 1998). Sin embargo, el origen y la acumulación del sgRNA2 todavía no se conocen con exactitud; en plantas infectadas con potexvirus como PVX o CIYMV (de *Clover yellow mosaic potexvirus*), sólo se observan los sgRNA1 y 3. No obstante, estudios de complementación *in vivo* entre plantas transformadas y PVX modificados en el TGB ponen de manifiesto que TGB2 y TGB3 deben de expresarse a través de un mRNA bicistrónico de baja acumulación, donde la expresión de TGB3 se inicia, seguramente, a través de mecanismos de *leaky ribosome scanning* en el ORF TGB2. Este mecanismo regula la proporción en la que se acumulan las distintas TGBs, manteniendo los niveles de TGB3 muy bajos (Verchot *et al.*, 1998). Mediante la duplicación del promotor que dirige la expresión de la CP, se ha conseguido obtener vectores de PVX aptos para la expresión sistémica de proteínas de interés, que pasan a expresarse a través de un sgRNA adicional (**FIG. 3**) (Baulcombe *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997).

### 1.3.2. Las proteínas del TGB de PVX. P25

Durante el proceso de infección de numerosos virus, es habitual encontrar en las células infectadas estructuras a modo de cuerpos de inclusión, que en un principio recibieron el nombre de “Cuerpos X” (de *X-bodies*), debido a que su función no se conocía con exactitud (Goldstein, 1924). Muchos de estos cuerpos de inclusión se han revelado como estructuras en las que los virus replican asociados a sistemas membranosos, por lo que ahora también se les conoce como factorías víricas o VRCs (de *Viral replication complexes*) (Laliberté *et al.*, 2010). En el caso de infecciones con PVX, estos cuerpos X presentan localización perinuclear, y comienzan a aparecer en torno a los 1-2 días post-infección, con variaciones en número y tamaño según la célula infectada; en infecciones plenamente establecidas suele encontrarse uno por célula. En potexvirus, son las proteínas del TGB las encargadas de llevar a cabo la formación del cuerpo X, a través de la remodelación del sistema de endomembranas, derivadas del ER y del aparato de Golgi, y el citoesqueleto de filamentos de actina (Tilsner *et al.*, 2012; Linnik *et al.*, 2013). TGB2 y TGB3 son proteínas integrales transmembrana, que aparecen asociadas a las vesículas derivadas del ER; TGB1, 2 y 3 interaccionan entre ellas, y TGB1 y 2 también con CP (Yan *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2014). TGB2 induce la vesiculación de ER, y TGB3 parece dirigir el movimiento de estas vesículas desde el ER perinuclear al ER cortical, lo que podría tener importantes implicaciones en el movimiento del virus dentro de la célula (Park *et al.*, 2014).

En ausencia de P25 (TGB1), no se observa formación de cuerpo X, y la expresión aislada de esta proteína forma estructuras que recuerdan a este complejo, lo que sugiere que P25 es el componente encargado de organizar la formación del cuerpo X (Linnik *et al.*, 2013). De este modo, P25 dirige el reclutamiento y la acumulación en el cuerpo X de las vesículas granulares que derivan del ER, ricas en TGB2/3, y de ribosomas y replicasa vírica (Tilsner *et al.*, 2012). Estudios detallados de microscopía muestran como P25 forma inclusiones laminares granulares, que se han descrito como *beaded sheets*, firmemente empaquetadas en el centro del cuerpo X, y rodeadas por RNA vírico no encapsidado. En torno a estos agregados se empaquetan sistemas de endomembranas

derivadas del ER, que presentan forma característica de “aro” (de *hoop*). La mayoría de estas membranas contienen únicamente TGB2; algunas otras contienen TGB2/3 y podrían constituir sitios de replicación. Finalmente, haces de viriones encapsidados se acumulan en la periferia del cuerpo X (Tilsner *et al.*, 2012; Linnik *et al.*, 2013). En ausencia del cuerpo X, PVX todavía es capaz de replicar aunque de forma ineficaz, lo que sugiere que la función última de este VRC es optimizar la replicación viral (Tilsner *et al.*, 2012).

Como proteína de movimiento P25 resulta fundamental, y esta función se encuentra asociada a la formación del cuerpo X. Así, cuando se expresa de forma aislada una versión de P25 fusionada a la proteína reportera GFP (P25-GFP) se obtienen estructuras en forma de “barra” (RL, de *Rod-like structures*), que recuerdan al cuerpo X, y los mutantes incapaces de originar estructuras RL pierden su función como proteínas de movimiento (Yan *et al.*, 2012). En este movimiento, complejos ribonucleoproteicos víricos (vRNP, de *viral Ribonucleoprotein complex*), constituidos por el gRNA parcialmente encapsidado, y unido a P25 en 5', se dirigen desde los cuerpos X hasta los plasmodesmos, probablemente en colaboración con TGB2/3 en un movimiento asociado a membranas del ER; en el plasmodesmo, P25, y puede que también TGB2/3, en colaboración con proteínas del hospedador, aumentan el límite de exclusión del canal en un proceso conocido como *gating*, facilitando el movimiento vírico de célula a célula a través del desmotúbulo (Park *et al.*, 2014).

P25 es también un VSR, función que ya se ha detallado más arriba. Estudios con varias P25 mutantes ponen de manifiesto que su actividad como VSR es imprescindible para garantizar la movilidad del virus célula-célula, pero no suficiente; la existencia de mutantes con actividad VSR pero incapaces de actuar como proteínas de movimiento demuestra que debe existir una función adicional de P25, independiente de la actividad VSR, necesaria para el movimiento (Bayne *et al.*, 2005). P25 actúa también como activador traduccional de la partícula vírica, favoreciendo el desensamblaje del virión y el acceso de la maquinaria de traducción y de la replicasa al gRNA (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2014). Además, P25 se ha descrito también como una helicasa

perteneciente a la superfamilia I de DNA/RNA helicasas, siendo una especie de versión “simplificada” de la DNA helicasa bacteriana PcrA, con solo los dominios 1A y 2A, y ausencia de dominios 1B y 2B; el 1A conserva los subdominios I, IA, II y III, y el 2A los subdominios IV, V y VI, todos ellos característicos de este tipo de helicasas (Morozov y Solovyev, 2003). P25 actúa sólo sobre dsRNA, en cualquiera de las direcciones, de forma dependiente de ATP y  $Mg^{2+}$ . La actividad helicasa de esta proteína se ha relacionado con la función de *gating* en el movimiento célula a célula del virus, y con la eliminación de apareamientos intramoleculares en el gRNA (Kalinina *et al.*, 2002; Morozov y Solovyev, 2003).

### 1.3.3. PVX. Respuestas defensivas y muerte celular

Aparte de la resistencia debida a  $R_x$ , descrita más arriba, existen otros casos de respuestas defensivas del hospedador frente a PVX. La proteína P25 también actúa a modo de factor de avirulencia en plantas de patata que presentan el gen *Nb*. Esta respuesta consiste generalmente en una HR dependiente de SA y eficaz en la restricción del virus (Sánchez *et al.*, 2010), pero puede ser de tipo SHR cuando la inoculación se realiza a través de injerto, un sistema de inoculación de alta intensidad (Malcuit *et al.*, 1999). Aunque se conoce parcialmente la localización genética de *Nb* (Marano *et al.*, 2002), su caracterización detallada no se ha llevado a cabo. Otro tipo de resistencia a potexvirus, diferente a la debida a genes  $R$ , es la mediada por lectinas, proteínas con capacidad de reconocimiento de carbohidratos. JAX-1 (de *Jacalin-type lectin required for potexvirus resistance 1*) es una lectina que, en ecotipos de *A. thaliana* tales como Bay-0, restringe a nivel celular varios potexvirus, entre ellos PLAMV, WCIMV (de *White clover mosaic potexvirus*) o PVX, evitando su dispersión en la hoja inoculada y a nivel sistémico (Yamaji *et al.*, 2012). A través del análisis de mutantes de PVX con capacidad para sortear la restricción impuesta por JAX-1, se ha determinado que un residuo aminoacídico específico del dominio metiltransferasa de la RdRp resulta determinante para este reconocimiento, pese a que no parece evidente el

anclaje de carbohidratos al mismo; este residuo se encuentra ampliamente conservado en el género *Potexvirus* (Sugawara *et al.*, 2013).

En infecciones de PVX en *N. benthamiana*, TGB3 induce estrés en el ER, como pone de manifiesto el incremento que se observa en la acumulación de chaperonas residentes en el mismo, entre ellas BiP (de *ER luminal binding protein*). La sobreexpresión de TGB3 conduce a la puesta en marcha de la respuesta a proteína mal plegada (UPR, de *Unfolded protein response*) y a la aparición de PCD (Ye *et al.*, 2011, 2013). En la UPR, BiP se une a las proteínas desnaturalizadas que se acumulan en el ER. En ausencia de proteínas desnaturalizadas, BiP se une al dominio luminal de receptores transmembrana residentes en el ER, inactivándolos. Por ello, la acumulación de proteínas desnaturalizadas en ER conlleva la activación de estos receptores, entre los que se encuentran receptores de tipo IRE1 (de *Inositol-requiring protein-1*). IRE1 actúa sobre el mRNA codificante del factor de transcripción bZIP60 (de *basic leucine zipper 60*), procesándolo y determinando la expresión de su forma funcional truncada. En el núcleo, la forma de bZIP60 procesada activa la transcripción de los genes codificantes de las chaperonas residentes en el ER, entre ellas la propia BiP (Reis y Fontes, 2012; Zhang y Wang, 2012; Verchot, 2014). Esta respuesta promueve por tanto la supervivencia celular. Además, la acumulación de chaperonas podría promover la replicación viral, y el virus activaría esta ruta mediante la inducción de un estrés moderado como parte fundamental del proceso infectivo (Verchot, 2014). Cuando este estrés en el ER no se resuelve, se activan rutas de muerte que finalizan en la PCD, como ocurre con la sobreexpresión de TGB3; la sobreexpresión de BiP reduce el estrés y la necrosis inducida por TGB3, lo que es coherente con el funcionamiento de esta ruta (Ye *et al.*, 2011, 2013). Mecanismos equivalentes a estos podrían ponerse en marcha con la sobreacumulación de otras TGBs, debido a los efectos perturbadores que ejercen sobre el ER; esta posibilidad se explorará en el presente trabajo en relación a P25.

*A. thaliana* ecotipo Col-0, planta modelo ampliamente utilizada, se ha descrito habitualmente como un no-huésped para PVX, resistencia que se ha relacionado con la actividad de AGO2 (Jaubert *et al.*, 2011). Pese a ello, otros estudios ponen de manifiesto que este virus, de hecho,

es capaz de infectar a este hospedador, aunque se acumula a niveles mínimos, estableciendo infecciones que se han descrito como “subliminales” (Andika *et al.*, 2015).

#### 1.3.4. Potyvirus. PPV

PPV es un virus perteneciente al género *Potyvirus*, género que representa el 30% de los virus de plantas en cuanto a número de especies se refiere, lo que lo hace el más numeroso (Chung *et al.*, 2008; Olsper *et al.*, 2015). Con hasta 176 especies de virus, *Potyvirus* constituye también el género más grande dentro de los ocho que conforman la familia *Potyviridae* (Adams *et al.*, 2011). Los potyvirus se caracterizan por presentar partículas filamentosas, flexuosas, de entre 680-900 nm de longitud. Se trata de virus con genoma monopartito de ssRNA+, de unas 10 kb, codificante de una única poliproteína (Riechmann *et al.*, 1992). En el extremo 5' se encuentra unido covalentemente a una proteína denominada VPg (de *Viral protein genome-linked*), y el extremo 3' finaliza en una cola de poliA. La cápsida que recubre al gRNA presenta forma helicoidal. Son capaces de infectar a un elevado número de plantas, monocotiledóneas y dicotiledóneas, muchas de ellas de gran interés agronómico y ornamental. Los potyvirus ocasionan enfermedades con síntomas variados, como clorosis o rayas necróticas en hojas de monocotiledóneas, o clorosis de venas, mosaico, necrosis y malformaciones en dicotiledóneas (García *et al.*, 2014; Revers y García, 2015). PVY (de *Potato virus Y*) es el virus modelo de este género, pero muchos otros se utilizan ampliamente en investigación, como por ejemplo TEV (de *Tobacco etch potyvirus*), TuMV o PPV. En cuanto a este último, es el responsable de la enfermedad de la sharka (*Plum pox*), que constituye la enfermedad vírica más seria para la industria de los frutos de hueso (género *Prunus*), ocasionando importantes pérdidas y extendiéndose fácilmente, asistida por pulgones. La sharka produce desde cambios en la pigmentación de los frutos, con aparición de anillos amarillentos o puntos cloróticos, hasta malformaciones, necrosis y caída prematura de los mismos (Sochor *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014). Los potyvirus, a diferencia de los potexvirus, se transmiten a través de

insectos vectores, principalmente pulgones, de forma no persistente, y algunos de ellos también pueden transmitirse a través de semillas (Wang y Maule, 1994; Simmons *et al.*, 2013; Revers y García, 2015).

El genoma de potyvirus codifica una única poliproteína, que posteriormente se procesa de forma autoproteolítica en hasta diez proteínas únicas multifuncionales, gracias a la presencia de secuencias de procesamiento y dominios con actividad proteasa repartidos a lo largo de la misma. Esta poliproteína se expresa directamente a partir del gRNA, el cual hace las veces de mRNA. En dirección 5'-3', se encuentran las secuencias codificantes de P1, HC (de HCPPro, *Helper component proteinase*), P3, 6K1, CI (de *Cilindrical inclusion protein*), 6K2, VPg, NIa (de *Nuclear inclusion protein a*), NIb (de *Nuclear inclusion protein b*), y ya en el extremo 3' la proteína CP. Además, una proteína adicional, denominada PIPO (de *Pretty interesting Potyvirus ORF*), se expresa gracias a la presencia de un pequeño ORF situado en la región central de la secuencia codificante de P3. La expresión de esta ORF se realiza a través del mecanismo de cambio en el marco de lectura ribosómico (de *ribosomal frameshift*) de +2 nt (Chung *et al.*, 2008; Revers y García, 2015), o a través del mecanismo de deslizamiento de la polimerasa vírica dentro de la secuencia de P3 (de *polymerase slippage*); este último mecanismo origina copias de gRNA con un nucleótido adicional que permiten la lectura de PIPO (Olspert *et al.*, 2015). En ambos casos, el resultado es la producción de una proteína con la porción N-terminal de P3 fusionada a PIPO, o P3N-PIPO (**FIG. 4**).

Tres dominios con actividad proteasa se extienden a lo largo de la poliproteína potyviral; dos de ellos, localizados en P1 y HC, posibilitan la escisión de estas proteínas por sí mismas: P1 actuando en el extremo N-terminal de HC, y esta última actuando en el extremo N-terminal de P3. El resto de la poliproteína se procesa gracias a la acción proteolítica llevada a cabo por NIa, que reconoce secuencias de procesamiento específicas que delimitan a cada una de las otras proteínas. Así, mediante la inserción de duplicados de secuencias de reconocimiento para NIa en el interior del virus, se han obtenido vectores potyvirales aptos para la expresión sistémica de proteínas (**FIG. 4**) (Pasin *et al.*, 2014). P1 y NIa

son serín proteasas; HC es una cisteín proteasa (Riechmann *et al.*, 1992; Adams *et al.*, 2005; Revers y García, 2015).

Aparte de su actividad proteasa, P1 también presenta otras funciones. P1 potencia la actividad supresora de HC modulando su acumulación, efecto que parece relacionarse con un contexto más favorable a la traducción de HC cuando la secuencia P1 se encuentra presente aguas arriba (Tena Fernández *et al.*, 2013). En estudios con PPV y TEV, aunque P1 no es imprescindible para la replicación y dispersión sistémica del potyvirus, su presencia incrementa la acumulación del virus (Verchot y Carrington, 1995; Pasin *et al.*, 2014), y ese efecto no presenta relación con el silenciamiento génico (Pasin *et al.*, 2014). La escisión de P1 respecto de HC parece ser un evento clave, finamente regulado, pues mutaciones que impiden esta escisión comprometen la viabilidad del virus, y mutaciones que la promueven incrementan las respuestas defensivas del hospedador, lo que conduce también a una menor acumulación del virus a largo plazo; en la propia P1, el extremo N-terminal haría las veces de regulador negativo del autoprosesamiento de P1 (Pasin *et al.*, 2014).

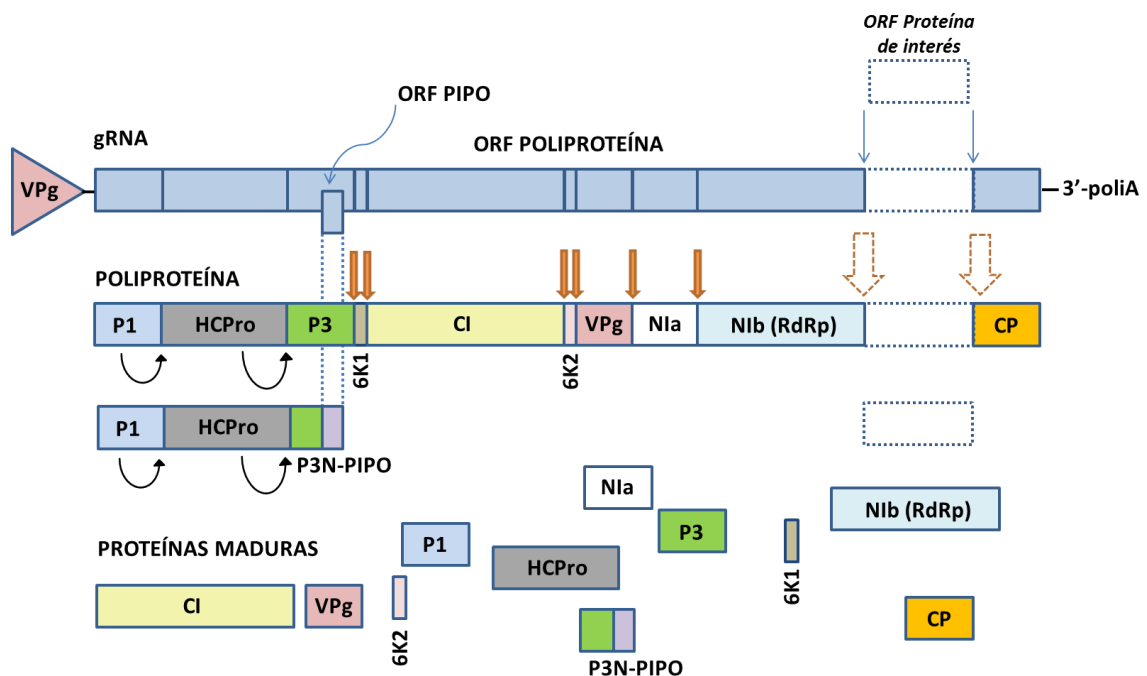
HC es una proteína citosólica de ca. 50 kDa, que forma homodímeros, y puede que oligómeros de mayor orden (Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005). Aparte de como proteasa, actúa como VSR, función que ya se ha detallado más arriba. HC también se ha caracterizado como elemento clave para la dispersión del virus por pulgones (Canto *et al.*, 1995; Revers y García, 2015). Dentro de la proteína, en el dominio N-terminal se localizan las funciones relacionadas con la transmisión por pulgones y la interacción con componentes del proteasoma; en el dominio central reside la actividad supresora del silenciamiento; finalmente, en el extremo C-terminal se localiza la actividad proteasa que posibilita la liberación de HC del resto de la poliproteína potyviral (Tena Fernández *et al.*, 2013; Revers y García, 2015). HC puede influir en la señalización hormonal, como pone de manifiesto la expresión transgénica de esta proteína en plantas de tabaco, donde modula las respuestas defensivas dependientes de SA (Alamillo *et al.*, 2006).

La función exacta de P3 todavía se desconoce, aunque se requiere para la replicación viral. Se ha descrito como una proteína de membrana asociada a vesículas del ER y a inclusiones en el aparato de Golgi, probablemente con implicaciones en la replicación y el movimiento del virus (Eiamtanastate *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2010). P3N-PIPO, debido a su localización en plasmodesmos (Wei *et al.*, 2010), y a que mutantes en la ORF PIPO carecen de movilidad (Wen y Hajimorad, 2010), parece ser fundamental en el movimiento célula-célula del virus, en asociación con la proteína CI y con otros factores del hospedador (Vijayapalani *et al.*, 2012; Sorel *et al.*, 2014; Revers y García, 2015). 6K1 aún no se ha asociado con una función definida (Revers y García, 2015). CI es una proteína con capacidad de unión a RNA y actividad helicasa dependiente de ATP; forma parte de complejos de replicación viral en los que, seguramente, actúa impidiendo la formación local de dsRNA. CI interacciona con CP, formando estructuras cónicas en los plasmodesmos que podrían estar implicadas en el movimiento célula-célula del virus (Deng *et al.*, 2015). En el citosol, CI forma inclusiones cilíndricas con un perfil a modo de “molinillo” (de *pinwheel*), que es distintivo de las infecciones por potyvirus. Estas inclusiones pueden estar funcionalmente relacionadas con el movimiento del virus hasta la vecindad de los plasmodesmos (Sorel *et al.*, 2014). 6K2, junto con CI, serían responsable de la emisión de vesículas del ER, relacionadas con la replicación y la traducción del gRNA; estas vesículas se acumulan en el ER cortical, desde ahí luego son conducidas hacia las inmediaciones de los cloroplastos, donde forman estructuras tubulares unidas a los mismos y promueven su agregación (Wei *et al.*, 2013; Sorel *et al.*, 2014).

VPg se relaciona con la traducción del gRNA; interacciona con el factor de iniciación eucariótico eIF4E. Además, se trata de una proteína intrínsecamente desorganizada, y esta propiedad la dota de flexibilidad para interactuar con un elevado número de componentes celulares y víricos. VPg también se ha caracterizado como el segundo VSR de potyvirus (Rajamäki *et al.*, 2014); la VPg de TuMV afecta a la etapa de generación de vsiRNAs secundarios, al interactuar físicamente con SGS3 y determinar su degradación por mecanismos de autofagia y a través de la ruta ubiquitina-proteasoma (Cheng y Wang, 2017).

Nla, aparte de su papel clave como proteasa en el procesamiento de la poliproteína potyviral, presenta actividad DNasa, que podría estar relacionada con la degradación del DNA del hospedador y la regulación de la expresión génica. NIb es la replicasa vírica, una RdRp, que modifica y emplea a VPg como cebador durante la replicación del gRNA (Revers y García, 2015).

CP, aparte de participar en movimiento y encapsidación, también está implicada en la transmisión por vectores, función para la que resulta fundamental la interacción entre CP y HC. En esta interacción, HC actúa, seguramente, a modo de “puente” entre la partícula vírica y el estilete del pulgón (Seo *et al.*, 2010).



**FIGURA 4. Organización genómica de PPV.** En la parte superior, se representa el gRNA de PPV, codificante de una única ORF que comprende las secuencias de las diez proteínas clásicas, denotado como “ORF POLIPROTEÍNA”. Una ORF adicional se muestra como un pequeño rectángulo azul solapado con la ORF principal; esta ORF codifica la proteína PIPO, y se denota en el esquema como “ORF PIPO”. La poliproteína potyviral, denotada como “POLIPROTEÍNA”, se expresa directamente a través del gRNA, que hace las veces de mRNA, en el que la proteína VPg, unida covalentemente en 5’, actúa a modo de caperuza. Diversos mecanismos posibilitan la expresión de PIPO, fusionada a la porción N-terminal de la proteína P3, de forma que cuando se procesa libera P3N-PIPO (para una descripción de estos mecanismos, consúltese el texto). P1 y HC actúan sobre sus respectivos extremos para escindirse de forma independiente, lo que se denota con flechas curvas negras. El resto de proteínas se liberan a través de la acción proteolítica de Nla sobre varias dianas; estas dianas se denotan como flechas naranjas y delimitan las restantes

proteínas. PPV se ha modificado para permitir la expresión de proteínas de interés; esto se ha logrado a través de la duplicación de sitios de procesamiento reconocidos por NIa. En el esquema, estos sitios de procesamiento artificiales se denotan con flechas naranjas huecas, en la posición situada entre N1b y CP. Cuando se inserta la secuencia codificante de la proteína de interés entre estos sitios, la proteína se expresa como parte de la poliproteína potyviral, y se libera finalmente como proteína madura gracias a la acción de NIa. En la parte inferior del esquema, se reflejan las proteínas tras el procesamiento, denotadas como “PROTEÍNAS MADURAS”. Con: RdRp, polimerasa vírica; HCPro, *Helper component proteinase* (HC); CI, *Cylindrical inclusion protein*; VPg, *Viral protein genome-linked*; NIa, *Nuclear inclusion protein*; N1b, *Nuclear inclusion protein b*; CP, proteína de la cápsida; PIPO, *Pretty interesting Potyvirus ORF*; P3N-PIPO, porción N-terminal de P3 fusionada a PIPO; ORF, marco de lectura abierto (*open reading frame*); RdRp, polimerasa vírica.

### 1.4. INFECCIONES MÚLTIPLES. EL SINERGISMO

Las infecciones víricas múltiples son fenómenos habituales en plantas, al contrario que en animales, donde las infecciones mixtas suelen estar más bien relacionadas con casos de depresión del sistema inmune (Waner, 1994; Pruss *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2016). De hecho, las coinfecciones en plantas parecen ser más bien la regla, y no la excepción (Syller, 2012). Las interacciones entre virus se dividen en antagónicas o facilitadoras. En las antagónicas, la infección previa con un virus puede evitar o interferir con el establecimiento de otro en el mismo hospedador, lo que se conoce como “protección cruzada” (de *cross-protection*); en otras ocasiones, un virus excluye a otro del lugar de infección en el que se localiza, ya sea a nivel celular o a nivel de tejido, lo que a veces conlleva la atenuación de síntomas y la desaparición de ambos virus de la planta, en un proceso denominado “exclusión mutua” (de *mutual exclusion*). En el caso de las interacciones facilitadoras, puede darse el fenómeno de “dependencia del ayudante” (de *helper dependence*), por el cual un virus incrementa la gama de hospedadores de otro, o en el que uno de ellos requiere factores derivados del otro para completar su propio ciclo de infección; o también puede darse el fenómeno de sinergismo viral (de *viral synergism*), cuando uno de los virus incrementa su acumulación en presencia del otro (Syller, 2012). Además de lo anterior, es necesario resaltar que entre la interacción antagónica y la facilitadora se establece todo un continuo de posibilidades intermedias, en el que unos mismos virus pueden presentar interacciones de un tipo u otro según el hospedador, así como existir pares de virus que muestren

peculiaridades en su interacción, con rasgos mixtos. Todo ello hace que, en la mayoría de las ocasiones, las infecciones mixtas presenten implicaciones biológicas y epidemiológicas impredecibles (Zhang y Holt, 2001; Syller, 2012).

Numerosas interacciones entre pares de virus se han descrito como sinérgicas, e incluso se han analizado casos de sinergismo múltiple (García-Cano *et al.*, 2006). En infecciones mixtas, una interacción sinérgica puede derivar en la aparición de síntomas que, en ocasiones, son mucho más graves que los síntomas que acompañan a las infecciones sencillas, con cualquiera de los virus por separado; a este fenómeno se le conoce, también, como sinergismo en patología (Hull, 2002). Muchos de estos sinergismos desembocan en la aparición de SN, respuesta que puede suponer la muerte de la planta en pocos días, y que se ha descrito más arriba (González-Jara *et al.*, 2004; Syller, 2012).

En muchos de los sinergismos estudiados interviene un potyvirus (Vance, 1991; Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Syller, 2012). En la mayoría de los casos, el potyvirus mantiene el mismo nivel de acumulación que en la infección sencilla, mientras que el otro virus incrementa sus niveles, causando esta interacción, frecuentemente, la muerte de la planta. Estas características se cumplen, entre otros, en los siguientes patosistemas: *N. tabacum* infectada con PVX y potyvirus, sinergismo que generalmente desemboca en SN (González-Jara *et al.*, 2004); *Cucumis melo* (melón) o *Cucurbita pepo* (calabacín), infectados con el cucumovirus CMV y el potyvirus ZYMV, también con desarrollo de SN (Wang *et al.*, 2002); y *Capsicum annuum* (pimiento), infectado con CMV y el potyvirus PepMoV (de *Pepper mottle potyvirus*), interacción que no conlleva SN, aunque sí va acompañada de síntomas más graves que los observados en las infecciones sencillas (Murphy y Bowen, 2006). Se han observado interacciones equivalentes a las anteriores también en ausencia de potyvirus, incrementándose el nivel de uno de los virus del par en relación a la infección sencilla. Así, en plantas de tomate infectadas con ToCV (de *Tomato chlorosis crinivirus*) y TSWV (de *Tomato spotted wilt tospovirus*), se registra una mayor acumulación de ToCV, mientras que TSWV no experimenta cambios, y la interacción va acompañada de una

exacerbación de los síntomas que desemboca en SN (García-Cano *et al.*, 2006).

Sin embargo, el sinergismo no siempre concurre con las características anteriores. Así, en la infección de batata (*Ipomea batatas* L.) con el crinivirus SPCSV (de *Sweet potato chlorotic stunt crinivirus*) y el potyvirus SPFMV (de *Sweet potato feathery mottle potyvirus*), el sinergismo deriva en la aparición de una enfermedad extrema, denominada SPVD (de *Sweet potato virus disease*), y es el potyvirus el que, a diferencia de otros sinergismos, incrementa su acumulación respecto a la infección sencilla (Karyeija *et al.*, 2000). Las infecciones mixtas del polerovirus PLRV con PVY, en patata, dan lugar a un sinergismo que se circunscribe a lo patológico, pues aunque los síntomas son más graves que en las infecciones sencillas, con la aparición de clorosis generalizada, malformaciones y moteados necróticos, no se observan diferencias importantes en la acumulación de cualquiera de los virus respecto a las infecciones sencillas (Srinivasan y Álvarez, 2007). En la infección de pepino (*Cucumis sativus*) y calabaza (*Legenaria siceraria*) con los virus CMV y ZYMV, el primero incrementa su acumulación, mientras que el segundo la reduce, pero igualmente la interacción va acompañada de un agravamiento de los síntomas, lo que supone el desarrollo de malformaciones, necrosis, marchitamiento y muerte de las plantas (Zeng *et al.*, 2007). Finalmente, otro tipo de interacción vírica sinérgica menos habitual, es la que tiene lugar, por ejemplo, en melocotonero (*Prunus persica*) infectado con PNRSV (de *Prunus necrotic ringspot ilarvirus*) y el viroide PLMVd (de *Peach latent mosaic viroid*); en este caso, los niveles de virus y viroide, y la gravedad de los síntomas no presentan diferencias significativas respecto de los que se observan en las infecciones sencillas. Pese a ello, la interacción PNRVS-PLMVd sí que origina importantes cambios transcriptómicos en melocotonero, que pueden calificarse de sinérgicos, en relación a los cambios transcriptómicos mínimos que se producen en las infecciones sencillas del virus y del viroide (Herranz *et al.*, 2013).

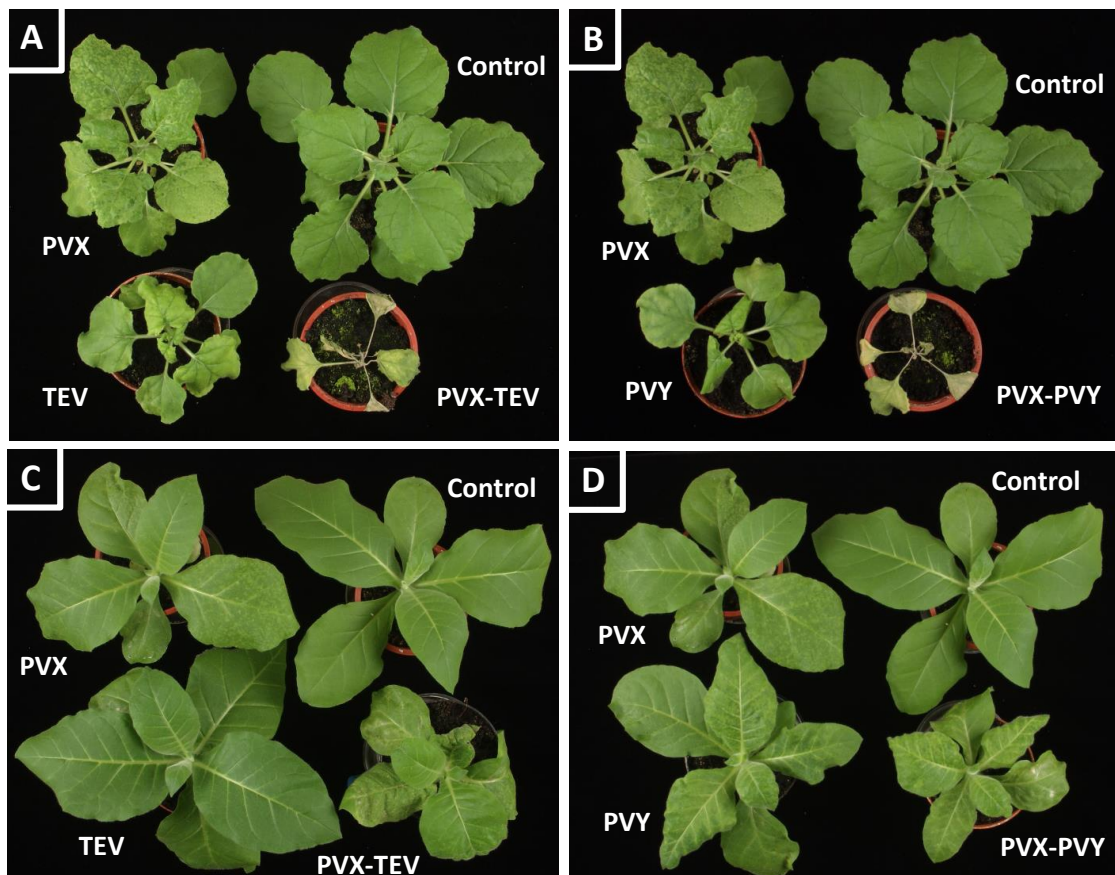
El fenómeno del sinergismo se ha asociado, en aquellos casos en los que participa un potyvirus, a la presencia de la proteína HC (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; Syller, 2012). En principio, HC podría ser

responsable de la acción en *trans* sobre la acumulación del otro virus, al suprimir de forma intensa las defensas del hospedador basadas en el silenciamiento génico (Pruss *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2005). No obstante, como se ha visto en los ejemplos comentados más arriba, no todos los casos de sinergismo viral van acompañados de sinergismo en patología, ni a la inversa, lo que, en general, permite cuestionar el incremento en la acumulación de uno de los virus como la causa principal del empeoramiento de los síntomas. Así, en la mayoría de los casos de sinergismos, el origen del incremento en la acumulación viral y la exacerbación de síntomas no se conocen todavía con exactitud.

#### 1.4.1. El sinergismo PVX-potyvirus

El sinergismo entre PVX y varios miembros del género *Potyvirus*, en hospedadores susceptibles como *N. tabacum* y *N. benthamiana*, es una de las interacciones víricas mejor estudiadas. Se sabe que la infección de *N. tabacum* con PVX, en presencia de PVY, TEV, TVMV o PepMoV, deriva en un agravamiento de los síntomas, incluida la aparición de SN (**FIG. 5C** y **5D**), que va acompañada de un incremento drástico en los niveles de PVX, de entre 3 a 10 veces en relación a los niveles que PVX alcanza en las infecciones sencillas (Shi *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2004). En estos sinergismos se ha determinado que es HC el único componente potyviral responsable de los incrementos en la gravedad de los síntomas y en la acumulación de PVX; esto se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, a través de tabacos transgénicos que expresan la P1-HC de TEV, en los cuales basta la infección sencilla con PVX para reproducir el fenotipo de la interacción sinérgica (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997). El par PVX-potyvirus también origina SN en otro hospedador susceptible, *N. benthamiana* (**FIG. 5A** y **5B**). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *N. tabacum*, en *N. benthamiana* PVX no incrementa de forma importante su nivel de acumulación en presencia de potyvirus (González-Jara *et al.*, 2004); así, la exacerbación de síntomas que acompaña al sinergismo PVX-potyvirus parece un fenómeno generalizado, mientras que los incrementos en la acumulación de PVX son dependientes del hospedador. Una posible explicación a esta

ausencia de elevación en los niveles de PVX es que *N. benthamiana* esté ya soportando los máximos niveles de replicación alcanzables por el virus (González-Jara *et al.*, 2004). En cualquier caso, esto hace improbable la existencia de una relación entre el nivel de acumulación de PVX y el agravamiento de los síntomas observado en este sinergismo (González-Jara *et al.*, 2004, 2005; García-Marcos *et al.*, 2009). HC también es el componente potyviral único y necesario para el desarrollo de este sinergismo en *N. benthamiana*. Así, la infección de este hospedador con formas quiméricas de PVX que incorporan la proteína HC de PPV es capaz de originar SN, de forma equivalente a lo que sucede en coinfecciones con PVX-PPV (González-Jara *et al.*, 2005). Además, la



**FIGURA 5. Ejemplos de interacciones sinérgicas con aparición de necrosis sistémica (SN).** Se muestran plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi infectadas con el par PVX-potyvirus, en relación a las infecciones sencillas correspondientes, a 12 días tras la inoculación. **A.** Sinergismo PVX-TEV en *N. benthamiana*. **B.** Sinergismo PVX-PVY en *N. benthamiana*. **C.** Sinergismo PVX-TEV en *N. tabacum* cv. Xanthi. **D.** Sinergismo PVX-PVY en *N. tabacum* cv. Xanthi. Para **A,B,C** y **D**, en la esquina

superior izquierda se muestra la infección sencilla con PVX; en la esquina superior derecha el control sano; y en la esquina inferior derecha, la infección mixta PVX-potyvirus correspondiente. Para **A y C**, en la esquina inferior izquierda se muestra la infección sencilla con TEV; para **B y D**, en la esquina inferior izquierda se muestra la infección sencilla con PVY. Con: Control, planta sana no infectada; PVX, *Potato virus X*; TEV, *Tobacco etch potyvirus*; PVY, *Potato virus Y*. Adaptado a partir de González-Jara et al. 2004

presencia de mutaciones en esta HC, causantes de la pérdida de su actividad supresora del silenciamiento, dan lugar a la desaparición de la respuesta de SN, pese a que los virus quiméricos mutados se acumulan a un nivel equivalente al de las formas quiméricas con HC funcionales. Sin embargo, ninguna quimera necrogénica se acumula a niveles superiores a los que lo hace la forma silvestre de PVX en infecciones sencillas o en combinación con PPV (González-Jara et al., 2005; Barajas et al., 2006). Otras quimeras de PVX, en este caso portadoras de VSRs distintos al potyviral, como por ejemplo PVX con la proteína P19 de tombusvirus (Scholthof et al., 1995), o con la 2b de cucumovirus (Del Toro et al., 2015), también dan lugar a la aparición de síntomas más graves que las infecciones sencillas. Es por tanto habitual utilizar como modelo simplificado de sinergismo a quimeras de PVX que expresan el HC de potyvirus (PVX-HC) (González-Jara et al., 2005; Barajas et al., 2006; Pacheco et al., 2012; Del Toro et al., 2015). Parece, pues, que los sinergismos asociados a PVX precisan de la participación de un potente VSR, que no tiene por qué ser necesariamente potyviral. Sin embargo, pese a los esfuerzos realizados en este campo, todavía se desconoce cuál es el factor de PVX último responsable de la inducción de SN en un contexto de sinergismo; este aspecto será uno de los puntos que se analizarán en la presente tesis doctoral.

#### **1.4.2. El sinergismo PVX-potyvirus. SN y regulación hormonal**

La respuesta de SN que se induce en el sinergismo PVX-potyvirus presenta características propias de la PCD. Así, en *N. benthamiana*, para el sinergismo PVX-PVY, y para la quimera modelo PVX-HC, la muerte

celular va acompañada de la degradación del DNA nuclear, como ponen de manifiesto distintos estudios con la técnica TUNEL (de *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Además, esta interacción conlleva un incremento del estrés oxidativo, derivado de la producción masiva de ROS, como se pone de manifiesto a través de tinciones DAB (3,3'-diaminobenzidina, para  $H_2O_2$ ) o NBT (nitroazul de tetrazolio, de *nitroblue tetrazolium*, para  $O_2^{\cdot-}$ ) (García-Marcos *et al.*, 2009, 2013). El sinergismo PVX-PVY, en *N. benthamiana*, induce importantes cambios a nivel transcriptómico, en relación a las infecciones sencillas, correspondientes a la expresión de genes relacionados con el metabolismo primario, el metabolismo de cloroplastos (asociado seguramente a la exacerbación del estrés oxidativo), y a la activación de MAPKs responsables de la activación de respuestas defensivas, como SIPK (de *Salicylic acid-induced protein kinase*). En el análisis transcriptómico también se observa que PVX-PVY comparte más genes regulados diferencialmente con las infecciones sencillas por PVX que con las debidas a PVY (García-Marcos *et al.*, 2009).

El SA, hormona central en la defensa antiviral, también presenta algún papel en estos sinergismos. Así, el tratamiento con SA consigue reducir la necrosis inducida por PVX-PVY en *N. benthamiana*. De un modo equivalente, la activación de la señalización por SA en *N. benthamiana* protege frente a la infección con PVX-HC, lo que se pone de manifiesto a través de una disminución en la respuesta de necrosis y en la acumulación de la quimera (Pacheco, 2014; García-Marcos *et al.*, 2013). Sin embargo, en plantas transgénicas NahG, que expresan la enzima bacteriana salicilato hidroxilasa, que degrada al SA evitando su acumulación, no se observan cambios en la necrosis inducida por el par sinérgico (García-Marcos *et al.*, 2013). La SN que se produce en la infección con PVX-HC, presenta importantes similitudes a nivel transcriptómico y hormonal con la SHR inducida en una interacción incompatible modelo, como es la infección con TMV de *N. benthamiana* transgénica para el gen de resistencia *N*. Entre ambas respuestas existe un marcado parecido en la represión de genes relacionados con la fotosíntesis; en el caso de la respuesta hormonal, la principal diferencia estriba en una mayor activación en la SHR de mecanismos de defensa

mediados por SA. Además, el perfil de expresión génica global en SN, una vez avanzada la infección, es más parecido al de la SHR temprana que al de una SHR tardía. Todo lo anterior sugiere que la respuesta de SN se presenta retardada en el tiempo con respecto a la SHR, puede que fruto de un reconocimiento parcial o ineficaz del patógeno, que sólo tiene lugar cuando este se ha extendido considerablemente, o debido a la supresión temporal de los mecanismos defensivos de la planta en la interacción sinérgica (Pacheco *et al.*, 2012; Pacheco, 2014).

La participación de otras hormonas en la defensa antiviral, como el JA, es controvertida, a diferencia de lo que ocurre con el SA. El JA forma parte de una gran familia de compuestos químicos biológicamente activos, que derivan de la peroxidación de ácidos grasos, y que se denominan oxilipinas (Mosblech *et al.*, 2009). La ruta de biosíntesis de estos compuestos comienza con la acción inicial de tres actividades enzimáticas distintas, denominadas 9-lipoxigenasa (9-LOX), 13-lipoxigenasa (13-LOX) y  $\alpha$ -dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX). Cada una de estas actividades inicia una ruta de biosíntesis distinta a partir de los mismos sustratos, consistentes principalmente en los ácidos linoleico (18:2) y linolénico (18:3). La acción de 9-LOX, 13-LOX y  $\alpha$ -DOX sobre estos sustratos genera una serie de compuestos primarios, sobre los que ejercen su actividad muchas otras enzimas secundarias, originando una amplia familia de moléculas cuya participación en procesos de defensa se ha puesto de manifiesto en diversos patosistemas (Blée, 2002; Turner *et al.*, 2002; García-Marcos *et al.*, 2013). Una de las oxilipinas que se obtiene como producto de la ruta iniciada por 13-LOX es precisamente el JA. La forma biológicamente activa del JA es el JA-Ile (JA-isoleucina), que se obtiene bajo la acción de la enzima treonina desaminasa (TD). En la percepción del JA, en forma de JA-Ile, interviene una proteína denominada COI-1 (de *Coronatine-insensitive 1*), a través de la cual el JA ejerce la mayor parte de sus efectos en la regulación de la expresión génica (Devoto *et al.*, 2005; Kazan y Manners, 2008). TD es un gen que se induce en presencia de JA, así que es habitual su utilización como indicador de la señalización por esta hormona (Samach *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 2006). El JA, junto con el etileno, se ha descrito habitualmente como una hormona implicada en la defensa frente a patógenos

necrotrofos; otras oxilipinas, en general, se han relacionado con la muerte celular de la HR (Rustérucci *et al.*, 1999). Por el contrario, el SA se suele identificar como hormona implicada en la defensa frente a biotrofos (Bari y Jones, 2009). La interrelación SA-JA ya se mencionó más arriba, observándose, generalmente, efectos antagónicos, y en ocasiones, sinérgicos (Mur *et al.*, 2006; Kazan y Manners, 2008).

En la interacción sinérgica PVX-PVY, el análisis transcriptómico pone de manifiesto que la única ruta de síntesis hormonal regulada diferencialmente en la infección mixta respecto a las sencillas es la correspondiente a las oxilipinas (García-Marcos *et al.*, 2009). La infección por PVX-PVY incrementa la expresión de los genes de biosíntesis de oxilipinas 9-LOX, 13-LOX y  $\alpha$ -DOX. En concordancia con esto, el silenciamiento de estos genes, llevado a cabo a través de VIGS, conlleva una disminución en la necrosis inducida por la infección mixta, aunque ningún efecto sobre la acumulación viral. Este resultado vuelve a poner de manifiesto que la SN es una respuesta defensiva ineficiente o descontrolada, y revela a las oxilipinas como moléculas clave en este proceso, promoviendo la muerte celular en un contexto de sinergismo viral (García-Marcos *et al.*, 2009, 2013). En plantas infectadas con PVX-PVY, el silenciamiento de COI-1 mediante VIGS ocasiona un incremento en la necrosis y en la expresión de los genes de biosíntesis de oxilipinas; por tanto, es probable que COI-1 ejerza un control negativo sobre la expresión de estos genes, y por extensión, sobre la necrosis inducida por este par sinérgico (García-Marcos *et al.*, 2013). Efectos similares se obtienen en plantas infectadas con la quimera PVX-HC (Pacheco *et al.*, 2012). Además, en plantas infectadas con PVX-PVY y tratadas con JA, lo que activa en ellas la señalización a través de COI-1, se observa una reducción de la expresión de este factor; esto último puede explicar el incremento en la necrosis que se observa en estas mismas plantas, pues el tratamiento con JA sería responsable de una mayor producción de oxilipinas, efecto que ejerce a través de la represión del regulador negativo de estas, COI-1 (García-Marcos *et al.*, 2013).

Algunos estudios sugieren la existencia de comportamientos antagónico SA-JA en este patosistema. Así, en plantas NahG infectadas con PVX-PVY, la necrosis que se obtiene es equivalente a la que se

registra en las plantas silvestres infectadas; también, el tratamiento con JA eleva la necrosis a niveles equivalentes en ambos tipos de plantas infectadas. Estos resultados sugieren que la disminución de necrosis que se observa en los tratamientos con SA, más que a un efecto directo, puede deberse a su acción antagónica sobre la ruta del JA (García-Marcos *et al.*, 2013; Pacheco, 2014).

## **1.5. INTERACCIONES PLANTA-VIRUS Y EL CAMBIO CLIMÁTICO**

Las interacciones planta-virus dependen fuertemente de las condiciones ambientales reinantes, las cuales afectan a la morfología, la fisiología y la resistencia del hospedador a los virus, así como a los ciclos biológicos, la abundancia y la diversidad tanto del hospedador como del virus. De este modo, los cambios que se están registrando en parámetros ambientales asociados al cambio climático, como son la [CO<sub>2</sub>], la temperatura o la disponibilidad de agua, seguramente alterarán el resultado de estas infecciones, pero sus efectos son impredecibles y se encuentran mayormente inexplorados (Canto *et al.*, 2009; Jones, 2016). Menos aún se ha analizado el impacto de estos factores de estrés abiótico en el resultado de las interacciones sinérgicas. Algunos de estos puntos serán objeto de estudio en el presente trabajo de tesis.

### **1.5.1. Efectos del incremento de temperatura**

Las altas temperaturas, aunque de forma variable, afectan a las plantas prácticamente en cualquier aspecto de su biología, desde el desarrollo vegetativo hasta la reproducción. En muchas especies de interés agrícola, su efecto sobre el desarrollo reproductivo es determinante, ocasionando una pérdida notable de la viabilidad del polen y la consiguiente caída en la producción (Zinn *et al.*, 2010). En términos de crecimiento vegetativo, las altas temperaturas conducen a cambios en la arquitectura de hojas, tallos y raíces, a la reducción del crecimiento, y a daños o senescencia acelerada de hojas, tallos y frutos (Vollenweider y Günthardt-Goerg, 2005; Wahid *et al.*, 2007).

En plantas, la exposición a altas temperaturas determina la activación de una serie de respuestas dirigidas a evitar el incremento de la temperatura (mecanismos de evitación) o, si esto sucede, minimizar o reparar sus efectos dañinos (mecanismos de tolerancia) (Levitt, 1972). El aumento de temperatura en la planta produce cambios en la fluidez de la membrana que se relacionan con la apertura de ciertos canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que ocasiona un incremento de la concentración citoplasmática de este catión y la activación de numerosas rutas de señalización (Saidi *et al.*, 2009). La activación de estas rutas desemboca en una represión generalizada de la síntesis proteica habitual y en un incremento de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP, de *Heat shock protein*), de componentes de las rutas de degradación proteica, y de enzimas implicadas en la biosíntesis de osmolitos y sustancias antioxidantes protectoras. Las altas temperaturas también inducen cambios en la organización del citoesqueleto y de los orgánulos celulares, y alteran los balances hormonales habituales. Uno de los efectos más tempranos del estrés térmico consiste en la alteración estructural y funcional del cloroplasto, lo que implica cambios en los sistemas de membranas que alojan al aparato fotosintético, y la reducción o inhibición de las enzimas implicadas en la asimilación de carbono, incluidas la propia enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), y su enzima reguladora, la Rubisco activasa. Las alteraciones en el funcionamiento del aparato fotosintético contribuyen a la liberación de ROS, las cuales intervienen en la oxidación dañina de componentes celulares (Bita y Gerats, 2013). Estas ROS también participan en procesos de señalización relacionados con la adquisición de tolerancia, entre los que se encuentra la expresión de proteínas HSP (Larkindale *et al.*, 2005*b*).

Las altas temperaturas ocasionan una reducción en la acumulación de algunas fitohormonas, entre las que se encuentran las citoquininas (CKs), las auxinas (AUXs) y las giberelinas (GAs). Otras, en cambio, incrementan su acumulación, como por ejemplo el ácido abscísico (ABA) y el etileno (ET), lo que se relaciona con la senescencia acelerada observada bajo el estrés térmico (Bita y Gerats, 2013). También existen estudios que demuestran que el estrés por calor conduce a una mayor acumulación de SA, de JA y de otras oxilipinas en numerosas especies

vegetales (Bita y Gerats, 2013; Hayat *et al.*, 2013; Sharma y Laxmi, 2016); para SA y JA se observa un incremento rápido y transitorio tras la exposición inicial al calor, seguido de una bajada a los niveles previos en pocas horas (Dat *et al.*, 1998; Hayat *et al.*, 2013; Zandalinas *et al.*, 2016). Los mutantes de *A. thaliana* alterados en la señalización por SA y JA presentan una mayor liberación de electrolitos a altas temperaturas en relación a las formas silvestres, lo que es indicativo de mayor daño celular; esta observación pone de manifiesto el papel relevante de estas dos hormonas en la adquisición de tolerancia al estrés térmico (Larkindale *et al.*, 2005a; Clarke *et al.*, 2009). No se conoce exactamente qué mecanismos protectores se activan en respuesta a estas hormonas, aunque se sabe que son independientes de la expresión de HSPs (Larkindale *et al.*, 2005a,b; Sharma y Laxmi, 2016). El SA, además, podría condicionar la tolerancia al calor a través de la modulación del estado redox de la planta (Dat *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 2015).

La temperatura también afecta a la actividad de la ruta de silenciamiento génico mediado por sRNAs y al reconocimiento de factores de avirulencia (Avr) mediado por factores de resistencia (R), lo que puede suponer importantes cambios en el resultado de la interacción planta-virus. En general, los brotes de enfermedades víricas de plantas se asocian con episodios de bajas temperaturas, mientras que las altas temperaturas conducen a una desaparición o atenuación de los síntomas de infección, fenómeno conocido como “enmascaramiento por calor” (Johnson, 1922; Hull, 2002; Szittyta *et al.*, 2003).

A bajas temperaturas, en plantas infectadas, se ha observado una reducción en los niveles de vsiRNAs en relación a los que se observan a temperaturas habituales, mientras que estos comienzan a acumularse a medida que la temperatura asciende. Este hecho es relevante para la defensa, pues los vsiRNAs constituyen la molécula central de la ruta de silenciamiento antiviral, y podría explicar la menor acumulación viral que se registra a temperaturas superiores a las habituales para una infección dada (Szittyta *et al.*, 2003). Así, en el patosistema *N. benthamiana*-CymRSV (de *Cymbidium ringspot tobusvirus*), el virus se acumula de forma elevada a 24°C, induciendo la muerte de la planta, mientras que a 27°C la acumulación de CymRSV es menor y las plantas apenas muestran

síntomas de infección; este fenómeno correlaciona con una mayor acumulación de siRNAs derivados de CymRSV a 27°C que a 24°C (Szittyá *et al.*, 2003). Este efecto de la temperatura también es común para virus de DNA, como pone de manifiesto la infección de *N. benthamiana* con distintos tipos de geminivirus: el incremento de temperatura desde los 25°C hasta los 30°C va acompañado de una disminución de la carga viral, una reducción en la gravedad de los síntomas y una mayor acumulación de vsiRNAs (Chellappan *et al.*, 2005). Para algunos otros virus, también se han observado reducciones en la acumulación y gravedad de los síntomas con el incremento de temperaturas; entre estos virus se encuentran potexvirus como PVX, o potyvirus como PVY (Del Toro *et al.*, 2015). Los estudios de silenciamiento de RDR6, también sugieren que esta proteína es una de las implicadas en la regulación de la resistencia dependiente de temperatura; así, en plantas infectadas, se ha determinado que el nivel de esta proteína se incrementa a temperaturas elevadas, y que la disminución de la carga viral y de los síntomas correlaciona con la acumulación de esta proteína (Qu *et al.*, 2005). Otro componente de la ruta de silenciamiento, AGO1, también se relaciona con la atenuación de síntomas observada a altas temperaturas en infecciones de *N. benthamiana* con el nepovirus ToRSV (de *Tomato ringspot nepovirus*), a través de mecanismos de represión traduccional (Ghoshal y Sanfaçon, 2014). Sin embargo, este efecto de atenuación a altas temperaturas no se observa en todos los casos. Así, en *N. benthamiana* infectada con CMV, el incremento de temperaturas no ocasiona cambios apreciables en la acumulación viral ni en la gravedad de los síntomas (Del Toro *et al.*, 2015).

La alteración del reconocimiento Avr-R a altas temperaturas, y por tanto la ausencia de HR, es un fenómeno común que se da no solo en la interacción planta-virus, sino también en aquellas que implican hongos o bacterias (Wang *et al.*, 2009). La HR que induce el gen *N* en presencia de TMV desaparece de forma reversible a temperaturas superiores a 28°C en tabaco (Samuel, 1931), y lo mismo ocurre cuando se expresa el gen *N* de forma transgénica en tomate (Whitham *et al.*, 1996). La HR que se desarrolla bajo la expresión simultánea del gen *N* y el dominio P50 de la

helicasa de TMV en hojas de *N. benthamiana* también muestra esta sensibilidad a la temperatura. Un comportamiento similar se observa con la HR que se induce con el gen Rx en presencia del factor de avirulencia PVX CP, cuando se coexpresan en plantas de *N. benthamiana* a temperaturas de 30°C. Las variaciones de temperatura, incluso moderadas, podrían estar ocasionando cambios en la expresión de proteínas de choque térmico y de otras proteínas con función chaperona, alterando por tanto la estabilidad de los complejos R y su activación; también pudiera ser que la propia planta reclute estas chaperonas para funciones celulares más esenciales durante el estrés térmico, afectando esto a la defensa. Tampoco se puede excluir la posibilidad de que las altas temperaturas estén afectando a la interacción Avr-R en el reconocimiento del patógeno, o modificando las rutas de señalización que se ponen en marcha cuando este tiene lugar (Wang *et al.*, 2009).

Finalmente, también debe señalarse que el incremento de temperatura puede afectar igualmente al funcionamiento de varios componentes víricos y condicionar de este modo el desarrollo de procesos biológicos clave como son el movimiento intracelular o a larga distancia del virus, así como a su replicación. Este efecto sobre la replicación se ha observado, por ejemplo, para bromovirus y tobamovirus, cuya replicasa disminuye su actividad de síntesis de RNA a medida que se incrementa la temperatura (Dawson, 1976; Dawson *et al.*, 1978).

### **1.5.2. Efectos del incremento en la [CO<sub>2</sub>]**

Las plantas cultivadas en atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub> presentan un crecimiento acelerado y mayor porte, debido a un aumento en el número y en el tamaño de las células, generando de este modo más biomasa. Todo ello es fruto principalmente de tres factores: un mayor número y tamaño de los cloroplastos e incrementos en la actividad fotosintética total (Madsen, 1973; Tripp *et al.*, 1991; Amthor, 1995); una mayor eficiencia en el uso del agua y menor transpiración (Rogers y Dahlman, 1993; Prior *et al.*, 2011); y cambios en los balances hormonales habituales (Teng *et al.*, 2006). El incremento en la producción de biomasa

deriva de una mayor fijación de CO<sub>2</sub> producida por la inhibición competitiva de la fotorrespiración, al disponer la Rubisco de una mayor [CO<sub>2</sub>] tisular. Aunque este efecto sobre el crecimiento se registra para la mayoría de las plantas, es más importante en las de tipo C3 que en las de tipo C4, como consecuencia de las diferencias en la arquitectura foliar y en los mecanismos de fijación de CO<sub>2</sub> que presenta cada una de ellas (Prior *et al.*, 2011).

Sin embargo, el incremento observado en la fotosíntesis es bastante inferior al esperado (Ainsworth y Rogers, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013), lo que supone, por tanto, una alteración de la actividad fotosintética de las plantas bajo alta [CO<sub>2</sub>]. En estudios realizados sobre *A. thaliana*, se observa que bajo altas concentraciones de este gas se producen disminuciones de la densidad y de la conductividad estomáticas por unidad de superficie. Aunque estas plantas presentan un mayor número de cloroplastos, estos muestran cambios importantes en su arquitectura, entre ellos una reducción en el número de membranas tilacoidales por grana. Este efecto puede estar relacionado con el aumento en el número y en el tamaño de los granos de almidón presentes en el estroma de estos orgánulos. A su vez, estos cambios van acompañados de una disminución en el contenido de enzima Rubisco por unidad de superficie. En conjunto, todo ello podría explicar esa capacidad fotosintética alterada de *A. thaliana* crecida en alta [CO<sub>2</sub>] (Teng *et al.*, 2006). La disminución de Rubisco parece un fenómeno común en otras especies, pues también se ha observado en otras plantas crecidas bajo estas condiciones (Gutiérrez *et al.*, 2013; Del Toro *et al.*, 2015).

Junto con este efecto sobre la fotosíntesis, se observa una disminución generalizada de la acumulación de nutrientes minerales presentes por unidad de peso seco, lo que conlleva, entre otros cambios, un incremento del coeficiente C:N. Se ha sugerido que esta disminución en el contenido de N, y también de otros nutrientes minerales, deriva del efecto combinado de i) dilución en la hoja de los nutrientes por el incremento de carbohidratos y ii) reducción en el flujo de nutrientes desde el suelo como consecuencia de la bajada en la conductividad estomática (Teng *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2013). Esta reducción de N

afecta fundamentalmente a los tejidos jóvenes (Gutiérrez *et al.*, 2013), y podría ser responsable de la disminución observada en el contenido total de proteína por unidad de superficie de tejido foliar en estas plantas (Huang *et al.*, 2012; Del Toro *et al.*, 2015), incluida la caída en la cantidad de Rubisco (Ainsworth y Rogers, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2013). En *A. thaliana*, el CO<sub>2</sub> también conduce a cambios en la acumulación de fitohormonas en las hojas, observándose incrementos de AUXs, GAs y CKs, y reducción de ABA, lo que podría estar relacionado con el incremento en el tamaño y número de las células observado en ellas (Teng *et al.*, 2006).

El CO<sub>2</sub> es también capaz de elevar los niveles de SA y la expresión de genes de respuesta a esta hormona en numerosas plantas, aunque los mecanismos exactos a través de los cuales ejerce este efecto todavía se desconocen (Canto *et al.*, 2009; Jones, 2016). Varios estudios ponen de manifiesto que el incremento de CO<sub>2</sub> y la acumulación de SA van asociados a una mayor defensa frente a patógenos fúngicos, bacterianos y víricos (Zhang *et al.*, 2015; Mhamdi y Noctor, 2016). En *A. thaliana*, se ha demostrado que esta resistencia está ligada a los efectos metabólicos que el SA ejerce sobre componentes del sistema redox de la planta (Mhamdi y Noctor, 2016). Además, el efecto antagónico que el SA ejerce sobre la señalización por la ruta del JA puede conducir a cambios en la intensidad de las respuestas defensivas frente a distintos tipos de patógenos en presencia de alta [CO<sub>2</sub>]. Así, cuando se exponen plantas de tomate a atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub>, la acumulación de SA conlleva un incremento en la resistencia frente a patógenos biotrofos (sensibles a SA), mientras que se observa una mayor susceptibilidad a patógenos necrotrofos (sensibles a JA), seguramente debido a esta interferencia del SA sobre la ruta del JA (Zhang *et al.*, 2015). Aunque el incremento de SA inducido por el CO<sub>2</sub> se observa sobre numerosas especies vegetales, sus efectos sobre la acumulación de JA son contradictorios, habiéndose observado una disminución o ausencia de efecto sobre la acumulación de esta hormona (Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015) o, en otros casos, una activación conjunta de la señalización por SA y por JA (Mhamdi y Noctor, 2016).

El incremento en la  $[\text{CO}_2]$  altera las respuestas defensivas frente a virus. De este modo, en plantas de tomate sometidas a concentraciones de este gas de hasta 800 ppm se observa un incremento de la resistencia frente a TMV, con disminuciones en los niveles de virus y en la gravedad de los síntomas (Zhang *et al.*, 2015). En infecciones de TYLCV (de *Tomato yellow leaf curl begomovirus*), un virus de DNA, también se observa una disminución en el número de plantas que muestran síntomas así como en la gravedad de los mismos, además de una menor acumulación del virus, cuando las plantas de tomate infectadas crecen en una atmósfera con 750 ppm de  $\text{CO}_2$  (Huang *et al.*, 2012). En estos dos casos, la mayor resistencia a los virus se ha relacionado con un incremento en los niveles de SA y con la interferencia de esta hormona con la ruta de señalización por JA. En infecciones sencillas de *N. benthamiana* con tres virus no relacionados, como son PVY, PVX y CMV, se observan variaciones en la acumulación de solo los dos últimos virus: PVX reduce su acumulación, mientras que CMV la incrementa, analizado como contenido de virus por unidad de superficie de tejido foliar, en experimentos realizados a  $[\text{CO}_2]$  de 970 ppm; sin embargo, la gravedad de los síntomas es similar a la registrada en condiciones normales de  $\text{CO}_2$  (Del Toro *et al.*, 2015). Cuando el título viral se midió en estos mismos experimentos como proteína viral en relación a la Rubisco, cuyos niveles decrecieron significativamente en alta  $[\text{CO}_2]$ , se obtuvo un incremento importante de la acumulación para los tres virus (Del Toro *et al.*, 2015). En plantas de tabaco sometidas a concentraciones de  $\text{CO}_2$  de 1000 ppm, las infecciones por PVY muestran, también, una disminución en la acumulación viral y de compuestos fenólicos asociados a la dispersión sistémica del virus (Matros *et al.*, 2006). En contraposición, la infección con BYDV (de *Barley yellow dwarf luteovirus*) en trigo, en concentraciones de 650 ppm de  $\text{CO}_2$ , da como resultado un incremento en la acumulación del virus que no parece estar relacionado con el aumento en la producción de biomasa observado; en este caso, los síntomas de la infección no son más graves que los de las plantas infectadas en condiciones habituales de  $[\text{CO}_2]$  (Trebicki *et al.*, 2015).

En los patosistemas analizados, el crecimiento a altas  $[\text{CO}_2]$  conduce habitualmente a una mayor producción de biomasa, pero los

efectos de este gas sobre la infección son dispares, y en el futuro, serán necesarios análisis pormenorizados de más casos hasta obtener una imagen completa del fenómeno. No existe hasta la fecha ningún estudio sobre el efecto del CO<sub>2</sub> en el resultado de las infecciones mixtas de virus (Jones, 2016), a excepción del analizado en el presente trabajo de tesis.

### **1.5.3. La tolerancia a la sequía. Control hormonal y metabolitos**

La sequía, en relación a la planta, supone una situación de estrés debida a una disminución en la disponibilidad de agua en el suelo, que se puede definir en términos físico-químicos como una reducción en el potencial hídrico, o  $\psi_w$  (Verslues *et al.*, 2006). Este factor es común a otros tipos de estreses, como el osmótico o la congelación. Una disminución de  $\psi_w$  implica un menor valor de la energía libre del agua, lo que hace más difícil su captación por la planta, ya que el movimiento del agua se produce desde zonas en las que esta presenta mayor potencial  $\psi_w$  hacia zonas de menor potencial (Kramer y Boyer, 1995). Ante esta situación las plantas ponen en marcha una serie de mecanismos que se desarrollan en tres etapas. En primer lugar, se ponen en marcha los mecanismos de evitación del estrés, destinados a mantener el balance hídrico evitando la pérdida de agua a través de los tejidos de la planta, y favoreciendo la toma de la misma, de forma que no se alteren los valores de  $\psi_w$  de los tejidos vegetales. En segundo lugar, cuando este balance no se puede mantener, se ponen en marcha mecanismos de evitación de la deshidratación, cuya misión es reducir los valores de  $\psi_w$  de la planta por debajo de los del suelo, garantizando así el flujo de agua y evitando la deshidratación. En tercer lugar, si los mecanismos anteriores no funcionan, y efectivamente los tejidos vegetales experimentan una pérdida de agua, se activan los mecanismos de tolerancia a la deshidratación, cuya misión es evitar o reducir los daños derivados de la falta de agua en el tejido (Levitt, 1972; Verslues *et al.*, 2006).

La evitación del estrés hídrico se consigue, generalmente, a través de la modificación de la arquitectura radicular, incrementando su superficie, así como mediante el cierre estomático. La evitación de la

deshidratación se lleva a cabo mediante la acumulación de solutos compatibles en la célula, o a través de un incremento en la elasticidad de la pared celular, lo que redundaría en una disminución de la presión sobre el protoplasto que contribuye, junto con la acumulación de solutos, a la bajada del  $\psi_w$  del interior de la célula. Finalmente, los mecanismos de tolerancia a la deshidratación son variados, e implican cambios en el metabolismo destinados a generar metabolitos anti-ROS y protectores de componentes celulares, enzimas antioxidantes, proteínas con función chaperona (entre ellas HSPs) y proteínas protectoras de membrana y ácidos nucleicos (Levitt, 1972; Bartels y Sunkar, 2005; Verslues *et al.*, 2006). Aunque esta clasificación es útil, cabe destacar que existe un solapamiento de respuestas, y que no necesariamente todas ellas se suceden en progresión perfectamente lineal ni se encuadran en una única de las etapas (Verslues *et al.*, 2006).

Una de los mecanismos más importantes que las plantas ponen en marcha para paliar el estrés hídrico consiste en el cierre estomático, pues es a través de estas estructuras por donde se produce la pérdida de hasta el 90% del agua por transpiración (Xu *et al.*, 2010). Sin embargo, este cierre conduce a una reducción en la cantidad de CO<sub>2</sub> disponible para la fotosíntesis y a una represión del aparato fotosintético, lo que conlleva una disminución del crecimiento y un aumento de la fotooxidación, que incrementa enormemente la cantidad de ROS en la célula (Osakabe *et al.*, 2014). El ABA es la hormona central reguladora de las respuestas a estreses abióticos, y participa de una forma u otra en la activación de todos los mecanismos que se han mencionado más arriba, entre ellas el cierre de estomas (Fujita *et al.*, 2006; Verslues *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007). En una situación de estrés hídrico, algunas enzimas clave de la biosíntesis del ABA se inducen de forma específica en el tejido vascular, donde se acumula esta hormona (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013; Osakabe *et al.*, 2014). En las raíces, la ausencia de agua también estimula la producción de ABA, el cual es conducido hasta los tallos y las hojas, donde regula el comportamiento de los estomas, haciendo las veces de señal de estrés (Xu *et al.*, 2010). El ABA acumulado en el tejido vascular pasa a las células guarda del estoma por difusión pasiva, cuando se producen cambios de pH inducidos por la deshidratación, y a través de

transportadores específicos. En el interior de la célula guarda, el ABA estimula la producción de ROS, lo que activa la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol desde reservorios intracelulares. El incremento de la concentración citosólica de este catión activa a su vez a toda una serie de canales que median la salida de varios aniones (de  $\text{Cl}^-$ , malato<sup>2-</sup>,  $\text{NO}_3^-$ , etc.) hacia el apoplasto. Esto último produce una despolarización de la membrana celular, lo que a su vez activa a canales de  $\text{K}^+$  que median la salida de este catión, e inactiva a los canales que regulan su entrada, ocasionando una pérdida de turgencia en la célula guarda y el cierre del estoma (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013; Osakabe *et al.*, 2014).

En la apertura y cierre de estomas juegan un papel fundamental otras fitohormonas. El JA activa la producción de ROS y  $\cdot\text{NO}$  en la célula guarda, lo cual induce la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol debido a la entrada del catión desde el apoplasto y a su liberación desde depósitos intracelulares. La señal de calcio vuelve a desembocar en la despolarización de la membrana y en el cierre del estoma, en una secuencia de sucesos equivalente a la que se produce bajo la activación de la señalización por ABA (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013). El SA también promueve el cierre estomático a través de la generación y acumulación de ROS en los estomas (Miura *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015). En consonancia con esto último, los mutantes de *A. thaliana* en la enzima SIZ-1 (de *SIZ-type small ubiquitin-related modifier E3 ligase*), que acumulan más SA (Lee *et al.*, 2007), presentan una mayor generación de ROS y una disminución de la apertura estomática, lo que correlaciona con una mayor tolerancia a la sequía. Por el contrario, los mutantes dobles *siz-1/NahG* pierden el fenotipo de resistencia a la deshidratación característico de los mutantes sencillos *siz-1*, debido a la degradación del SA por la expresión del gen *NahG*, y el consiguiente aumento de la apertura estomática (Miura *et al.*, 2013). SA y ABA inducen la acumulación de ROS a través de dos rutas diferentes: el SA activa la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  a través de peroxidasas, mientras que el ABA estimula la generación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  principalmente a través de NADPH oxidasas (Miura *et al.*, 2013; Okuma *et al.*, 2014). Otros mutantes de *A. thaliana* que acumulan SA en cantidades superiores a la planta silvestre también exhiben este comportamiento de tolerancia incrementada a la

deshidratación, derivado igualmente del cierre estomático. Además, estos mutantes sobreexpresan de forma constitutiva genes de respuesta a la sequía, como dehidrinas, oxidasa alternativa y enzimas metabolizadoras de ROS, los cuales también podrían ser responsables de la mayor tolerancia a la sequía inducida por SA (Okuma *et al.*, 2014).

Aunque el ABA y el SA intervienen en el cierre estomático a través de la producción de ROS, ambas hormonas suelen mostrar un comportamiento antagónico en otros ámbitos (Fujita *et al.*, 2006; Bari y Jones, 2009). Así, el tratamiento con ABA puede suprimir la inducción de la SAR en el estrés biótico, la cual es dependiente de SA. La señalización por ABA inhibe la ruta del SA aguas abajo y aguas arriba de esta hormona, incluidas enzimas de biosíntesis de SA como la ICS1 (de *isochorismate synthase-1*), codificada por el gen *SID2* (de *SA induction-deficient 2*, mutante *sid2*). La acción antagónica que el ABA ejerce sobre la señalización por SA se realiza de forma independiente del JA y de otras hormonas. El SA, a su vez, inhibe la expresión de genes de biosíntesis y de respuesta a ABA durante la SAR (Yasuda *et al.*, 2008).

Junto con el cierre estomático, uno de los principales mecanismos de tolerancia a la deshidratación consiste en la acumulación de metabolitos compatibles, los cuales disminuyen el  $\psi_w$  y actúan como antioxidantes o estabilizadores de estructuras subcelulares y proteínas sin interferir de forma notable en el metabolismo celular (Verslues *et al.*, 2006). Diversos estudios fisiológicos, en distintas plantas, muestran como azúcares no estructurales, alcoholes de azúcares, aminoácidos y aminas o poliaminas presentan actividad osmoprotectora frente al estrés hídrico (Seki *et al.*, 2007).

Los azúcares y sus derivados actúan como protectores osmóticos, antioxidantes y estabilizadores de macromoléculas. Muchos de estos azúcares también pueden proteger a estructuras como la membrana celular durante la desecación, a través de la formación de cristales, interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana e impidiendo la fusión de las mismas (Bartels y Sunkar, 2005). Los azúcares y sus derivados más relevantes en la tolerancia a estrés hídrico son la sacarosa, la fructosa, la trehalosa, el sorbitol, el manitol, el

galactinol, y oligosacáridos y polisacáridos de la familia de la fructosa (fructanos) y de la rafinosa (Seki *et al.*, 2007). Los fructanos también desempeñan funciones relevantes en la estabilización de membranas durante el estrés hídrico. La acumulación de galactinol y rafinosa también conduce a una mayor tolerancia a la deshidratación, a través de una reducción de la transpiración durante este estrés; de hecho, una de las enzimas de biosíntesis del galactinol, la galactinol sintasa 2, o GolS2 (de *Galactinol synthase 2*), se ha caracterizado como una proteína inducible bajo estrés hídrico (Taji *et al.*, 2002).

La prolina (Pro), es clave en la tolerancia a la sequía. Desempeña un papel multifuncional, y se ha analizado su participación en el ajuste osmótico del  $\psi_w$ , en la estabilización de membranas, en la desactivación de radicales libres, y en la señalización del estrés haciendo las veces de molécula mensajera. Su acumulación tiene lugar en el citosol, donde además de actuar a modo de chaperona, garantizando la estabilidad de las proteínas, también tampona el pH (Hayat *et al.*, 2012). Se ha encontrado una fuerte correlación entre la acumulación de Pro y la resistencia a la deshidratación, de modo que mutantes de *A. thaliana* deficientes en la síntesis de Pro son especialmente susceptibles a este estrés (Seki *et al.*, 2007). En numerosas plantas, la acumulación de Pro va ligada a la activación de la ruta de señalización por ABA (Verslues y Zhu, 2005; Hayat *et al.*, 2012). El SA también regula positivamente la síntesis de Pro durante numerosos estreses abióticos, incluido el estrés por sequía (Khan *et al.*, 2015).

Las poliaminas, pequeñas moléculas policatiónicas, están implicadas en la tolerancia a numerosos estreses abióticos. Entre estos compuestos destacan la putrescina (Put), la espermidina y la espermina (Seki *et al.*, 2007). Los niveles de estas tres poliaminas cambian enormemente ante situaciones de estreses ambientales, e intervienen en la adquisición de tolerancia actuando a modo de moléculas desactivadoras de radicales libres, como solutos compatibles moduladores del valor del  $\psi_w$ , y como reguladores de canales de  $K^+$  en los estomas (Alet *et al.*, 2011). En referencia a esto último, la Put podría tener papeles relevantes en la modulación de la conductividad estomática, pues las plantas de *A. thaliana* que sobreacumulan este

compuesto presentan menores niveles de transpiración y una tolerancia incrementada a la deshidratación (Alcázar *et al.*, 2010). La Put puede obtenerse de forma indirecta a través de la arginina, gracias a la acción de enzimas arginina descarboxilasa (ADC, de *Arginine decarboxilase*), vía agmatina. En *A. thaliana* existen dos ADCs, ADC1 y ADC2; ADC1 se expresa principalmente en raíces y hojas en situaciones de estrés por congelación, mientras que la sacarosa, la luz y el etileno actúan como reguladores clave de la expresión de ADC2; esta última, además, es inducible bajo estreses osmóticos y por sequía, lo que conduce a una elevada acumulación de Put bajo estas situaciones (Alcázar *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007; Alet *et al.*, 2011). Además, en mutantes de *A. thaliana* deficientes en ABA, como *A. thaliana aba2* (afectado en uno de los pasos de la biosíntesis de esta hormona), la inducción de ADC2 por sequía se encuentra impedida, así como la acumulación de Put, lo que sugiere que el ABA modula el metabolismo de la Put durante el estrés hídrico (Alcázar *et al.*, 2006). La expresión de ADC1 y ADC2 también puede ser modulada por la propia infección vírica, pues la expresión de estos dos genes, así como los niveles de Put, se ven incrementados en *A. thaliana* infectada con TRV (Fernández-Calvino *et al.*, 2014).

En las plantas, algunos aspectos clave de su fisiología están regulados a través de miRNAs, en cuyo procesamiento y función, como se comentó más arriba, interviene AGO1. AGO1, su miRNA regulador miR168, y la hormona ABA están ligados en la respuesta a la deshidratación. AGO1 y miR168 incrementan sus niveles de expresión en respuesta al tratamiento con ABA y al estrés por sequía, por tanto estos dos factores modulan el nivel de AGO1 a nivel transcripcional (nivel de mRNA de AGO1) y a nivel post-transcripcional (procesamiento del mRNA de AGO1 por el miR168). Los mutantes de *A. thaliana* que sobreexpresan miR168 y que por tanto acumulan menos AGO1, o los mutantes *A. thaliana ago1*, que no expresan AGO1, presentan hipersensibilidad al ABA y una tolerancia incrementada a la sequía (Li *et al.*, 2012), a través de mecanismos que parecen operar a través de modificaciones fisiológicas de la raíz (Westwood *et al.*, 2013).

#### 1.5.4. La interacción planta-virus y la tolerancia a la sequía

En la naturaleza, las plantas se encuentran expuestas habitualmente a situaciones de estreses bióticos y abióticos, que ocurren de forma simultánea. El estrés desencadena en la planta la puesta en marcha de mecanismos de tolerancia, algunos de ellos específicos de estrés, mientras que otros son comunes a muchos de ellos. Es posible, por tanto, que los cambios en la fisiología de la planta inducidos por un estrés incrementen la tolerancia a otro estrés sobrevenido. También es plausible que la ocurrencia simultánea de varios estreses pueda desencadenar una serie de respuestas que no se puedan extrapolar directamente a partir del estudio de los estreses individuales. Además, que la planta tolere determinados estreses de forma independiente no implica que esta sea capaz de tolerarlos cuando ocurren simultáneamente (Prasch y Sonnewald, 2013; Ramegowda y Senthil-Kumar, 2015).

Una combinación habitual de estreses se da en plantas infectadas por un patógeno en las que sobrevienen períodos de escasez de agua, esto es, un estrés biótico junto con estrés hídrico. La infección conlleva la activación de respuestas defensivas en las que hormonas tales como el SA y el JA juegan un papel fundamental, como se ha detallado más arriba, modulando, entre otros aspectos, el estado redox de la planta o la señalización por ABA. De este modo, las plantas infectadas y sometidas a privación de agua podrían mostrar una susceptibilidad incrementada al estrés hídrico, derivada, por ejemplo, del exceso de acumulación de ROS por ambos estreses, o de cambios en la sensibilidad a la señalización por ABA, fruto de las interferencias que ejercen las rutas del SA y JA sobre esta hormona. Además, las plantas infectadas también podrían mostrar una tolerancia incrementada al estrés hídrico, debida a la acumulación de metabolitos inducida por la infección, o a un manejo más eficiente del estrés oxidativo que se produce por la falta de agua, a través de mecanismos de desactivación de radicales libres establecidos previamente durante el estrés biótico (Ramegowda y Senthil-Kumar, 2015).

En estudios realizados sobre maíz infectado con MDMV (de *Maiize dwarf mosaic potyvirus*), y sometido a estrés hídrico, se observa una reducción importante en el crecimiento y rendimiento obtenidos, en

relación a las plantas analizadas bajo cada uno de los estreses por separado (Olson, 1990). Estos resultados sugieren un efecto aditivo y perjudicial de ambos estreses. En cambio, en otro estudio realizado sobre varias especies vegetales, entre ellas el hospedador experimental *N. benthamiana*, y hospedadores de interés agronómico tales como arroz, pimiento, melón, calabaza o remolacha, se ha observado una mayor tolerancia a la sequía cuando las plantas están infectadas con distintos tipos de virus de RNA, como BMV (de *Brome mosaic bromovirus*), CMV, TMV o TRV. Así, estas plantas infectadas tardan varios días más que las sanas en mostrar síntomas asociados a la deshidratación, como son la pérdida de turgencia y el marchitamiento. Además, también se observa un menor nivel de transpiración en las plantas de remolacha infectadas con CMV, seguramente debido al cierre estomático inducido por la infección. El análisis metabólico de plantas de arroz infectadas con BMV, y de remolacha infectada con CMV, antes y después del estrés hídrico, y en relación a los controles no infectados, pone de manifiesto una elevada acumulación de varios metabolitos, muchos de los cuales se han caracterizado como antioxidantes y osmoprotectores, entre los que destacan la trehalosa, la Pro y la Put, además de la hormona SA. Estos resultados sugieren que la infección vírica incrementa en la planta la tolerancia a la deshidratación a través de su aclimatación previa, como consecuencia del estrés fisiológico derivado de la infección inicial, que queda reflejado en la acumulación de metabolitos protectores (Xu *et al.*, 2008).

Frente a la defensa antiviral basada en sRNAs, los virus de planta expresan VSRs. Estos factores interfieren también con la regulación endógena de la planta, lo cual puede afectar a procesos tales como la tolerancia a estreses. De este modo, el incremento en la tolerancia a la deshidratación que experimenta *A. thaliana* infectada con CMV se ha relacionado con el VSR de este virus, 2b. Coherente con este hecho son dos observaciones: *A. thaliana* infectada con mutantes de CMV sin este VSR (CMV $\Delta$ 2b) no muestran tolerancia a la deshidratación, y las plantas transgénicas *A. thaliana* que expresan 2b, por el contrario, sí que presentan una mayor tolerancia a este estrés. La expresión de este 2b interfiere en la señalización por ABA, y conlleva incrementos en la

transpiración y en el tamaño y número de raíces. 2b ejerce su actividad supresora a nivel de AGO1, pero su papel en la tolerancia al estrés por deshidratación parece independiente de su actividad supresora, y aunque module la ruta de respuesta a ABA, parece que no tiene efectos sobre la señalización ABA-miR168-AGO1 (Westwood *et al.*, 2013).



## 2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN





-Aunque la necrosis sistémica (SN) asociada al sinergismo PVX (*Potato virus X*)-potyvirus en *Nicotiana* spp. se ha caracterizado con cierto detalle, todavía se desconoce qué factor vírico es el responsable último en la inducción de esta respuesta, y cuáles son los mecanismos moleculares que subyacen a la misma.

-La concentración de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) y la temperatura (T), son dos factores ambientales que influyen en la interacción planta-virus. Dadas las tendencias actuales de aumento de ambos factores a nivel global, es posible prever alteraciones futuras en las interacciones planta-virus, cuyas implicaciones en la manifestación de síntomas son, en su mayor parte, desconocidas. Ningún estudio al respecto se ha realizado en el caso concreto de las infecciones virales sinérgicas y la SN.

-Algunos estudios sugieren que la situación de estrés producida en las plantas por las infecciones víricas induce algún grado de adaptación a estreses abióticos, como por ejemplo a la sequía, aunque las bases fisiológicas, metabólicas y hormonales exactas de esta tolerancia incrementada se desconocen en su mayor parte. Debido al cambio climático, las predicciones contemplan un incremento en los episodios naturales extremos con efectos perniciosos para los cultivos, lo que incluye, entre otros, sequías frecuentes en numerosas regiones del planeta.

Teniendo todo ello en cuenta, se ha considerado conveniente establecer los siguientes tres objetivos básicos para el presente trabajo de tesis:

1. Identificación del factor o factores víricos implicados en la inducción de uno de los síntomas más graves en patología vegetal, como es la respuesta de SN asociada al sinergismo PVX-potyvirus en *N. benthamiana* (Capítulo 4).

2. Análisis del efecto de alteraciones en condiciones ambientales ligadas al cambio climático, como son incrementos de T o de [CO<sub>2</sub>], en la manifestación de síntomas asociados a la infección con PVX, PPV (*Plum pox potyvirus*), o con el par sinérgico PVX-PPV en *N. benthamiana* (Capítulo 5).

**3.** Estudio del efecto de las infecciones víricas en la respuesta de la planta a un estrés abiótico, como es la sequía, empleando como modelos a *N. benthamiana* y *A. thaliana* infectadas con PVX, PPV, PVX-PPV, o con quimeras obtenidas a partir de ambos virus. Análisis de los cambios metabólicos, fisiológicos y hormonales sobre los que se sustenta el incremento de la tolerancia a la sequía en plantas infectadas (Capítulo 6).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---





### 3.1. MATERIAL VEGETAL, AGROINFILTRACIÓN Y AGROINOCULACIÓN

En esta tesis se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana* silvestres, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 (Columbia). La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* empleada a lo largo de los experimentos fue GV3101.

#### 3.1.1. Cultivo de *N. benthamiana* y *N. tabacum*

Las plantas de *N. benthamiana*, en condiciones normales, crecieron a 25°C, en ciclo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad), a 2500 lux y un 65% de humedad relativa. Como sustrato se empleó una mezcla de tierra:vermiculita en proporción 3:1 v/v. Los tiestos empleados presentan una circunferencia de 8 cm de diámetro y una profundidad de 7 cm. Estas plantas se cultivaron inicialmente en semillero, y a las 3 semanas de edad se transfirieron a tiestos individuales para su crecimiento final, bajo las mismas condiciones. El cultivo de *N. tabacum* se realizó en condiciones equivalentes a las de *N. benthamiana*.

A parte de *N. benthamiana* silvestre, en el presente estudio se empleó una versión transgénica de la misma, *N. benthamiana* NahG, transformada con el gen de la salicilato hidroxilasa bacteriana, que se ha descrito previamente (Ying *et al.*, 2010).

#### 3.1.2. Agroinfiltración de *N. benthamiana* y *N. tabacum*

Para los ensayos de expresión transitoria de proteínas (ensayos de parches en hoja, del inglés *patch assay*) o de infecciones con virus, los cultivos correspondientes de *A. tumefaciens* se incubaron hasta alcanzar la etapa de crecimiento exponencial, en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos de selección apropiados, en agitación de 210 rpm y a 28°C, durante 24 h. Una vez saturados, estos cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min y el sedimento de bacterias se resuspendió en medio de agroinfiltración, constituido por 10 mM MES (ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico pH 5,6), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 150 µM de

acetosiringona (Tenllado y Díaz-Ruíz, 2001). La D.O final alcanzada dependió del tipo de experimento; así, para los ensayos de expresión transitoria de proteínas se fijó una D.O<sub>600</sub> (densidad óptica a 600 nm) final de 0,6, mientras que para las infecciones víricas la D.O<sub>600</sub> final fue de 0,3, para cada cultivo resuspendido. De este modo, para la agroinfiltración de combinaciones de proteínas o de virus se realizaron mezclas 1:1 v/v de las disoluciones de agrobacteria correspondientes. Las disoluciones finales se infiltraron a través del envés de *N. benthamiana*, presionando con una jeringa de 1 mL sin punta, y consiguiendo parches de unos 2 cm de diámetro. Para los experimentos de expresión transitoria de proteínas se emplearon plantas de porte adulto (8-10 hojas), pero siempre en etapas previas a la floración. En los experimentos de infección, por el contrario, se emplearon plantas con un grado de desarrollo de 4-6 hojas. La agroinfiltración de *N. tabacum* se realizó siguiendo las mismas especificaciones que para *N. benthamiana*.

### 3.1.3. Cultivo *in vitro* de *A. thaliana*

Para *A. thaliana*, aparte de la forma Col-0 silvestre, se emplearon las siguientes líneas transgénicas y los siguientes mutantes, los cuales se han descrito previamente: *aba2-1* (Rook *et al.*, 2001), NahG (Lawton *et al.*, 1995), *sid2-2* (Wildermuth *et al.*, 2001) y *coi1-1* (Feys *et al.*, 1994), todos ellos derivados también del ecotipo Col-0.

En primer lugar, *A. thaliana* se cultivó en placa con el objetivo de inocularla con los virus pertinentes antes de su traspaso a tierra. Para el cultivo *in vitro*, se esterilizó en primer lugar la superficie de las semillas, y posteriormente se sembraron en placas con medio MS (de *Murashige and Skoog medium*) consistente en 4,4 g/L de sales MS (Duchefa Biochemie) suplementado con un 0,7% w/v de sacarosa, y solidificado con 1% de Bacto Agar (Difco). Una vez preparadas, las placas se sellaron con cinta permeable al intercambio gaseoso (Millipore), y se mantuvieron a 4°C y oscuridad durante 3 días (estratificación), transcurridos los cuales se pasaron a crecer en cámaras de cultivo a 21°C, bajo condiciones de día largo (16h luz/8h oscuridad).

Para los mutantes *coi1-1*, los homocigotos recesivos se seleccionaron a partir de semillas derivadas de la autofecundación de parentales heterocigotos. Esta selección se realizó en base a las deferencias de sensibilidad al metil-jasmonato de la descendencia cuando crecieron en estas mismas placas MS suplementadas con 50  $\mu$ M de metil-jasmonato (MeJA). De este modo, las plántulas heterocigotas y las silvestres presentan un desarrollo disminuido en estas condiciones, mientras que las homocigotas *coi1-1* pueden crecer aun en presencia de MeJA.

#### **3.1.4. Agroinoculación *in vitro* de *A. thaliana***

La inoculación de *A. thaliana* con los virus se realizó en la propia placa de cultivo, a los 14 días tras la germinación. Para esta agroinoculación *in vitro*, los cultivos de *A. tumefaciens* correspondientes se crecieron en condiciones equivalentes a las que se comentaron para *N. benthamiana* (punto 3.1.2), y el sedimento de bacterias se resuspendió en medio de agroinfiltración hasta conseguir una D.O<sub>600</sub> final de 1,5. Con estas disoluciones se impregnaron palillos mondadientes que se utilizaron para punzar dos hojas por plántula, tras lo cual se dejaron crecer en placa bajo las mismas condiciones.

#### **3.1.5. Cultivo de *A. thaliana***

A distintos intervalos de tiempo, de 6 u 11 días tras la agroinoculación (días post-agroinoculación, dpa), las plantas se transfirieron a tiestos para su crecimiento final, permaneciendo un número de días variable cubiertas por una bolsa de plástico, la cual se abrió gradualmente hasta dejar a las plantas creciendo bajo las condiciones finales de cada experimento. *A. thaliana*, en condiciones normales, se cultivó a 21°C, en ciclo de día largo (16 h luz/8 h oscuridad), a 17000 lux y un 65% de humedad relativa. Como sustrato se empleó una mezcla de tierra:vermiculita en proporción 3:1 v/v. Los tiestos empleados presentan una circunferencia de 5 cm de diámetro y una profundidad de otros 5 cm.

### **3.1.6. Cultivo y agroinfiltración/agroinoculación de *N. benthamiana* y *A. thaliana* bajo condiciones alteradas, asociadas al cambio climático**

En la presente tesis, *N. benthamiana* se ha crecido bajo tres condiciones ambientales alteradas distintas:

-Para los experimentos en alta concentración de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]), *N. benthamiana* se creció en cámaras de cultivo (SANYO Electronic Co.) con atmósferas suplementadas con este gas, hasta las 970 ppm. Las plantas se sometieron a estas condiciones una semana antes de la agroinfiltración con el objetivo de conseguir su aclimatación. Como controles, se mantuvieron plantas a la [CO<sub>2</sub>] de referencia de 401 ppm.

-Para los experimentos en alta o en baja temperatura (T), *N. benthamiana* se creció en cámaras de cultivo (SANYO Electronic Co.) a 30°C (en experimentos de infección viral) y a 16°C o 32°C (en experimentos de expresión transitoria de proteínas). Las plantas se sometieron a estas condiciones una semana antes de la agroinfiltración con el objetivo de conseguir su aclimatación. Como controles, se mantuvieron plantas a la T de referencia de 25°C (T estándar). Para los experimentos de agroinfiltración a elevada T (30 y 32°C), se requiere una ventana de un mínimo de 24 h para conseguir la transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* a la planta, ya que este proceso es ineficaz a T superiores a 28°C (Del Toro *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se determinó como tiempo óptimo una ventana de 48h para lograr una acumulación de proteína equivalente entre alta T y la conseguida a los 25°C de referencia. Por ello, una vez agroinfiltradas, las plantas se mantuvieron 48 h a 25°C, transcurridos los cuales se devolvieron a las cámaras con alta T.

-Para los experimentos de estrés por sequía, *N. benthamiana* se infectó con los virus pertinentes mediante agroinfiltración. Posteriormente, a 10 días tras la agroinfiltración (10 días post-agroinfiltración, 10 dpa) las plantas se mantuvieron con agua en las bandejas durante 3 h, con el objetivo de saturar los tiestos y homogeneizar de este modo el contenido en agua del sustrato. Tras este tiempo, se eliminó por completo el agua y estas plantas no se volvieron a

regar. Como controles, se mantuvieron plantas con el riego habitual. Los análisis de contenido (%) en agua y de eficacia biológica se realizaron sobre estas plantas a distintos días tras la retirada del riego (días post-riego, o dpr).

En esta tesis, *A. thaliana* también se ha crecido bajo condiciones de estrés por sequía. En los experimentos de determinación de tolerancia a este estrés, a los 16 dpa, se retiró la bolsa de plástico que cubría a las plantas que habían sido transferidas a tierra cinco días antes (a 11 dpa), y se mantuvieron en riego por saturación durante 3 h, añadiendo agua en la bandeja hasta conseguir la completa homogenización de la humedad del sustrato en todos los tiestos. Tras este tiempo se eliminó el agua por completo de las bandejas y estas plantas no se volvieron a regar. Como controles, se mantuvieron plantas con el riego habitual. También, los análisis de contenido (%) en agua y de eficacia biológica se realizaron sobre estas plantas a distintos dpr.

Con el objetivo de minimizar la variabilidad entre los distintos experimentos, así como entre sus repeticiones, las plantas control no infectadas (pero agroinfiltradas o agroinoculadas con GUS) y las infectadas se crecieron en las mismas bandejas una vez se homogeneizó el contenido en agua de los tiestos, y tras haber eliminado toda el agua. De forma periódica y aleatoria se cambió la posición que ocupaban las plantas en la bandeja, así como las posiciones de estas bandejas dentro de las cámaras de cultivo. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces y se emplearon un mínimo de 12 plantas de *N. benthamiana*, o de 15 plantas de *A. thaliana*, por repetición.

### 3.2. CONSTRUCCIONES DE VECTORES BINARIOS

En el presente trabajo, en *N. benthamiana* se expresaron de forma transitoria los siguientes factores virales: PPV HC (*Helper component proteinase* de *Plum pox potyvirus*); PPV HCLH (o HCL<sub>134</sub>H), una forma mutada de HC sin actividad supresora del silenciamiento (González-Jara *et al.*, 2005); TEV HC (*Helper component proteinase* de *Tobacco etch potyvirus*) (Goytia *et al.*, 2006); TBSV P19 (P19 de *Tomato bushy stunt tombusvirus*)

(Uhrig *et al.*, 2004); P1 de PVY (P1 del potyvirus *Potato virus Y*) (Tena Fernández *et al.*, 2013); CMV 2b (2b de *Cucumber mosaic cucumovirus*) (Canto *et al.*, 2002); y CTV P23 (P23 de *Citrus tristeza closterovirus*) (Fagoaga *et al.*, 2006); la amplificación por PCR y la clonación de todos estos factores en vectores binarios de *A. tumefaciens* ha sido descrita previamente. Como proteína de referencia sin efectos notables sobre la acumulación de otras proteínas, o sobre la aparición de necrosis, se empleó a la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), cuya secuencia se clonó en pCAMBIA 1305.1 y se transformó en *A. tumefaciens*.

La proteína BiP de *N. benthamiana* (NbBiP4, o NbBLP4, FJ463755.1) se obtuvo a partir de la retrotranscripción (RT) con oligonucleótido de poliT realizada sobre RNA total de *N. benthamiana*, con el kit de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen). Esta RT se empleó como sustrato para una PCR posterior realizada con cebadores que contenían en sus extremos 5' las secuencias de recombinación attB1 y attB2; estos cebadores se denominaron directo attB1 BiP y reverso attB2 BiP (**TABLA 1**). El producto de PCR se clonó en un plásmido pDONR207 a través de un proceso de recombinación bajo la acción de la clonasa II BP (Gateway Technology; Invitrogen). La secuencia de BiP se transfirió posteriormente desde el pDONR207 original hasta el vector binario de destino pGWB14, a través de una reacción de recombinación asistida por la clonasa II LR (Invitrogen). Una vez obtenido pGWB14 con el inserto correspondiente, se transformó *A. tumefaciens* con él. Este vector de destino pGWB14 permite expresar BiP fusionada en su extremo C-terminal a un epítipo de hemaglutinina (HA). Todas las clonaciones se realizaron con la DNA polimerasa Phusion (Finnzymes), confirmándose la fidelidad de la amplificación mediante secuenciación de los clones.

En los ensayos de coagroinfiltración en los que la proteína GFP formó parte, se empleó la GFP T65S, expresada a partir de un vector pCAMBIA2300 (Haseloff *et al.*, 1997).

### 3.2.1. Clonaciones de P25

La región codificante completa de P25 se amplificó por PCR a partir de pP2C2S-402, un clon de cDNA de PVX derivado de pP2C2S (Baulcombe *et al.*, 1995). Para esta amplificación se emplearon los oligonucleótidos directo P25NcoI y reverso P25XmaI (**TABLA 1**). El fragmento resultante de la PCR realizada con estos cebadores se clonó en el vector pRTL2 (Restrepo *et al.*, 1990) abierto previamente con NcoI y XmaI. El casete de expresión de pRTL2, ya con la secuencia de P25, se aisló mediante digestión con PstI y se insertó en un vector de transformación apto para la expresión de proteínas en plantas, como es pCAMBIA2300, originando el plásmido final pCAM-P25, con el cual se transformó *A. tumefaciens*.

La versión silvestre de P25 marcada con el epítipo T7 (P25-T7), o las formas mutantes de esta misma P25-T7, se obtuvieron a través de PCRs realizadas con pCAM-P25 como sustrato y con cebadores que incluían la secuencia de este T7 en el extremo C-terminal de la secuencia codificante de P25. Estos cebadores fueron: directo P25NcoI y reverso P25T7XmaI (**TABLA 1**). Las sustituciones aminoacídicas A104V, T117A y K124E, y un codón de parada prematuro en posición 18 (P25Stop), se introdujeron separadamente en la secuencia codificante de P25 mediante dos PCRs consecutivas (Higuchi *et al.*, 1988), utilizando como molde pCAM-P25, el cebador directo P25NcoI, el cebador reverso P25T7XmaI, y dos cebadores específicos para cada forma mutante, de acuerdo a las secuencias de los mutantes que han sido descritas previamente (Bayne *et al.*, 2005). Brevemente, cada producto de PCR se clonó en vectores pRTL2 previamente digeridos con NcoI/XmaI, y posteriormente se transfirieron a vectores pCAMBIA2300 digeridos con PstI. La presencia de las sustituciones nucleotídicas adecuadas se confirmó mediante secuenciación. Todas las PCRs para estas clonaciones se realizaron con la DNA polimerasa Phusion (Finnzymes) y con los plásmidos finales se transformó *A. tumefaciens*.

### 3.2.2. Clonaciones de virus y quimeras

El vector binario pGR107, que contiene la secuencia infectiva de PVX en forma de cDNA, fue cedido por el Dr. D.C. Baulcombe (University of Cambridge, UK). El mutante de PVX delecionado en P25 (PVX $\Delta$ P25) se obtuvo tras digerir el vector pGR107 con ApaI (en posición 4945 de PVX) y tratar los extremos originados con el fragmento Klenow, procediendo finalmente a su religación. Este mutante PVX $\Delta$ P25 expresa una forma de P25 no funcional, que carece de los 73 aminoácidos del extremo C-terminal.

El clon infectivo de cDNA correspondiente a PVX con el factor HC de PPV (pPVX-HC), con este último factor bajo el control del promotor duplicado de la proteína de la cápsida (CP), ha sido descrito previamente (González-Jara *et al.*, 2005). Este PVX-HC se amplificó por PCR a partir de pPVX-HC, se insertó en pDONR207 y de este se llevó finalmente al vector binario de destino pGWB2 (Nakagawa *et al.*, 2007), a través de la tecnología Gateway que se describió más arriba para NbBiP.

Las secuencias codificantes de P25 y de GFP se clonaron en un vector con la secuencia infectiva de PPV en forma de cDNA, cedido por el Dr. J. A. García (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España). De este modo, se obtuvieron las quimeras PPV-P25 y PPV-GFP, esta última utilizada a modo de quimera control, y referida en adelante simplemente como “PPV”. Las secuencias de P25 y de GFP se amplificaron por PCR con DNA polimerasa Phusion (Finnzymes), P25 a partir del vector pCAM-P25, y GFP a partir del vector pCAMBIA 2300/GFP que ha sido descrito previamente. Los cebadores empleados para P25 fueron directo attB1 P25 y reverso attB2 P25; para GFP fueron directo attB1 GFP y reverso attB2 GFP (**TABLA 1**). Una vez finalizada la PCR, estas secuencias se llevaron a pDONR207, y de ahí al vector binario de destino pGWB<sub>in</sub>PPV-3xHA, a través de la tecnología Gateway. Este vector pGWB<sub>in</sub>PPV-3xHA, derivado de pBinPPV (Alamillo *et al.*, 2006), permite expresar en la planta a P25 y a GFP fusionadas en C-terminal a un epítopo constituido por tres repeticiones de HA. Con los plásmidos finales se transformó *A. tumefaciens*.

### 3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE P25

En los ensayos de evaluación de la actividad supresora del silenciamiento génico de la proteína P25, se coagroinfiltró la proteína reportera GFP (pCAMBIA2300/GFP) con P25-T7 silvestre o con las formas mutantes del mismo (expresadas a partir de pCAMBIA2300). Como control de ausencia de actividad supresora del silenciamiento, se coagroinfiltró GFP con la proteína control GUS (expresada esta última a partir de pCAMBIA1305.1). En estos experimentos, con el objetivo de evitar la variabilidad entre hojas y plantas, para aquellas combinaciones que se pretendían comparar entre sí las agroinfiltraciones se procuraron realizar sobre la misma hoja, en forma de parches separados. Visualmente, la evolución de la acumulación de GFP se siguió empleando iluminación UV de onda larga, para analizar la fluorescencia emitida por esta proteína. Posteriormente, todos los parches de una misma combinación de proteínas, pertenecientes a distintas plantas, se pusieron en común a la hora de realizar el análisis a nivel de proteína (*western blot* de P25 y de GFP) o a nivel de RNA (*northern blot* de GFP). A determinados tiempos, se tomaron imágenes de fenotipos representativos con una cámara Leica DFC 320. Este método básico para analizar la actividad supresora de una proteína, a través del efecto que ejerce sobre la acumulación de otra proteína reportera agroinfiltrada simultáneamente, ha sido descrito previamente (Del Toro *et al.*, 2015).

### 3.4. TRATAMIENTO HORMONAL DE *N. benthamiana* CON ÁCIDO SALICÍLICO (SA)

Para analizar el efecto del SA sobre la necrosis inducida por la proteína P25 en *N. benthamiana*, se trataron estas plantas con una solución de 2 mM SA en agua (Sigma). Este tratamiento se realizó por pulverización diaria, desde el día anterior a la agroinfiltración, sobre las hojas a analizar, hasta los 8 días tras la agroinfiltración.

### 3.5. ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE ELECTROLITOS, ESTRÉS OXIDATIVO Y ACTIVIDAD LIPOXIGENASA EN *N. benthamiana*

#### 3.5.1. Liberación de electrolitos

El daño celular ocasionado por las infecciones virales, o por la necrosis inducida por la proteína P25 de PVX, se cuantificó a través de la medida de la liberación de electrolitos. Para llevar esto a cabo, se tomaron 24 discos de 0,3 cm<sup>2</sup> de tejido sistémico (infección viral, hojas con síntomas evidentes de infección) o de tejido agroinfiltrado (expresión local de proteínas), utilizando un sacabocados. Las hojas se aclararon inicialmente con agua destilada, y los discos obtenidos a partir de ellas se incubaron en 5 mL de agua durante 6 h, en agitación a 150 rpm y a una T estándar de 25°C. A las seis horas se determinó la conductividad del agua de incubación mediante un conductímetro de platino (Crison), lo que constituye la **lectura 1**, que mide de la extensión del daño celular. Después, las muestras se hirvieron durante 20 min a 90°C, transcurridos los cuales los tubos se enfriaron en hielo hasta alcanzar de nuevo la temperatura ambiente, y se midió la conductividad de nuevo. Esta última medición constituye la **lectura 2**, y ofrece una cuantificación de los electrolitos totales de cada muestra. La liberación de electrolitos se determinó como el % de los electrolitos totales de una muestra liberados al medio acuoso durante las 6 h de agitación; matemáticamente:  $100 \times \frac{(\text{Lectura 1} - \text{conductividad del agua})}{(\text{Lectura 2} - \text{conductividad del agua})}$ . Con el objetivo de clarificar la interpretación de los resultados, al % de liberación de electrolitos correspondiente al tratamiento control se le asignó el valor 1, y los valores del resto de los tratamientos se calcularon en relación a este.

#### 3.5.2. Tinción con DAB

Para analizar el estrés oxidativo inducido en *N. benthamiana* en tejido infectado, o en parches agroinfiltrados con las combinaciones de proteínas correspondientes, se empleó tinción histoquímica con DAB

(3,3'-diaminobenzidina). El DAB es sensible a la presencia de  $H_2O_2$ , y en la zona del tejido en la que esta especie reactiva se acumula el DAB origina un precipitado marrón. Para esta tinción se empleó una solución de 1 mg/mL DAB pH 3,8. Una vez preparada, el tejido se sumergió en ella y se infiltró mediante la aplicación de un ligero vacío con bomba, durante unos 5-10 min en función del tamaño del tejido. Posteriormente, se incubó en agitación durante 3 h a temperatura ambiente, transcurridos los cuales se desechó la solución de DAB, y se eliminaron los pigmentos vegetales mediante incubación con etanol 96% a 65°C, en agitación durante 3 h. Una vez blanqueado el tejido, los fenotipos representativos se fotografiaron con cámara Leica DFC 320.

### 3.5.3. Actividad lipoxigenasa (LOX)

Para analizar la actividad LOX, se preparó un extracto de proteínas a partir de tejido agroinfiltrado con las combinaciones de proteínas correspondientes. En concreto, se trituró el tejido en mortero refrigerado con  $N_2$  líquido, y se homogeneizó con 100 mM de tampón fosfato sódico ( $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ ) pH 6,5, en proporción 1 mL de tampón por cada 0,5 g de tejido. La suspensión se centrifugó a 15000x *g* durante 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se determinó su concentración proteica con reactivo Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay kit, Sigma). La actividad lipoxigenasa en este sobrenadante se determinó espectrofotométricamente, monitorizando la formación del hidroperóxido dieno conjugado a través de mediciones de la  $A_{234}$  (absorbancia a 234 nm), utilizando ácido linoleico como sustrato (Sigma). Para ello, se prepararon reacciones consistentes en: 100 mM de tampón fosfato sódico pH 6,5, 0,1 mM de ácido linoleico, 0,6 mM de KCN y extracto de proteína, llevado a un volumen total de reacción de 1 mL. La reacción se llevó a cabo durante 10 min y a 25°C. El KCN se añadió a la reacción con el objetivo de verificar la genuina actividad lipoxigenasa, que es resistente al cianuro. La cantidad de proteína del extracto que se añadió a la reacción se determinó previamente mediante la puesta a punto del ensayo. Esta actividad lipoxigenasa se calculó en nkat/mg de proteína usando para ello un coeficiente de extinción molar

( $\epsilon$ ) de 25000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Sin embargo, para clarificar la interpretación de los resultados, a la actividad LOX de la muestra control se le asignó el valor de 1, y los valores del resto de tratamientos se calcularon en relación a este. El ensayo se realizó con plantas agroinfiltradas y crecidas a 32°C, en vez de a los 25°C habituales, ya que a esta mayor T se observó un incremento de la necrosis que se correlacionó con una actividad LOX más elevada, y con diferencias mucho más claras entre combinaciones de proteínas de las que se observaron a una temperatura más baja.

En general, los resultados mostrados para la liberación de electrolitos y la actividad LOX se corresponden con la media y la desviación estándar de los valores obtenidos en un mínimo de dos experimentos independientes, consistente cada uno en 12 plantas y alrededor de 6 réplicas técnicas; cada una de estas réplicas técnicas se obtuvo a partir de material procedente de 4 plantas distintas del tratamiento correspondiente (esto es, 6 discos de tejido por planta para un tratamiento dado).

### **3.6. ANÁLISIS DE RNA Y PROTEÍNAS**

#### **3.6.1. Extracción, *northern blot* y cuantificación de RNA**

La extracción de RNA total a partir de tejido foliar se realizó utilizando TRIzol (Invitrogen), y ha sido descrito previamente (Pacheco *et al.*, 2012). Para *N. benthamiana*, en plantas infectadas se tomaron muestras de hojas apicales con síntomas en torno a los 6-13 días tras la agroinfiltración, o muestras de tejido local (tejido agroinfiltrado con virus o con mezclas de proteínas) en torno a los 3-6 días tras la agroinfiltración. Para *A. thaliana* se tomaron las hojas no inoculadas de la roseta, justo antes del traspaso a tierra desde placa a los 12-15 días tras la agroinoculación, o bien justo antes de comenzar la exposición al estrés hídrico, ya en tiesto, a los 15 días tras la agroinoculación. Para ambos hospedadores se introdujeron variaciones en la toma de muestra en función de los requerimientos experimentales. Estos datos se reflejan en el apartado de resultados correspondiente.

Para su análisis por *northern blot*, las muestras de RNA se separaron en geles de 1% de agarosa en presencia de 7% formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon Hybond-N (Roche Molecular Biochemicals). Para la detección de los RNAs diana la membrana se hibridó durante toda la noche a una T de 65°C en presencia de sondas marcadas con digoxigenina (DIG-ribosonda) o con <sup>32</sup>P (<sup>32</sup>P-sonda). Como control de carga se tomaron imágenes de los rRNAs teñidos con bromuro de etidio. Para la detección de los RNAs genómico y sugbenómicos de PVX se emplearon DIG-ribosondas de la PVX CP (nucleótidos 5739-6400) (González-Jara *et al.*, 2004); para la detección del mRNA de GFP se emplearon DIG-ribosondas derivadas de GFP (González-Jara *et al.*, 2005). Para la detección del mRNA de la VPE-1 (de *Vacuolar processing enzyme-1*), en *N. benthamiana*, se emplearon <sup>32</sup>P-sondas derivadas de un fragmento de 344 pares de bases (pb), correspondientes a los nucleótidos 229-572 de la proteína homóloga en tabaco, NtVPE-1a (AB075947), obtenidas mediante cebado aleatorio (de *random-priming*). La detección del mRNA de ADC1 (de *Arginine decarboxilase*), en *A. thaliana*, se realizó con <sup>32</sup>P-sondas derivadas de un fragmento de 199 pb, correspondiente a los nucleótidos 2345-2543 de AtADC1 (At2g16500), mediante cebado aleatorio (Fernández-Calvino *et al.*, 2014). Para la detección por *northern blot* de PVX se emplearon 2 µg de RNA total; para la detección de los diversos mRNAs se utilizaron 10-14 µg de RNA total.

La determinación de la acumulación de ácidos nucleicos por PCR cuantitativa, o qRT-PCR (de *Real-time quantitative reverse transcription PCR*), se realizó mediante el método de cuantificación relativa en base a la comparación de valores Ct (de *threshold cycle*) para las secuencias problema, normalizadas respecto a un gen endógeno (control interno) y en relación a una muestra de referencia (calibrador), o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). La aplicación de este método se llevó a cabo tal y como ha sido descrita por García-Marcos y colaboradores (García-Marcos *et al.*, 2013). Como gen endógeno para la normalización, en *N. benthamiana* se empleó 18 rRNA, y en *A. thaliana* se utilizó  $\beta$ -tubulina 5 (TUB5; At1g20010), debido a que sus respectivos niveles de acumulación se mantuvieron equivalentes a todos los tiempos y entre todos los tratamientos ensayados. Para la cuantificación de PVX se emplearon

cebadores que amplifican la región comprendida entre los nucleótidos 2621-2753 (García-Marcos *et al.*, 2013). Para PPV y sus quimeras, se amplificó la región comprendida entre los nucleótidos 4668-4810. El análisis de expresión por qRT-PCR de los genes de *A. thaliana* *PR1* (de *Pathogenesis related 1*) y *RD29B* (de *Responsive to desiccation 29B*) se realizó con los cebadores indicados más abajo (**TABLA 2**). Para clarificar los resultados, a la muestra control se le asignó el valor de 1, y el resto de valores se calcularon en relación a este.

La técnica de RT-PCR semicuantitativa (de *Reverse transcription PCR*) se empleó para el análisis de expresión de la TD (de *Threonine deaminase*) y de la PI-I (de *Proteinase inhibitor I*) en *N. benthamiana* pulverizada con SA, siguiendo el procedimiento establecido previamente por García-Marcos y colaboradores (García-Marcos *et al.*, 2013). La retrotranscripción se realizó sobre 480 ng de RNA puro con el kit de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen), utilizando como cebador un oligonucleótido de poliT. Una vez finalizada, para la PCR con los cebadores específicos se emplearon como sustrato 4 µL del cDNA obtenido previamente. Como control interno se amplificó el gen de la actina. Como control negativo se realizaron PCRs con los cebadores de los genes problemas y del control de actina, en las que se empleó como sustrato RNA sobre el que no se llevó a cabo retrotranscripción alguna. La PCR se detuvo a los ciclos 33, 36 y 39, escogidos porque en ellos el proceso de amplificación aún no se encuentra saturado. Los cebadores utilizados se muestran más abajo (**TABLA 2**).

### 3.6.2. *Western blot*

Cuando fue necesario determinar la acumulación de las distintas proteínas analizadas en el presente trabajo, o cuando se siguió la acumulación viral a través del análisis de alguna de las proteínas del virus, se realizaron *western blots* siguiendo las especificaciones descritas por Tena Fernández y colaboradores (Tena Fernández *et al.*, 2013). El tejido sometido a análisis, bien parches de hoja agroinfiltradas o tejido foliar sistémico, se trituró en mortero refrigerado con N<sub>2</sub> líquido, y

posteriormente se homogeneizó con el tampón de extracción de proteínas (0,1 M de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 0,1 M de LiCl, 1% v/v de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% w/v de SDS), en una proporción de 400  $\mu$ L de tampón por cada 100 mg de tejido. Se tomaron 50  $\mu$ L de este extracto y se mezclaron con 50  $\mu$ L de solución Laemmli 2x (4% w/v de SDS, 2% v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,1 M de Tris-HCl pH 6,8, 0,05% w/v de BPB [Bromophenol Blue, Sigma], 20% v/v de glicerol). Una vez mezcladas con Laemmli, estas muestras se hirvieron a 95°C durante 5 min, y se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 min. Las muestras se analizaron en electroforesis SDS-PAGE, y las proteínas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida del 15% en la mayor parte de los casos. En estos geles se cargaron 16-20  $\mu$ L de muestra para la mayor parte de las proteínas agroinfiltradas, y de 10  $\mu$ L en los casos de GFP y de proteínas víricas, dado la elevada acumulación que mostraron en la planta. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Hybond-P (GE Healthcare Life Sciences), y se tiñeron con Ponceau-S (0,1% w/v Ponceau-S en ácido acético al 5% v/v) para detectar la proteína Rubisco como control de carga. Después de esto, la membrana se lavó en agua destilada y se bloqueó durante 2 h en solución de bloqueo con leche, seguida de la incubación con los anticuerpos primarios a la dilución correspondiente durante toda la noche, a temperatura de 25°C. Para las distintas P25 con el epítipo T7 se emplearon anticuerpos anti-T7 de conejo conjugados con HRP (de *Horseradish peroxidase*) (Novagen) a una dilución 1:5000. Para la identificación de P25-HA o GFP-HA, expresadas a partir de las quimeras PPV-P25 o PPV-GFP, respectivamente, se emplearon anticuerpos monoclonales de rata anti-HA (Roche Molecular Biochemicals), a una dilución 1:10000. PPV HC se detectó mediante anticuerpos policlonales de ratón anti-PPV HC, a una dilución 1:300 (González-Jara *et al.*, 2005). La acumulación de PPV se determinó a través de la acumulación de la CP, empleando anticuerpos policlonales de conejo anti-PPV CP, a una dilución 1:2000 (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Valencia, España). Del mismo modo, la acumulación de PVX se siguió empleando anticuerpos policlonales de conejo anti-PVX CP (Loewe Biochemica GmbH), a una dilución 1:300. La detección de la proteína GFP sin epítipo se realizó utilizando anticuerpos de conejo anti-GFP que reconocen el extremo N-

terminal de esta proteína (Sigma-Aldrich), a una dilución 1:3000. En los casos en los que fue necesario, se emplearon los anticuerpos secundarios pertinentes conjugados con HRP o con AP (de *Alkaline phosphatase*). El revelado con HRP se llevó a cabo por quimioluminiscencia utilizando el sistema ECL (Amersham Biosciences); con AP, la reacción cromogénica que deposita un precipitado coloreado sobre la banda correspondiente se llevó a cabo con el sistema de tabletas SigmaFast™ BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

En aquellos casos en los que se requirió una cuantificación más precisa de la cantidad de proteína, se llevaron a cabo análisis densitométricos sobre las bandas de proteínas obtenidas en los *western blots* anteriores. Para ello, se utilizó el software de dominio público ImageJ (National Institutes of Health website, image processing and analysis in Java).

### **3.7. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS)**

Para los ensayos de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, de *Virus-induced gene silencing*) se emplearon vectores derivados del virus TRV (de *Tobacco rattle tobravirus*), cuyo genoma bipartito se encuentra clonado en los plásmidos pTRV1 (contiene el RNA genómico 1) y pTRV2 (contiene el RNA genómico 2). Este pTRV2 incluye en la secuencia viral un sitio de clonaje múltiple, apto para la inserción de fragmentos de secuencias de los genes que se deseen silenciar (Liu et al., 2002a). Para silenciar RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*) de *N. benthamiana*, se empleó un fragmento de cDNA de unas 366 pb correspondiente a la parte 3' de su secuencia codificante. Este fragmento se amplificó a partir de una muestra de RNA total que se sometió a retrotranscripción con SuperScript II (Invitrogen) y oligonucleótido de polidT, seguida de una PCR con DNA polimerasa Phusion (Finnzymes), utilizando cebadores de RAR1 que se obtuvieron a partir de la secuencia de la proteína homóloga en *N. tabacum* (AF480487). Estos cebadores, NtRAR1 directo y reverso, incorporan dianas de restricción BamHI y XhoI, respectivamente (**TABLA 3**). El fragmento amplificado se digirió

con BamHI y XhoI, y se ligó con un plásmido pTRV2 previamente digerido con las mismas enzimas, para dar lugar a pTRV2:RAR1. Para el silenciamiento por VIGS del factor SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) de *N. benthamiana*, se empleó la construcción pTRV2:SGT1 (Liu *et al.*, 2002b), la cual se obtuvo a través del Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, The Ohio State University). pTRV1, pTRV2 y los derivados de este último se transformaron separadamente en *A. tumefaciens*. La agroinfiltración de estas bacterias se realizó siguiendo las especificaciones comentadas anteriormente (punto 3.1.2) con algunas salvedades. Los sedimentos de bacterias se resuspendieron a una D.O<sub>600</sub> final de 0,4, y partes iguales de la suspensión con la agrobacteria pTRV1 se mezclaron con la suspensión pTRV2 (mezcla control que carece de inserto), con pTRV2:RAR1 o con pTRV2:SGT1.

El silenciamiento del mRNA de los factores NbRAR1 o NbSGT1 se analizó por RT-PCR semicuantitativa, sobre muestras de tejido sistémico, a los 14 días tras la agroinfiltración. En estas RT-PCRs se empleó la actina como control endógeno, y para los genes silenciados se emplearon cebadores que anillaran fuera de la zona diana de silenciamiento, para asegurar que efectivamente el gen endógeno estaba siendo analizado (**TABLA 3**). La PCR se detuvo a los ciclos 30, 33 y 36 en todos los casos salvo para la amplificación de RAR1, en la que se siguió 41, 44 y 43.

A los 14 días, sobre las hojas en las que el silenciamiento fue efectivo se agroinfiltró la combinación de proteínas P25 y HC PPV, o la quimera necrogénica PVX-HC, para estudiar la inducción de necrosis en presencia de cantidades reducidas de SGT1 y RAR1. Como control se empleó la agroinfiltración con GUS, proteína no inductora de necrosis. Simultáneamente, se llevaron también plantas agroinfiltradas con la combinación pTRV1-pTRV2, y por tanto no silenciadas, a las que se volvió a agroinfiltrar a los 14 días con las combinaciones de proteínas o con el virus descritos más arriba. La necrosis se analizó a los 9 días (para la combinación de proteínas) o a los 11 días (para el virus PVX-HC) mediante la determinación de la liberación de electrolitos y tinción DAB.

### 3.8. ANÁLISIS DE TERMOGRAFÍA Y FLUORESCENCIA

Para estos ensayos, se emplearon unas 6-12 plantas de *N. benthamiana* y 15 de *A. thaliana* a dos tiempos distintos. En el primer tiempo, se analizaron plantas sanas o infectadas aún hidratadas, a las que se les retiró el agua una vez finalizada la toma de imágenes. En el segundo tiempo, se estudiaron estas mismas plantas tras haber pasado una serie de días sometidas a este estrés hídrico.

Para la toma de este tipo de imágenes, se posicionó cuidadosamente la porción sistémica de las distintas plantas analizadas, con el objetivo de que todas ellas recibieran la luz de excitación de forma equivalente, de modo que la fluorescencia o la radiación infrarroja emitida no se viese afectada por diferencias de posición en relación al detector.

#### 3.8.1. Análisis de fluorescencia multicolor (MCFI)

Para analizar diversos parámetros, entre ellos la acumulación de metabolitos secundarios relacionados con la defensa y el estrés, se analizó la emisión de fluorescencia multicolor (MCFI, de *Multicolor fluorescence imaging*) en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* sanas o infectadas, regadas o sometidas a estrés hídrico. Para ello, las plantas se sometieron a excitación lumínica mediante luz UV (355 nm), y se analizó la emisión de fluorescencia mediante la obtención de imágenes multicolor, en cuatro regiones del espectro: 440 nm (azul), 520 nm (verde), 680 nm (rojo) y 740 nm (rojo lejano). Para ello, cada planta individual y completa se introdujo en una cámara Open FluorCamFC 800-O (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Las imágenes obtenidas se procesaron con el software FluorCam 7 v.1.0.3.0 (Photon System Instruments, Brno, Czech Republic), con el que se seleccionaron regiones representativas de interés entre las hojas sistémicas fotografiadas, cuya fluorescencia se tradujo a datos numéricos manejables. Los protocolos para la toma y el procesamiento de imágenes han sido descritos previamente (Granum *et al.*, 2015; Pérez-Bueno *et al.*, 2015).

### 3.8.2. Análisis de fluorescencia de la clorofila (Chl-F)

La eficiencia cuántica máxima del fotosistema II (PSII) se determinó en las plantas anteriores como la relación  $F_v / F_M$ , valor que además es indicativo de la inhibición de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés. Este  $F_v / F_M$  se calculó a través del método de saturación como  $(F_M - F_0) / F_M$ , siendo  $F_0$  y  $F_M$  las fluorescencias mínima y máxima de las clorofilas (Chl-F, de *Chlorophyll fluorescence*) registradas en el estado de adaptación a la oscuridad. Para conseguir este estado de adaptación a la oscuridad, las plantas se almacenaron durante 30 min en cámaras a oscuras. Posteriormente, cada planta individual se introdujo en una cámara FluorCam 700 MF (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic), donde se midió el valor de fluorescencia basal  $F_0$  en condiciones de iluminación débil no saturante, seguido de la aplicación de un pulso de luz saturante con el que se determinó el valor de  $F_M$ . Las imágenes de fluorescencia obtenidas se analizaron con el software Fluor Cam v.5.0, con el que se seleccionaron regiones representativas de interés entre las hojas sistémicas fotografiadas, cuya fluorescencia se tradujo a datos numéricos manejables. Los protocolos para la toma y el procesamiento de imágenes han sido descritos previamente (Pineda *et al.*, 2008; Granum *et al.*, 2015; Pérez-Bueno *et al.*, 2015).

### 3.8.3. Análisis de termografía

Para analizar la temperatura superficial de las hojas se tomaron imágenes infrarrojas de las porciones sistémicas de las plantas analizadas más arriba. Para ello se empleó una cámara FLIR A305sc (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA) tal y como ha sido descrito por Pérez-Bueno y colaboradores (Pérez-Bueno *et al.*, 2016). Esta cámara térmica se colocó verticalmente sobre cada planta individual, a unos 0,3 m de distancia, mantenida sobre un trípode. De este modo, se pudo obtener un video digital de 10 s de cada planta, con imágenes infrarrojas tomadas cada segundo, las cuales se analizaron con el software Research & Development software (FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA), con

el que se seleccionaron regiones representativas de interés entre las hojas sistémicas grabadas, cuya emisión infrarroja se tradujo a datos numéricos manejables. La temperatura superficial está íntimamente relacionada con procesos tales como la transpiración, pues un incremento de la evaporación lleva asociada una disminución de la temperatura.

### 3.9. ANÁLISIS DE CONTENIDO EN AGUA

En los análisis de tolerancia al estrés por sequía, se analizó el contenido en agua de las plantas hidratadas y deshidratadas, determinado como el porcentaje que supone el peso del agua respecto al peso fresco total de la planta. Para ello, se tomó la parte aérea de las plantas y se obtuvo su peso fresco ( $w_f$ ). Una vez tomado este valor, estas mismas muestras se dejaron secar en horno a 65°C durante 5 días. Transcurrido este tiempo, se volvieron a pesar para obtener su peso seco ( $w_d$ ). La diferencia  $w_f - w_d$  permite determinar el peso del agua presente en cada muestra, y el contenido (%) en agua (**WC**, de *water (%) content*) de cada planta se calculó como **WC = 100 x [( $w_f - w_d$ ) /  $w_f$ ]**, tal y como ha sido descrito previamente (Verslues *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013). El contenido relativo (%) en agua de plantas sometidas a estrés por sequía frente a sus plantas control hidratadas, para cada tratamiento, se calculó como **rWC = 100 x [(WC % deshidratadas / WC % hidratadas)]**. Al menos se analizaron 15 plantas sanas y 15 infectadas por virus y por régimen hídrico, y el experimento se repitió tres veces.

El contenido de agua (%) relativo del suelo (**RSWC**, de *relative soil water (%) content*) se calculó como sigue. Los tiestos con tierra y con cada planta se regaron hasta la saturación (riego en bandeja durante 3 h), y una vez conseguido esto se les eliminó el exceso de agua y se pesaron; esta primera medida constituye el peso inicial ( $sw_0$ ). Posteriormente, una vez retirado el riego y sometidos a deshidratación, los tiestos se pensaron periódicamente hasta el final del experimento; estas medidas constituyen el peso fresco a un día t ( $sw_{f,t}$ ). A los 15 días, tras el inicio del periodo de deshidratación, los tiestos se secaron en un horno a 60°C durante 5 días, transcurridos los cuales se pesaron de nuevo; estas medidas constituyen

el peso seco ( $sw_d$ ). El RSWC se obtuvo como  $RSWC = 100 \times [(sw_{f,t} - sw_d) / (sw_0 - sw_d)]$ , tal y como ha sido descrito previamente por Miura y colaboradores (Miura *et al.*, 2013).

### 3.10. ANÁLISIS DE TRANSPIRACIÓN, ESTOMAS Y ARQUITECTURA RADICULAR

#### 3.10.1. Curvas de pérdida de agua

Para *A. thaliana* se cortaron a ras de suelo 12 rosetas por tratamiento vírico más 12 rosetas de plantas sanas, y se colocaron, individualmente, en placas Petri con la parte abaxial hacia arriba, a temperatura de 22°C y condiciones de iluminación controladas. Para *N. benthamiana*, se cortaron 8 discos de hoja pertenecientes a 8 plantas distintas y se repartieron separadas sobre una placa Petri con la parte abaxial hacia arriba, también bajo condiciones controladas. Se analizaron cuatro de estas placas (4 réplicas) por tratamiento. El peso fresco de las muestras se determinó inmediatamente después del corte del tejido, y los pesos de las muestras continuaron registrándose a intervalos de tiempo hasta el final del ensayo. El peso medido a cada tiempo se expresó como porcentaje respecto del peso fresco de la muestra al comienzo del experimento. Estos ensayos se repitieron dos veces para ambas especies de planta.

#### 3.10.2. Conductancia estomática y análisis de estomas

La conductancia estomática se analizó en *N. benthamiana* utilizando un porómetro de hoja (SC-1 Decagon-T). Para ello, se analizaron hojas jóvenes perfectamente extendidas, y las mediciones se realizaron sobre plantas completas situadas en la cámara de crecimiento, con el objetivo de evitar modificaciones en el comportamiento estomático debido a cambios de temperatura, humedad o iluminación durante la manipulación de las plantas. En este experimento se realizaron mediciones sobre unas 12 plantas de cada tratamiento, a 25°C, un 65%

de humedad relativa y a horas tempranas de la mañana, ya que las plantas tienden a cerrar estomas a medida que el día avanza. El ensayo se realizó varias veces, con distintos tratamientos víricos y regímenes hídricos, y a distintos días desde el inicio del experimento.

Para realizar recuentos del número de estomas y de células epidérmicas en *A. thaliana* y *N. benthamiana*, se tomaron hojas jóvenes completamente extendidas, y de cada una de ellas se realizaron impresiones de la superficie abaxial sobre geles de agarosa al 3% w/v parcialmente solidificados, tal y como se ha descrito previamente por Delgado y colaboradores (Delgado *et al.*, 2012). Se examinaron ca. 10 plantas por tratamiento. Estas impresiones se analizaron y fotografiaron con un microscopio Leica DM 2500 equipado con una cámara Leica DFC 320. Se obtuvieron ca. 40 imágenes de diferentes campos por tratamiento. Sobre estas imágenes, se determinó la densidad estomática (número de estomas por área), la densidad de células epidérmicas (número de células epidérmicas por área) y el índice estomático (número de estomas en relación al número de células totales, por área).

### **3.10.3. Análisis de la arquitectura radicular**

Para el análisis de las raíces en *A. thaliana*, las semillas se germinaron en placas de medio MS dispuestas verticalmente, lo que permitió el desarrollo de la raíz desde un extremo de la placa al otro, y su completa expansión. A 10 días de la germinación, las plántulas se agroinocularon con los distintos tratamientos víricos tal y como se ha descrito más arriba (punto 3.1.4). A los 11 días tras la agroinoculación, se realizaron análisis de tres parámetros de la raíz en 12 plantas por tratamiento, empleando para ello el software de análisis de imagen ImageJ (National Institutes of Health website, image processing and analysis in Java). En concreto, se analizó el número de raíces laterales por centímetro de raíz principal, así como la longitud de esa raíz principal. Finalmente, también se analizó el grosor de la raíz principal a tres alturas distintas.

### 3.11. ANÁLISIS DE LA EFICACIA BIOLÓGICA (*FITNESS*)

En los experimentos de estrés por sequía de *A. thaliana* se emplearon dos regímenes de estrés por déficit hídrico distintos, definidos como condiciones de sequía moderada (el estándar seguido en la mayoría de los experimentos de este tipo en el presente trabajo) y sequía extendida. En las condiciones de sequía moderada, las plantas se transfirieron a tiesto con tierra a los 11 dpa, permaneciendo cubiertas con una bolsa de plástico hasta los 16 dpa, momento en el que esta se eliminó y las plantas se sometieron a riego por saturación durante 3 h (añadiendo el agua a la bandeja con los tiestos), hasta conseguir la completa homogeneización de la humedad. Para los experimentos de sequía extendida, las plantas se transfirieron a tiestos con tierra a los 6 dpa, quedando cubiertos con una bolsa de plástico hasta los 11 dpa, momento en el que esta se retiró y las plantas pasaron a crecer del modo habitual, pero sin ningún riego adicional, a diferencia de los experimentos de sequía moderada. El valor de RSWC se calculó a distintos días para estas dos condiciones de estrés por sequía descritas, tal y como se ha indicado más arriba (punto 3.9).

Las condiciones de estrés hídrico a las que se sometió *N. benthamiana* ya han sido descritas más arriba (punto 3.1.6), y se emplearon también en los experimentos de determinación de la eficacia biológica de este hospedador.

Para estudiar la eficacia biológica, se realizaron análisis del número de plantas productoras de semillas, y de la producción de semillas por planta, en *A. thaliana* y *N. benthamiana*, manteniendo los esquemas de estrés hídrico descritos y dejando a las plantas crecer hasta la completa senescencia. El total de semillas producido por cada planta se recogió individualmente, se limpió, y se pesó, lo que constituye la producción de semillas (mg) por planta. El peso correspondiente a una única semilla se estimó para *A. thaliana* a través del peso conjunto obtenido para una alícuota de 200 semillas, derivadas de la producción total de una planta, y para lo que se analizaron cuatro plantas por tratamiento. Para *A. thaliana*, la viabilidad de las semillas producidas se calculó como el porcentaje de

germinación de ca. 100 semillas por planta, a las cuales se les esterilizó la superficie y se germinaron en placas con medio MS tras 3 días de estratificación. La viabilidad se determinó como el porcentaje de semillas germinadas a los 10 días de cultivo en placa.

### **3.12. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METABOLITOS Y HORMONAS EN *A. thaliana***

Para analizar el contenido de metabolitos y hormonas relevantes en plantas de *A. thaliana* sanas o infectadas con los distintos virus, y sometida a distintos regímenes hídricos, se efectuaron cuatro réplicas biológicas independientes, realizándose en cada una de ellas un muestreo en el que se reunió material vegetal de 10-13 plantas distintas, por tratamiento viral y régimen hídrico. El tejido analizado consistió en hojas de la roseta tomadas de las mismas posiciones para plantas infectadas o sanas, con el objetivo de minimizar el efecto de la variación del contenido de metabolitos a lo largo de la planta. Una vez tomado, el tejido fue inmediatamente congelado en N<sub>2</sub> líquido, y se almacenó en congelador a -80°C hasta su uso.

Para este experimento, *A. thaliana* se creció e inoculó siguiendo el protocolo habitual descrito más arriba (puntos 3.1.3-3.1.6). En concreto, las plantas se trasplantaron a los tiestos correspondientes a los 11 dpa, manteniéndose cubiertas con una bolsa de plástico hasta los 16 dpa. Una vez transcurrido este tiempo la bolsa se retiró y se aplicaron 3 h de riego a saturación, transcurridas las cuales se eliminó completamente el agua. A continuación se tomaron las muestras a distintos días tras el riego (días post-riego, dpr) según el régimen hídrico analizado. Así, se analizaron plantas en régimen de i) hidratación, a tiempo 0 dpr (W, de *watered*, a los 16 dpa), ii) sequía, a 7 dpr (D, de *drought*, a los 23 dpa) y iii) sequía intensa, a 10 dpr (SD, de *severe drought*, a los 26 dpa). Un cuarto régimen hídrico, rehidratación (R, de *re-watered*) se analizó sobre plantas previamente sometidas a SD, las cuales una vez transcurridos los 10 dpr se sometieron a rehidratación durante 6 h.

### 3.12.1. Niveles de metabolitos

La extracción de metabolitos se realizó triturando las muestras de tejido en mortero refrigerado con N<sub>2</sub> líquido y añadiendo inmediatamente el tampón de extracción adecuado, siguiendo un método para la obtención de perfiles metabólicos previamente establecido (Osorio *et al.*, 2013). La derivatización de los compuestos y su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas TOF (de *Time-of-flight*), o GC/TOF-MS, ha sido descrita previamente (Lisec *et al.*, 2006). Los cromatogramas y los espectros de masas obtenidos se evaluaron con la herramienta TAGFINDER (Luedemann *et al.*, 2008).

### 3.12.2. Niveles hormonales

Para la extracción de la hormona ácido salicílico (SA), las muestras congeladas obtenidas a partir del experimento anterior se trituraron en mortero refrigerado con N<sub>2</sub> líquido, al que se le añadieron 1,5 mL de metanol al 90% v/v. El extracto así obtenido se sonicó durante 15 min y los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 13000x *g* durante 10 min. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se secó en viales de cristal a 40°C. El residuo deshidratado obtenido se disolvió en 1 mL de HCl 4M y se hidrolizó a 80°C durante 1 h. La mezcla hidrolizada se extrajo con una solución de ciclopentano/etilacetato (1:1 v/v), recuperándose la fase orgánica, la cual se deshidrató a 40°C bajo corriente de nitrógeno.

Para la extracción de los ácidos abscísico (ABA) y jasmónico (JA), se partió de 500 u 800 µg de tejido congelado al que se le añadieron 20 mL de metanol al 80% v/v, y cuya extracción se llevó a cabo durante toda la noche. Después de la extracción, cada muestra se redujo en vacío, y se diluyó con 20 mL de agua. La fase acuosa se ajustó a un pH de 2,8 con HCl 1M y se decantó cuatro veces con volúmenes equivalentes de etilacetato. Los extractos de etilacetato se combinaron y se evaporaron hasta secar completamente las muestras. El residuo obtenido se resuspendió en 1 mL de metanol al 10% v/v y se inyectó en una

columna C18 previamente equilibrada. La columna se lavó con ácido acético acuoso a pH 3,0, y entonces el ABA, SA y JA se eluyeron con metanol al 80% v/v. Después de someterlas a evaporación hasta secarlas completamente, las muestras del análisis de ABA, SA y JA se disolvieron en 40  $\mu$ L de una disolución de 20 mg/L de hidrocloreuro de metoxiamina en piridina, durante 2 h a 37°C, para proteger los grupos carbonilo. Los protones ácidos se derivatizaron gracias al tratamiento con 70  $\mu$ L de N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida durante 30 min a 37°C. Un volumen de 1  $\mu$ L de muestra se empleó para el análisis por GC/TOF-MS. La cromatografía se realizó en una columna de 30 m MDN-35. La temperatura de inyección fue de 230°C, la línea de transferencia y la fuente de ionización se termostataron a 250°C. La temperatura inicial del horno (85°C) se incrementó de forma constante hasta un valor final de 360°C, con un gradiente de 15°C/min. Las muestras se cuantificaron utilizando los patrones internos [ $^2\text{H}_6$ ]-ABA, [ $^2\text{H}_4$ ]-SA y [ $^2\text{H}_6$ ]-JA (OIChemlm Ltd., Olomouc, Czech Republic).

### 3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En los casos en los que se pretendió comparar el conjunto de valores asociados a un tratamiento con el de otro u otros tratamientos, se aplicaron diversos test estadísticos para los que el inicio de todos fue el mismo: la determinación del cumplimiento de la normalidad y de la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad). En los casos en los que alguno de estos requisitos no se cumplió, se aplicó una serie de transformaciones matemáticas sobre los datos brutos. Cuando no se lograron transformaciones satisfactorias de los datos, se emplearon test alternativos. Básicamente, el esquema de análisis seguido fue: i) para la comparación de más de dos grupos normales y homocedásticas, se realizó un análisis de varianza ANOVA (de *Analysis of variance*) seguido del test *post hoc* de Scheffé; ii) para la comparación de más de dos grupos normales no homocedásticos, se realizó un análisis ANOVA-Welch seguido del test *post hoc* T3 de Dunnett; iii) para la comparación de dos grupos normales y homocedásticos se aplicó el test t de Student, mientras que en ausencia de homocedasticidad se aplicó el test t de

Student con la corrección de Welch (test t de Welch); iv) para la comparación de dos grupos en los que al menos uno de ellos no era normal se aplicó el test de U de Mann-Whitney; v) para la comparación de más de dos grupos en los que al menos uno de ellos no era normal se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de comparaciones dos a dos con U de Mann-Whitney con el nivel de significación  $\alpha$  modificado a  $\alpha'$  con la corrección de Bonferroni, según la ecuación  $\alpha' = \alpha/m$ , con m representando el número de comparaciones realizadas.

Ciertos test estadísticos adicionales se emplearon para el análisis de determinados conjuntos de datos. Para comparar el % de plantas productoras de semillas entre tratamientos se aplicó el test exacto de Fisher para comparaciones dos a dos, corregido con Bonferroni para comparaciones múltiples. En el análisis del perfil metabólico y hormonal se aplicó el test de Dunnett a los datos correspondientes a cada metabolito u hormona, para determinar diferencias en el contenido de dicho metabolito entre tratamientos, tomando como grupo control de referencia el tratamiento WA (esto es plantas hidratadas no infectadas con virus). Sobre el total de datos metabólicos se aplicaron análisis de agrupamiento jerárquico (de *Hierarchical clustering*), utilizando el método euclídeo (*Euclidean distance method*) para obtener la matriz de distancias, y el método de promedios (*Average method*) de distancias para la construcción del dendrograma. Sobre el conjunto de todos los datos metabólicos, o sobre los datos correspondientes a plantas sanas o infectadas del régimen hídrico W, se realizaron análisis de componentes principales (PCA, de *Principal component analysis*), con los que se determinó en función de qué componente se separaban las muestras de los distintos tratamientos, y qué metabolito o metabolitos presentaban una mayor contribución a la variabilidad global observada. La medida del grado de relación lineal entre los niveles de acumulación para pares de hormonas, en el conjunto de todas las muestras, se determinó mediante la obtención del coeficiente de correlación de Pearson.

Para los análisis estadísticos se empleó el programas IBM SPSS Statistics v.20 (IBM Corp.) En general, el nivel de significación  $\alpha$  se mantuvo en 0,05, salvo en los casos en los que se corrigió con Bonferroni, o en los que se emplearon valores más restrictivos. En la

elaboración de agrupamientos jerárquicos, y en los análisis de PCA realizados sobre todos o parte de los datos se empleó el paquete de programación R v. 3.3.3 (The R Project for Statistical Computing).

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')
directo attB1 BiP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTG <b>ATGGCTGGTGGTGCCTGGAATAG</b>
reverso attB2 BiP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTCCAGCTCGTCATGATCATCATC
directo P25NcoI	CATG <b>CCATGG</b> ATATTCTCATCAGTAG
reverso P25XmaI	TCA <b>CCCGGG</b> TTATGGCCCTGCGCGGAC
reverso P25T7XmaI	TCA <b>CCCGGG</b> CTA <b>ACCCATCTGTTGTCCACCCGTC</b> A <u>TACTTGCCATTGGCCCTGCGCGGAC</u>
directo attB1 P25	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTGATGGATATTCTCATCAGTAG
reverso attB2 P25	GGGGACCA CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTGGCCCTGCGCG <b>GACATATG</b>
directo attB1 GFP	GGGGACAAGTTTGTACA AAAAAGCAGGCTTGATGAGTAAAGGAGAAGAAC
reverso attB2 GFP	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC <b>TTTGTATAGTTCATCCATGC</b>

**TABLA 1. Oligonucleótidos cebadores empleados en las clonaciones de algunas de las proteínas utilizadas en el presente trabajo.** En negrita, aparecen reflejados los nucleótidos correspondientes a la secuencia codificante de la proteína correspondiente. En rojo se muestran las dianas de restricción correspondientes (NcoI para P25NcoI; XmaI para P25XmaI y P25T7XmaI). Finalmente, subrayado aparece la secuencia correspondiente al epítipo T7, para P25T7XmaI.

NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO	CÓDIGO
<b>AtPR-1 directo</b>	CGTCTTTGTAGCTCTTGTAGG	qRT- PCR	At2g14610 <i>A. thaliana</i>
<b>AtPR-1 reverso</b>	TGCCITGGTTGTGAACCCTTAG		
<b>AtRD29B directo</b>	CACCACCGTTGGGACTATG	qRT- PCR	At5g52300 <i>A. thaliana</i>
<b>AtRD29B reverso</b>	GCAAAACCCCAAATCTTCAG		
<b>AtTUB5 directo</b>	GCAACAATGAGCGGTGTGACTT	qRT- PCR	At1g20010 <i>A. thaliana</i>
<b>AtTUB5 reverso</b>	GAAATGGAGACGAGGGAATGG		
<b>AtADC1 directo</b>	GTGGTGATAAGGGGAACGACA	sonda	At2g16500 <i>A. thaliana</i>
<b>AtADC1 reverso</b>	CAACCGAAATAAGACCAATCTC AT		
<b>PPV directo</b>	AAGTCGATGGGCGAACTATG	qRT- PCR	EF569215
<b>PPV reverso</b>	AAACCGAAGTCCACAACCAC		
<b>Nb18S rRNA directo</b>	GCCCGTTGCTGCGATGATTC	qRT- PCR	AJ236016 <i>N. benthamiana</i>
<b>Nb18S rRNA reverso</b>	GCTGCCTTCCTTGGATGTGG		
<b>PVX directo</b>	ATTTGGGACCAGCAACAGAG	qRT- PCR	M95516
<b>PVX reverso</b>	ATGCTGATTTTCGGTGACTCC		
<b>NaTD directo</b>	TTTCGATCACCCAGATGTGA	RT- PCR	AF229927 <i>N. attenuata</i>
<b>NaTD reverso</b>	CCAAATGGCTCAACTCCAAT		
<b>NbPI-I directo</b>	ACTCGGGAATGCGATACAAG	RT- PCR	DQ158182 <i>N. benthamiana</i>
<b>NbPI-I reverso</b>	GAGGACATGGCTTTGGATTT		
<b>NbActina directa</b>	GATGGACAAGTCATCACCATTG	RT- PCR	AY179605 <i>N. benthamiana</i>
<b>NbActina reversa</b>	CTGAGGACAATGTTTCCGTACA		

**TABLA 2. Oligonucleótidos cebadores empleados en análisis de expresión génica.** En esta tabla aparecen reflejados algunos de los cebadores utilizados en los ensayos por PCR cuantitativa (qRT-PCR), por PCR semicuantitativa (RT-PCR) y en la obtención de sondas para *northern blot*.

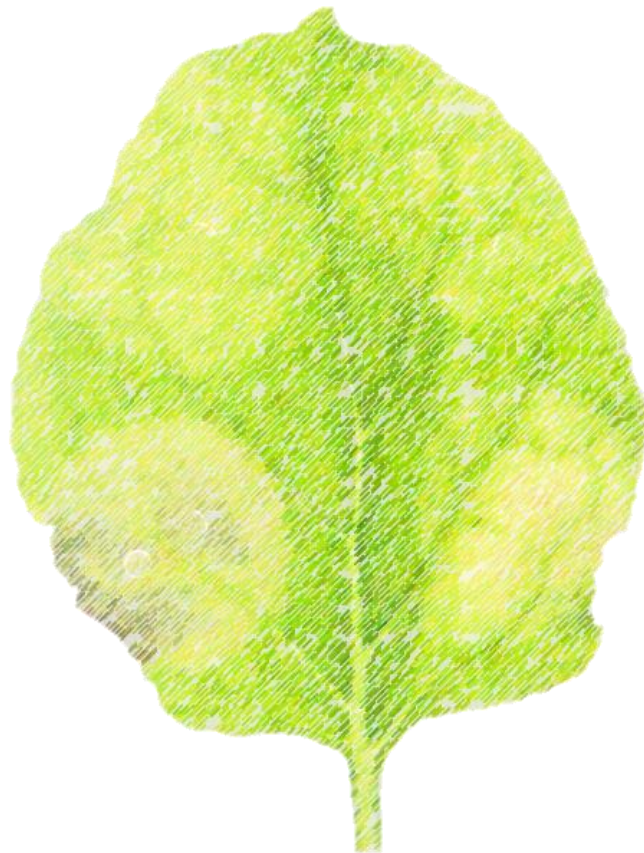
NOMBRE	SECUENCIA (5'-3')	USO	CÓDIGO
<b>NtRAR1</b> directo	CG <b>GGATCC</b> GGTTCACAACCCAG AGAAGT	VIGS	
<b>NtRAR1</b> reverso	CC <b>CTCGAG</b> TTAGGACGCTGGGC TGGC	RAR1	AF480487
<b>Sq-NtRAR1</b> directo	CCATCGATATGGAGAGCTTCGTT GCCAGA	RT-PCR	<i>N. tabacum</i>
<b>Sq-NtRAR1</b> reverso	CGGGATCCGTGATCAGAACAAA AGAATCCC		
<b>NbSGT1</b> directo	GTGCAGAGGCCTAATGTAGG	VIGS	
<b>NbSGT1</b> reverso	GCTTCCTTCGACCTTCTTTGT	SGT1	AF494083
<b>Sq-NbSGT1</b> directo	TTTGCCAAGGGAATACCAGCCAA	RT-PCR	<i>N. benthamiana</i>
<b>Sq-NbSGT1</b> reverso	TTCCTTCCTTCGACCTTCTTTGT		
<b>NbActina</b> directo	GATGGACAAGTCATCACCATTG	RT-PCR	AY179605
<b>NbActina</b> reverso	CTGAGGACAATGTTTCCGTACA		<i>N. benthamiana</i>

**TABLA 3. Oligonucleótidos cebadores empleados para la construcción y el análisis de los vectores VIGS para el silenciamiento de SGT1 y RAR1.** En la tabla se muestran, marcados en la columna de uso como “VIGS”, los cebadores utilizados para amplificar el fragmento génico cuya secuencia se pretende silenciar, insertándolos en pTRV2. Para NtRAR1 directo y reverso, se muestran en rojo las dianas para las enzimas de restricción BamHI y XhoI, respectivamente. Marcados en la columna de uso como “RT-PCR” aparecen los cebadores empleados en los ensayos de RT-PCR semicuantitativa (Sq), con los que se confirmó el silenciamiento génico inducido por las construcciones obtenidas.



#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. La proteína P25 de *Potato virus X* (PVX) es el principal determinante de patogenicidad responsable de la necrosis sistémica en los sinergismos asociados a PVX**

---



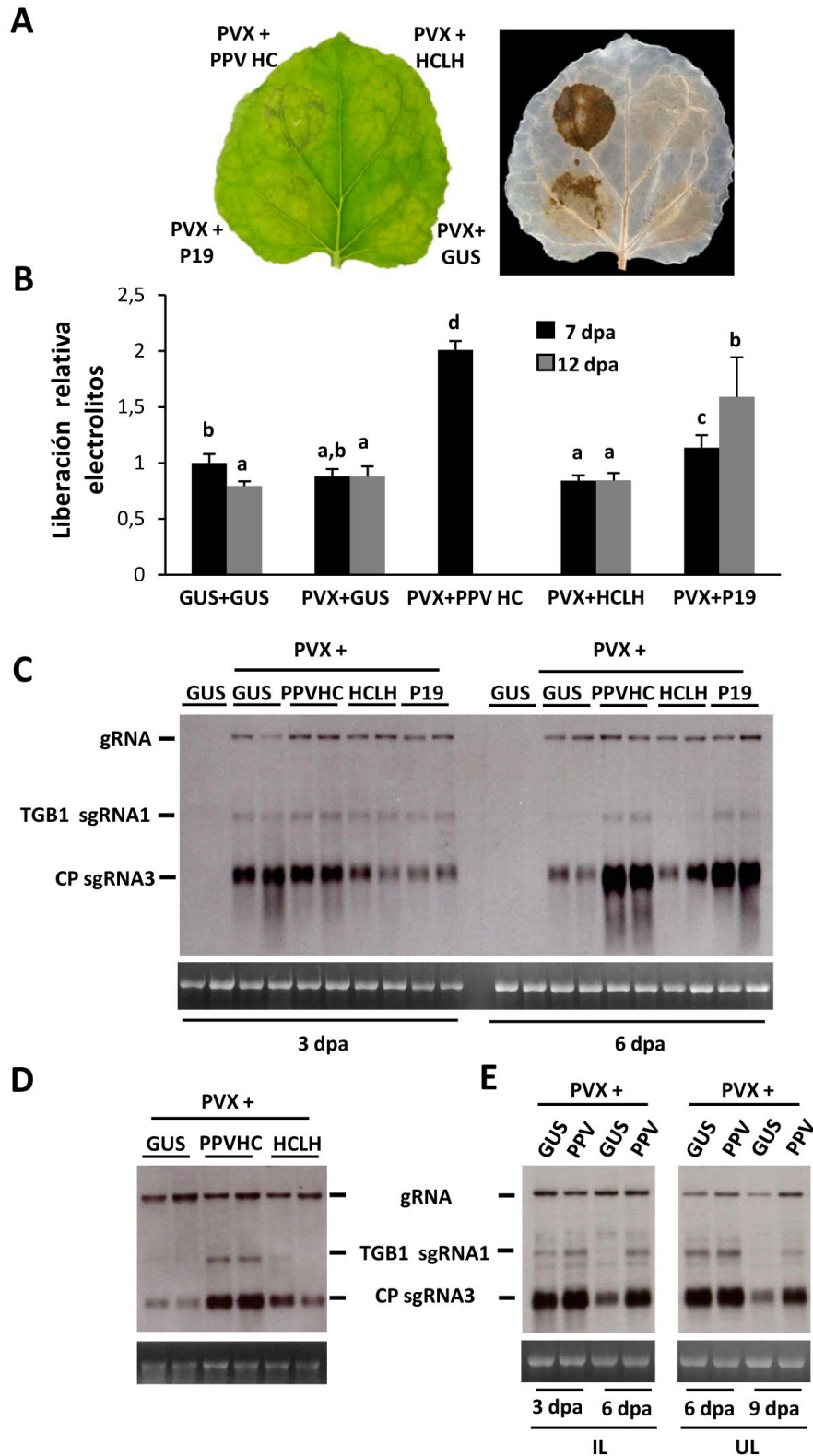


## 4.1. RESULTADOS

### 4.1.1. La agroinfiltración de PVX con supresores del silenciamiento génico induce respuestas de tipo HR (de *Hypersensitive response*), que correlacionan con incrementos en la acumulación de los RNAs subgenómicos de PVX

En los sinergismos asociados a PVX en *Nicotiana benthamiana* existe una interrelación entre i) la participación de PVX, ii) la presencia de un supresor del silenciamiento génico (VSR, de *Viral suppressor of RNA silencing*) fuerte en el otro virus participante del sinergismo y iii) la aparición de necrosis sistémica (SN, de *Systemic necrosis*). Para entender mejor la relación entre estos factores se determinó en primer lugar si la expresión conjunta de PVX y de una serie de VSRs era capaz de inducir necrosis a nivel local. De ser así, esta aproximación permitiría reproducir la interacción sinérgica entre PVX y los virus de los que proceden estos VSRs. Para ello, se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* una serie de mezclas de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para la expresión de PVX y de alguno de los siguientes VSRs: PPV HC (*Helper component proteinase* de *Plum pox potyvirus*), PPV HCLH (en adelante, HCLH), TBSV P19 (proteína P19 de *Tomato bushy stunt tombusvirus*, en adelante P19) o  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), esta última como proteína control. HCLH es una forma mutada de PPV HC, en la que la presencia de una mutación puntual (L134H) conduce a una pérdida de la actividad supresora y de la capacidad de inducir necrosis cuando se expresa desde un vector PVX (González-Jara *et al.*, 2005). En el presente trabajo, la necrosis se analizó cuantitativamente mediante ensayos de liberación de electrolitos, y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asociada se determinó mediante tinciones histoquímicas con DAB (3,3'-diaminobenzidina). En torno a los 6-8 días tras la agroinfiltración (días post-agroinfiltración, dpa), PVX dio lugar a una fuerte necrosis y a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando se coexpresó con PPV HC, mientras que la agroinfiltración simultánea de PVX y P19 también dio lugar a necrosis, aunque en este caso a tiempos más tardíos (**FIG. 6A**). Las combinaciones de PVX con HCLH o con la proteína control GUS no indujeron necrosis a ninguno de los tiempos

examinados. Para analizar cuantitativamente el grado de necrosis inducido por las distintas combinaciones PVX/VSRs, se tomaron



**FIGURA 6 (en la página anterior). La expresión de PVX junto con VSRs induce necrosis de tipo HR en *N. benthamiana*.** **A.** Hojas infiltradas con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium*, portadoras de construcciones binarias, para la expresión de PVX junto con alguno de los siguientes productos: GUS, PPV HC, PPV HCLH (HCLH) o TBSV P19 (P19), tal y como se indica en la imagen correspondiente. Se fotografió una hoja (panel izquierdo) que luego se tiñó con solución DAB (panel derecho) a 7 dpa. El DAB forma un precipitado marrón intenso debido a la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **B.** Liberación de electrolitos a 7 y 12 dpa de discos de hoja infiltrados con distintas combinaciones. Los gráficos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de 16 réplicas, cada una de ellas consistente en 4 plantas que recibieron el mismo tratamiento en dos experimentos independientes. Las diferencias entre las medias de las distintas combinaciones se analizaron estadísticamente de forma independiente para 7 o 12 dpa, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). **C.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total obtenido a partir de parches de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltrados como los mostrados en el panel A, a 3 y 6 dpa. Para cada combinación se analizaron dos conjuntos independientes de muestras. **D.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total obtenidos a partir de parches de hojas de *N. tabacum* infiltrados con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* que contenían construcciones binarias, para expresar PVX junto con GUS, PPV HC o HCLH, a 6 dpa. **E.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total obtenidos a partir de plantas de *N. benthamiana* infectadas únicamente con PVX (PVX + GUS) o con PVX en combinación con PPV-GFP (PVX + PPV). El extracto de RNA se obtuvo a partir de parches de hojas infiltrados (IL) a 3 y 6 dpa, o a partir de hojas sistémicas infectadas (UL) a 6 y 9 dpa. El total del RNA (2  $\mu$ g) se hibridó con una DIG-ribosonda complementaria a la secuencia de la CP de PVX. Al lado de las imágenes de cada hibridación aparece señalado el RNA genómico (gRNA) y los dos principales RNAs subgenómicos (sgRNAs): el TGB1 sgRNA1 (sgRNA a partir del cual se expresa TGB1, la proteína P25) y el CP sgRNA3 (sgRNA a partir del cual se expresa la CP). Debajo de los *northern blots* se muestran los geles previos en los que se corrió el extracto de RNA total, teñidos con bromuro de etidio, a modo de control de carga.

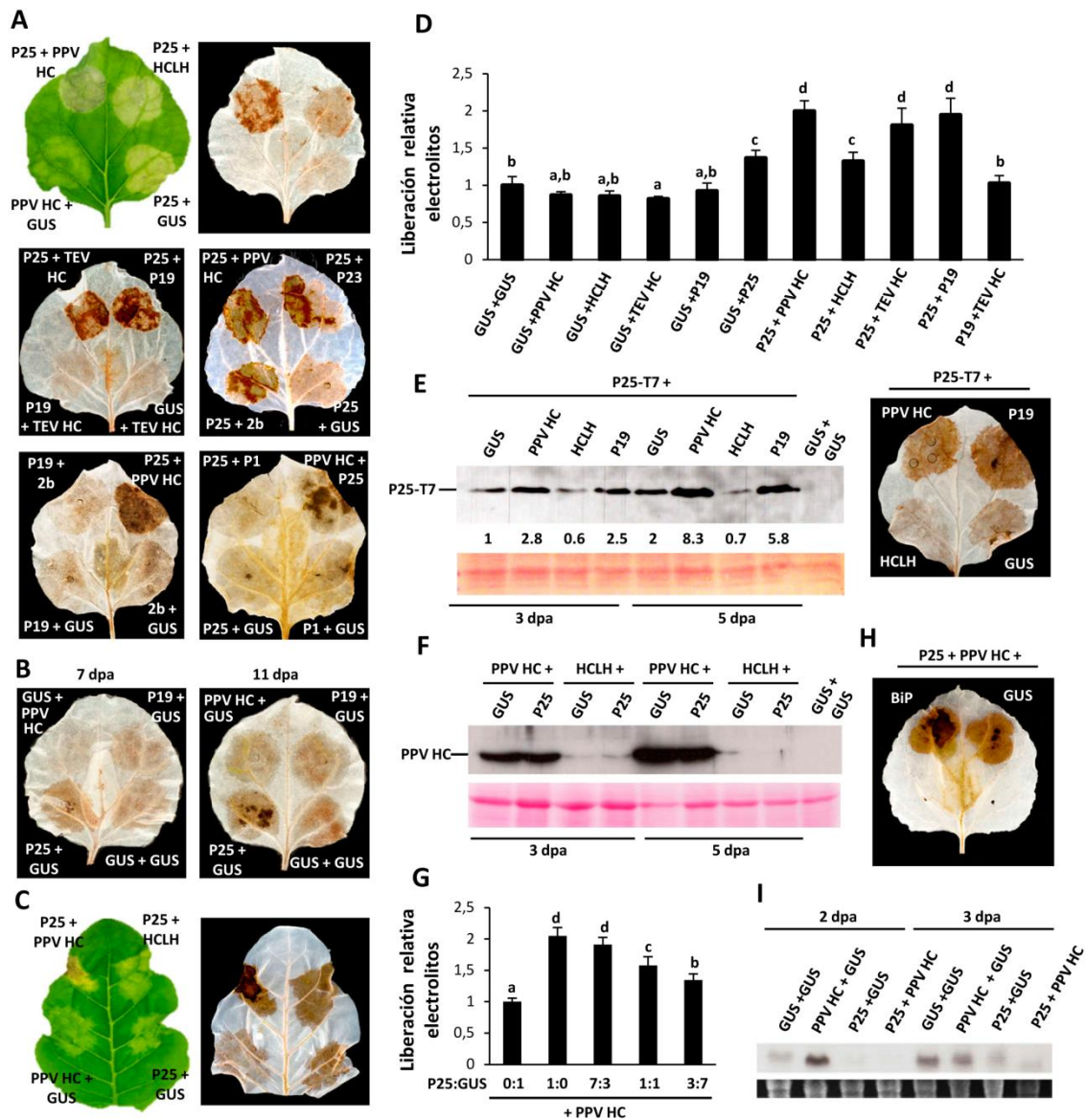
muestras del tejido necrosado y se analizó su liberación de electrolitos a tiempos distintos. En concordancia con los resultados anteriores, la necrosis inducida por la combinación de PVX/PPV HC fue superior a la registrada para las combinaciones de PVX con P19, HCLH o GUS, a los 7 dpa (**FIG. 6B**). A 12 dpa, momento en el que los parches agroinfiltrados con PVX/PPV HC se encontraban totalmente necrosados y desecados, se observó un incremento de la liberación de electrolitos para la mezcla PVX/P19, en comparación con los controles.

Para determinar si los cambios en el fenotipo de necrosis entre las distintas combinaciones PVX/VSRs están asociados a diferencias en la acumulación de los RNAs de PVX, se efectuaron análisis por *northern blot* sobre extractos de RNA total obtenidos a partir de los parches agroinfiltrados, a 3 y 6 dpa (**FIG. 6C**). Mientras que el RNA genómico (gRNA) se acumuló prácticamente al mismo nivel en las diferentes combinaciones PVX/VSR y PVX/GUS a los 3 y 6 dpa, los RNAs subgenómicos (sgRNA) 1 y 3, responsables de la expresión de TGB1 (TGB1 sgRNA1, de *Triple gene block 1 sgRNA 1*) y de la CP (CP sgRNA3, de *Capsid protein sgRNA 3*) se acumularon a mayor nivel en las combinaciones PVX/PPV HC y PVX/P19 que en las combinaciones PVX/HCLH y PVX/GUS, a los 6 dpa. Cuando se llevaron a cabo estos experimentos de coexpresión transitoria de PVX con PPV HC, HCLH o GUS en *N. tabacum*, los resultados obtenidos a 6 dpa fueron equivalentes a lo observado para *N. benthamiana* (**FIG. 6D**). Sin embargo, en *N. tabacum*, la combinación PVX/PPV HC no fue capaz de inducir necrosis, probablemente debido a que la expresión transitoria de PVX en este hospedador es menos eficiente que en *N. benthamiana* (Nausch *et al.*, 2012).

Tras realizar estos estudios a nivel local, se analizó si estas variaciones en la acumulación de los sgRNAs de PVX en presencia de VSRs podrían extrapolarse a lo que sucede durante la interacción sinérgica PVX-potyvirus, a nivel sistémico y con virus completos. Para ello, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con mezclas de PVX y PPV (este último como quimera PPV-GFP), o de PVX en presencia de GUS. Tal y como se muestra en la **FIG. 6E**, en la infección mixta PVX-PPV la acumulación de los sgRNAs de PVX fue mayor no solo en la muestra correspondiente a tejido local infectado, sino también en las muestras correspondientes a tejido sistémico, en relación a las muestras locales o sistémicas de la infección sencilla PVX/GUS. Todos estos resultados indican que las combinaciones PVX/VSRs capaces de inducir respuestas de necrosis en *N. benthamiana* incrementan y/o estabilizan los niveles de acumulación de los sgRNAs de PVX.

#### 4.1.2. La proteína P25 de PVX induce respuestas de tipo HR en *Nicotiana* spp.

Estudios previos han mostrado como la proteína potexviral P25, o TGB1, es un determinante de patogenicidad responsable de la supresión del silenciamiento por RNA (Voinnet *et al.*, 2000). Para determinar si P25 contribuye a la necrosis inducida por las combinaciones PVX/VSRs, se llevó a cabo en *N. benthamiana* la agroinfiltración de una serie de combinaciones de P25 con PPV HC, o con otra serie de VSRs pertenecientes a distintas familias de virus (**FIG. 7A**), tales como TEV HC (HC derivado de *Tobacco etch potyvirus*), P19, CTV P23 (proteína P23 de *Citrus tristeza closterovirus*, en adelante P23), CMV 2b (proteína 2b de *Cucumber mosaic cucumovirus*, en adelante 2b), HCLH y GUS, esta última a modo de control. Las combinaciones de P25 con PPV HC, TEV HC, P19, P23 o 2b indujeron una fuerte necrosis, asociada a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 7 dpa. La coexpresión de P25 con HCLH o GUS indujo una débil producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a este tiempo, que se incrementó respecto a los controles sin proteína P25 a los 11 dpa (**FIG. 7B**). El incremento en la necrosis inducida por P25 en presencia de otros VSRs se cuantificó mediante liberación de electrolitos, para una selección relevante de estos VSRs, ofreciendo resultados equivalentes (**FIG. 7D**). Las combinaciones consistentes en los distintos VSRs con GUS, o combinaciones de VSRs entre ellos, excluyendo P25, como por ejemplo combinaciones de TEV HC y P19, o P19 y 2b, no originaron necrosis o incrementos de liberación de electrolitos en comparación con los controles. Es más, la coexpresión de P25 con un determinante de síntomas como es la proteína P1 potyviral (en este estudio, P1 de *Potato virus Y* [PVY]), la cual no es un VSR (Tena Fernández *et al.*, 2013), tampoco originó necrosis (**FIG. 7A**, panel inferior derecho). Estos resultados, por tanto, muestran a P25 como una proteína con capacidad para inducir necrosis, y señalan a la actividad supresora de los distintos VSRs como responsables del incremento de la necrosis asociada a P25. La coexpresión de P25 y PPV HC en *N. tabacum* también fue capaz de inducir respuestas de tipo HR (**FIG. 7C**). Para determinar si existía correlación entre los niveles de acumulación de P25 y la necrosis inducida por las combinaciones P25/VSRs, se obtuvo una versión de P25 fusionada a un epítipo T7 en



**FIGURA 7.** La expresión de PVX P25 junto con VSRs induce una necrosis de tipo HR en *Nicotiana* spp. **A.** Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para la expresión de PVX P25 (P25) junto con alguno de los siguientes factores: GUS, PPV HC, PPV HCLH (HCLH), TEV HC, TBSV P19 (P19), CTV P23 (P23), CMV 2b (2b) o PVY P1 (P1); también, se analizaron las combinaciones de *Agrobacterium* que permiten expresar P19 junto con las que permiten expresar TEV HC o 2b, tal y como se indica en las imágenes. Las hojas se fotografiaron (panel superior izquierdo) y luego se tiñeron con solución DAB a 7 dpa. **B.** Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con GUS en solitario o en combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* que contenían GUS más P25, PPV HC o P19. Las hojas se tiñeron con solución DAB a 7 dpa (panel izquierdo) y 11 dpa (panel derecho). **C.** Hoja de *N. tabacum* infiltrada con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* para la expresión de P25 junto con GUS, PPV HC o HCLH, y la combinación de GUS más PPV HC, tal y como se indica en las imágenes. La hoja se fotografió (panel izquierdo) y luego se tiñó con solución de DAB (panel derecho) a 11 dpa. **D.** Liberación de electrolitos a 7 dpa de discos

de hojas infiltrados con diferentes combinaciones de cultivos de *Agrobacterium*. Los gráficos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de 12 réplicas, cada una de ellas consistente en material de 4 plantas que recibieron el mismo tratamiento en dos experimentos independientes. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). **E.** Análisis por *western blot* de extractos derivadas de parches de hojas infiltrados con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* que contenían una versión de P25 marcada con el epítipo T7 (P25-T7) junto con GUS, PPV HC, HCLH o P19, a 3 y 5 dpa. Para la detección de la proteína P25-T7 se empleó un anticuerpo anti-T7 (panel izquierdo). Se cuantificó la intensidad de cada banda mediante análisis densitométrico con ImageJ. Se tomó como 1 la densidad de la banda correspondiente a los parches de hoja infiltrados con P25-T7 más GUS a 3 dpa, y las otras combinaciones se calcularon en relación a este valor; los datos aparecen reflejados debajo de la imagen correspondiente a la hibridación. Además, en el panel derecho, se muestra una hoja teñida con solución DAB a 9 dpa, con las combinaciones de proteínas analizadas por *western blot*. **F.** Análisis por *western blot* de extractos derivadas de parches de hojas infiltrados con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* para la expresión de PPV HC junto con P25 o GUS, y HCLH más P25 o GUS, a 3 y 5 dpa, utilizando anticuerpos anti HC de PPV. El panel situado inmediatamente debajo de cada hibridación, en E y F, muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. **G.** Efectos de la disminución en la cantidad del cultivo de *Agrobacterium* que expresa la proteína P25 de PVX en la liberación de electrolitos analizada a 7 dpa. Las hojas se infiltraron con combinaciones de PPV HC junto con GUS o junto a una serie de diluciones de P25, realizadas también con GUS, tal y como se indica. **H.** Efecto de coagroinfiltrar BiP o GUS con la mezcla necrogénica P25/PPV HC, en *N. benthamiana*. La hoja se tiñó con solución DAB a 7 dpa. **I.** Análisis *northern blot* de extractos de RNA total derivados de parches de hoja infiltrados con GUS en solitario o en combinaciones de GUS más P25 o PPV HC, y la combinación P25 con PPV HC, a 2 y 3 dpa. El RNA total (15  $\mu$ g) se hibridó con una  $^{32}$ P-sonda complementaria a NtVPE-1a. Debajo del *northern blot* se muestra el gel previo en el que se corrió el extracto de RNA total, teñido con bromuro de etidio, a modo de control de carga.

su extremo C-terminal (P25-T7). Esta P25-T7 se agroinfiltró en *N. benthamiana* en combinaciones con PPV HC, HCLH, P19 o GUS. La mayor necrosis inducida por las combinaciones de P25-T7 con PPV HC o P19 correlacionó con niveles de acumulación de P25-T7 superiores a los correspondientes para las combinaciones de P25-T7 con HCLH o GUS, determinado por *western blot* sobre extractos de proteínas procedentes de parches de hoja agroinfiltradas (**FIG. 7E**). El epítipo añadido a P25 no alteró el fenotipo de necrosis exhibido en presencia de otros VSRs, aunque la aparición de esta respuesta sí se demoró levemente, de 1-2 días. Para determinar si P25 presenta efectos sobre la

acumulación de los otros VSRs coagroinfiltrados con ella, se realizaron análisis por *western blot* con anticuerpos específicos para detectar PPV HC, y con ellos se determinó la acumulación de PPV HC y HCLH (**FIG. 7F**). La presencia de un supresor del silenciamiento débil como es P25 tuvo efectos inapreciables sobre la acumulación de PPV HC y de HCLH. La acumulación de PPV HC fue superior a la de HCLH tanto en presencia de P25 como sin ella, tal y como se ha descrito previamente para la expresión transitoria de mutantes de PPV HC afectados en su actividad supresora, los cuales acaban por silenciarse post transcripcionalmente (González-Jara *et al.*, 2005). En cambio, coagroinfiltrada con un supresor fuerte como es P19, HCLH fue capaz de acumularse a niveles equivalentes a los de la forma silvestre PPV HC (Valli *et al.*, 2014). Puesto que la coexpresión de P25 no alteró de forma significativa la acumulación de PPV HC, los niveles de acumulación de este supresor en presencia de P25 seguramente no fueron un factor significativo por sí mismo en la necrosis inducida por la combinación.

Para confirmar que efectivamente la respuesta de necrosis inducida por P25 es dependiente de dosis, se llevaron a cabo una serie de experimentos de agroinfiltración de la mezcla P25/PPV HC con diluciones de P25, en los que las cantidades decrecientes de P25 se sustituyeron por cantidades crecientes de GUS, manteniendo constante la cantidad de PPV HC (proporciones P25/GUS de 7:3, 1:1 y 3:7). La necrosis se cuantificó mediante ensayos de liberación de electrolitos, observándose reducciones en la liberación a medida que se incrementaba la dilución del cultivo de *Agrobacterium* codificante de P25; la dilución 3:7, pese a ello, todavía indujo mayores niveles de liberación de electrolitos que la mezcla control PPV HC/GUS (**FIG. 7G**).

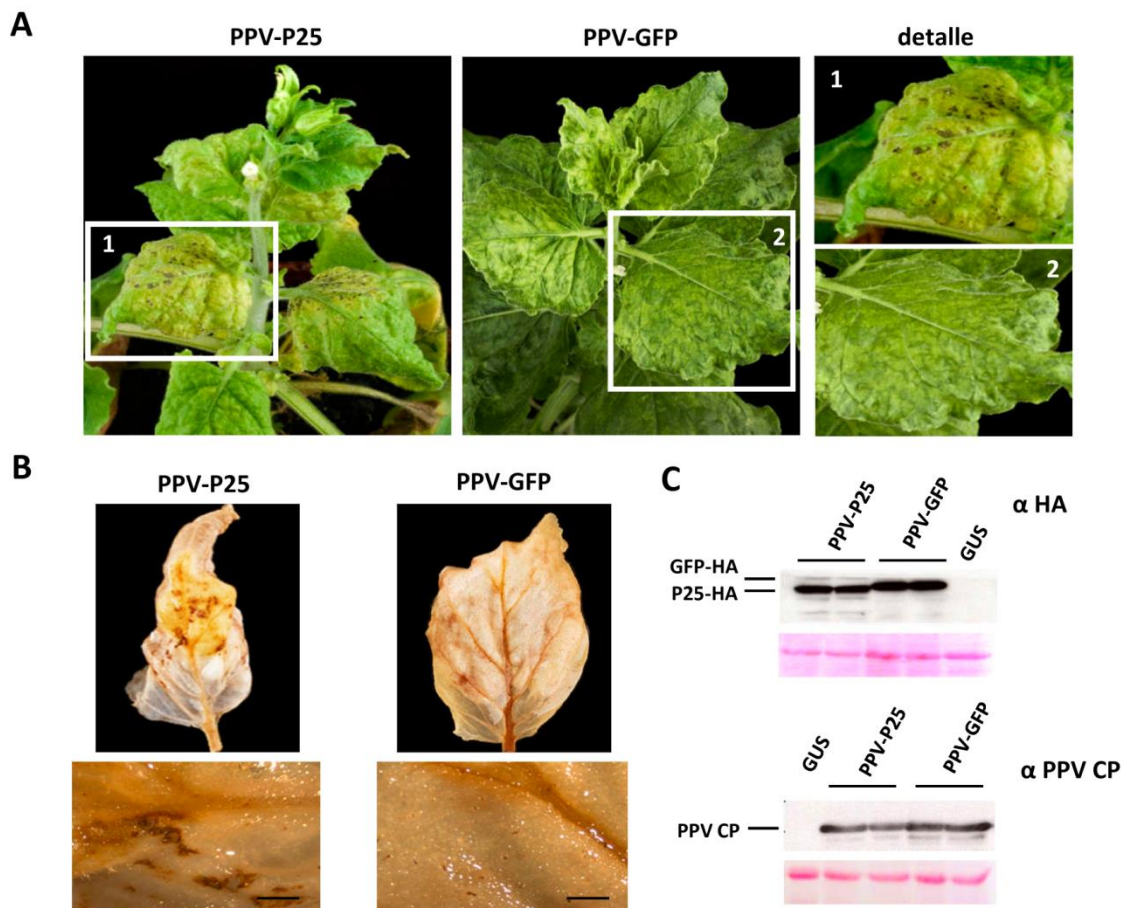
Estudios previos han mostrado como otra proteína del TGB de PVX, TGB3, sobreexpresada en *N. benthamiana* mediante agroinfiltración, induce necrosis relacionada con la aparición de estrés en el retículo endoplasmático (ER, de *Endoplasmatic reticulum*). Esta necrosis, sin embargo, se reduce cuando se coexpresa la chaperona BiP (de *Binding luminal protein*), residente en el ER (Ye *et al.*, 2011). Para determinar si el estrés en el ER desempeña algún papel en la muerte inducida por P25, se coagroinfiltró la combinación necrogénica P25/PPV HC con BiP o con

GUS, esta última como control. La sobreexpresión de BiP no conllevó cambios apreciables en la inducción de muerte, pues la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la combinación P25/PPV HC/BiP fue tan intensa como en la combinación P25/PPV HC/GUS (**FIG. 7H**).

También, en estudios previos, se ha determinado un incremento en la acumulación del mRNA de VPE-1 (de *Vacuolar processing enzyme-1*, cisteín proteasa con actividad de tipo caspasa-1) en la respuesta HR inducida durante la infección de plantas de tabaco con TMV (de *Tobacco mosaic tobamovirus*) (Hatsugai *et al.*, 2004). Para determinar si la expresión de P25 afecta a los niveles de acumulación del mRNA de VPE-1, se llevaron a cabo análisis por *northern blot* sobre extractos de RNA total procedentes de parches agroinfiltrados con GUS, P25, PPV HC o la combinación P25/PPV HC. El *northern blot* mostró como la acumulación del mRNA de VPE-1 se encontraba mayormente inhibida en los parches agroinfiltrados con P25/PPV HC, y en menor extensión también en los parches agroinfiltrados solo con P25, entre los 2 y 6 dpa (**FIG. 7I**).

#### **4.1.3. P25 es el principal determinante de patogenicidad implicado en la inducción de respuestas de tipo HR en los sinergismos asociados a PVX**

La expresión de la proteína PPV HC a partir de un vector PVX es suficiente para inducir un incremento de la virulencia de este virus, llevando a la aparición de SN (González-Jara *et al.*, 2005). Para determinar si la expresión de la proteína P25 a partir de un vector potyviral podría conducir también a estos incrementos de virulencia y a la aparición de SN, se llevó a cabo la inserción de P25 en un vector PPV modificado (PPV-P25), el cual expresa una versión de P25 fusionada al epítipo HA (P25-HA). Como control, se llevó a cabo la inserción de la secuencia de GFP en el mismo vector PPV (PPV-GFP), el cual expresa GFP-HA. Cuando se agroinfiltraron estos virus en *N. benthamiana*, aunque las hojas inoculadas no exhibieron alteraciones notables, las hojas sistémicas no inoculadas pronto comenzaron a mostrar síntomas de mosaico suaves, a los 7 dpa, con ambos virus quiméricos. Más tarde, la expresión de P25 a partir del virus PPV-P25 ocasionó un



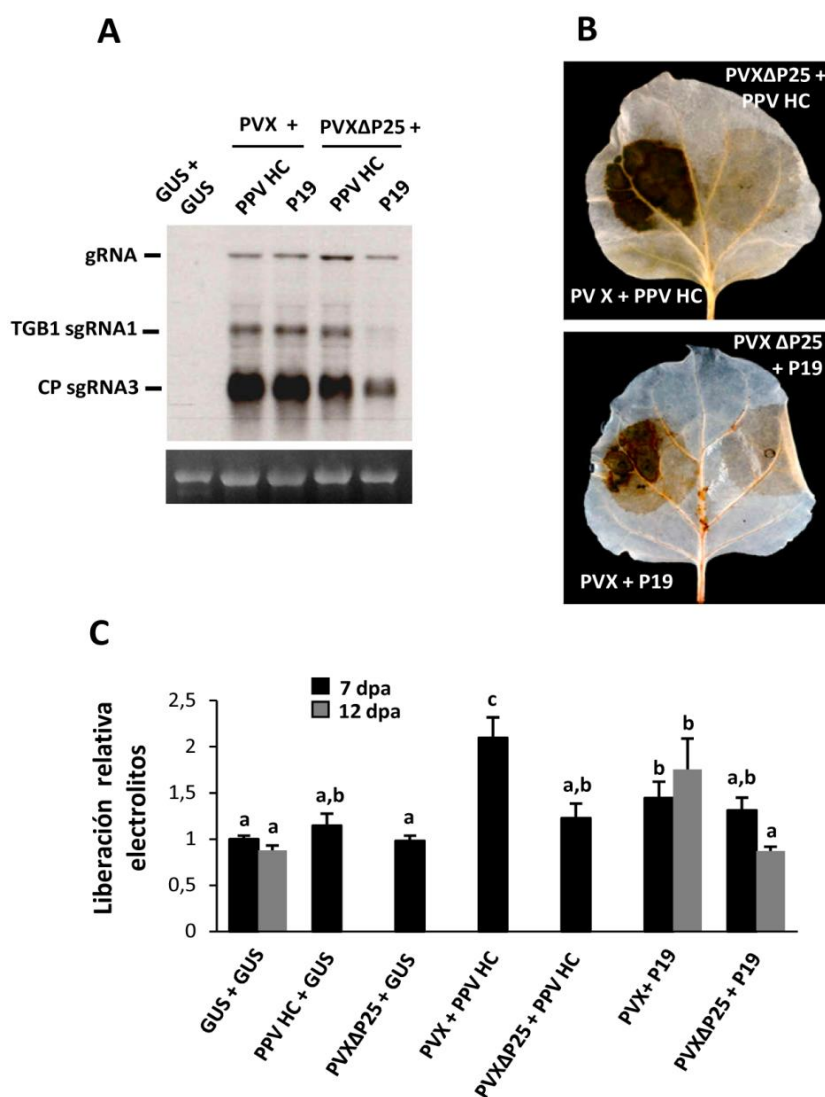
**FIGURA 8.** La expresión de PVX P25 a partir de un vector PPV incrementa la gravedad de los síntomas en *N. benthamiana*. **A.** Imágenes representativas de los síntomas inducidos en *N. benthamiana* por la infección con la quimera PPV-P25 (izquierda) o con la quimera control PPV-GFP (derecha), a los 15 dpa. **B.** Imágenes correspondientes a hojas sistémicas procedentes de plantas infectadas con PPV-P25 o con PPV-GFP, teñidas con solución DAB, a los 15 dpa (paneles superiores). Los fenotipos representativos se muestran en imágenes ampliadas (paneles inferiores; barra de escala de 0,5 mm en la esquina inferior derecha de cada imagen). **C.** Análisis por *western blot* de extractos obtenidos a partir de hojas sistémicas infectadas con PPV-P25 o con PPV-GFP, a los 15 dpa, y analizados con anticuerpos anti-HA (*western blot* superior, marcado como  $\alpha$ HA; muestra la acumulación de los productos GFP-HA y P25-HA expresados por la quimera correspondiente), o con anticuerpos anti-PPV CP (*western blot* inferior, marcado como  $\alpha$ PPV CP). Los paneles situados inmediatamente debajo de cada hibridación muestran la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.

empeoramiento notable de los síntomas, incluido fuerte mosaico, rizado y reducción del tamaño de las hojas, que pronto evolucionaron hacia la aparición de moteados necróticos en las hojas sistémicas, a 15 dpa, sin

que se observase un agravamiento equivalente de los síntomas en las plantas infectadas con la quimera control PPV-GFP (**FIG. 8A**). En concordancia con estas observaciones, cuando se tiñeron con DAB las hojas sistémicas de plantas infectadas con PPV-P25 estas mostraron una producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mucho más intensa que las procedentes de plantas infectadas con la quimera control PPV-GFP (**FIG. 8B**). El análisis por *western blot* de los extractos de proteínas procedentes de hojas sistémicas infectadas mostraron que las proteínas P25-HA o GFP-HA efectivamente se estaban acumulando en estas plantas, a los 15 dpa (**FIG. 8C**). La acumulación viral, evaluada en estas mismas muestras a través de la cantidad de proteína PPV CP, no mostró diferencias importantes entre ambas quimeras, lo que permite descartar que el fenotipo de necrosis exhibido por PPV-P25 sea debido a una mayor acumulación de esta quimera, en relación al control PPV-GFP. Por tanto, P25, como muchos otros VSRs expresados a partir del vector PVX, actúa como determinante de virulencia en *N. benthamiana* cuando se expresa a partir de un vector PPV.

Para determinar si otras proteínas potexvirales distintas a P25 podrían contribuir a la respuesta de tipo HR inducida por las combinaciones PVX/VSRs, se obtuvo una versión del virus PVX mutada en la ORF codificante de P25, denominada PVXΔP25. PVXΔP25 expresa una forma de P25 delecionada en C-terminal, debido a la presencia de un codón de parada prematuro. Los cultivos de agrobacterias con PVX o PVXΔP25 se mezclaron con los de PPV HC o P19, y las mezclas se agroinfiltraron en *N. benthamiana* en lados opuestos de una misma hoja, con el objetivo de llevar a cabo una comparación directa entre la necrosis inducida por ambos virus. Se consideró, hipotéticamente, que la coexpresión de un VSR como PPV HC o P19 podría complementar funcionalmente al virus PVXΔP25, defectivo en la actividad supresora del silenciamiento por la falta de una P25 funcional (Bayne *et al.*, 2005). Esta hipótesis se confirmó hasta cierto punto, pues tal y como se muestra en la **FIG. 9A** la acumulación del RNA de PVXΔP25 en presencia de PPV HC o de P19 fue similar a la de PVX en combinación con PPV HC o P19, a 6 dpa. La menor acumulación de los sgRNAs de PVXΔP25 en presencia de P19 podría deberse a que la

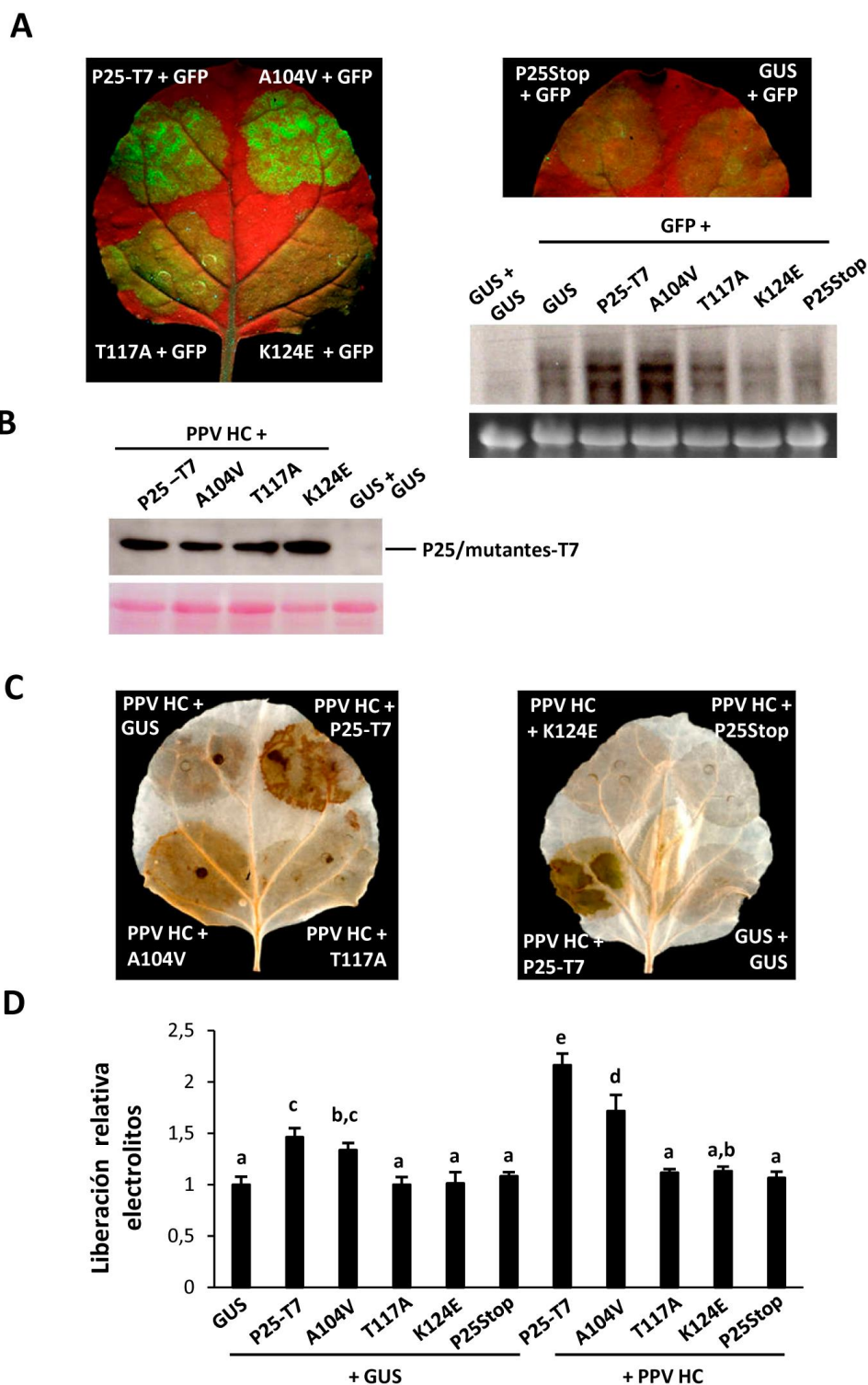
supresión del silenciamiento sobre PVX $\Delta$ P25 es ejercida de forma menos efectiva por P19 que por PPV HC. Sin embargo, mientras que las combinaciones de PVX con PPV HC o con P19 originaron una intensa necrosis asociada a la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 7 y 12 dpa, respectivamente, ni PPV HC ni P19 fueron capaces de incrementar la virulencia de PVX $\Delta$ P25 (**FIG. 9B**). De acuerdo con estos resultados, la liberación de electrolitos de los parches agroinfiltrados con PVX $\Delta$ P25/VSRs fue bastante inferior a la registrada para las combinaciones de PVX con PPV HC (7 dpa) o con P19 (12 dpa) (**FIG. 9C**). Es más, la liberación de electrolitos en los parches agroinfiltrados con combinaciones PVX $\Delta$ P25/VSRs fue equivalente a la observada para los parches agroinfiltrados con PVX/GUS, o simplemente con GUS. Todos estos resultados indican que P25 es el principal factor inductor de la respuesta de tipo HR en los sinergismos asociados a PVX.



**FIGURA 9 (en la página anterior). PVX $\Delta$ P25 expresado en combinación con VSRs no induce respuestas de tipo HR.** En hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltró GUS en solitario, o combinaciones de PVX con GUS, PPV HC o TBSV P19 (P19), o combinaciones de PVX $\Delta$ P25 con GUS, PPV HC o P19. **A.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total obtenidos a partir de parches de hoja agroinfiltrados con combinaciones de PVX más PPV HC o P19, o con combinaciones de PVX $\Delta$ P25 más PPV HC o P19, a los 6 dpa. El RNA total (2  $\mu$ g) se hibridó con una DIG-ribsonda complementaria a la secuencia de la PVX CP. Al lado de las imágenes de cada hibridación aparece señalado el RNA genómico (gRNA) y los dos principales RNAs subgenómicos (sgRNAs): el TGB1 sgRNA1 (sgRNA a partir del cual se expresa TGB1, la proteína P25) y el CP sgRNA3 (sgRNA a partir del cual se expresa la CP). Debajo del *northern blot* se muestra el gel previo en el que se corrió el extracto de RNA total, teñido con bromuro de etidio, a modo de control de carga. **B.** Una serie de hojas con fenotipos representativos se tiñeron con solución DAB a los 7 dpa (panel superior, combinaciones con PPV HC) o a los 12 dpa (panel inferior, combinaciones con P19). **C.** La liberación de electrolitos de discos de hoja agroinfiltrados con las diferentes combinaciones se analizaron a los 7 y 12 dpa. El gráfico muestra el valor medio  $\pm$  desviación estándar de 10 réplicas, cada una de ellas consistente en 4 plantas que recibieron el mismo tratamiento, en dos experimentos independientes. Las diferencias entre las medias de distintas combinaciones se analizaron independientemente para 7 o 12 dpa, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.4. La actividad supresora del silenciamiento de P25 es necesaria para la inducción de respuesta de tipo HR

Para evaluar si la actividad supresora del silenciamiento génico de P25 es necesaria para la inducción de respuestas de tipo HR, se obtuvieron tres mutantes puntuales de P25-T7, con las mutaciones A104V, T117A y K124E, los cuales han sido descritos previamente (Bayne *et al.*, 2005). Además, para excluir la participación del mRNA codificante de P25 en la inducción de necrosis también se obtuvo un mutante con un codón de parada prematuro (P25Stop). Todos estos mutantes se evaluaron en su capacidad para inducir necrosis. Estudios previos mostraron como los mutantes T117A y K124E eran deficientes en la actividad supresora del silenciamiento; este aspecto se confirmó en el presente trabajo coexpresando dichos mutantes con la proteína reportera GFP, y analizando los niveles de acumulación de su mRNA. Como era esperable, solo el mutante A104V mostró actividad supresora del silenciamiento de GFP, mientras que T117A y K124E fueron deficientes en esta actividad (**FIG. 10A**).



**FIGURA 10.** La inducción de respuestas de tipo HR correlaciona con la actividad supresora de PVX P25. **A.** Se agroinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con GUS en solitario o con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* con construcciones binarias, para la expresión de una proteína reportera GFP junto con versiones de P25 con el epítipo T7, bien su versión silvestre (P25-T7), o bien mutada en A104V, T117A o K124E, o junto con el mutante P25Stop (codón de parada prematuro), tal y como se indica en las imágenes. A los 3 dpa se obtuvieron imágenes de fenotipos representativos mediante iluminación UV

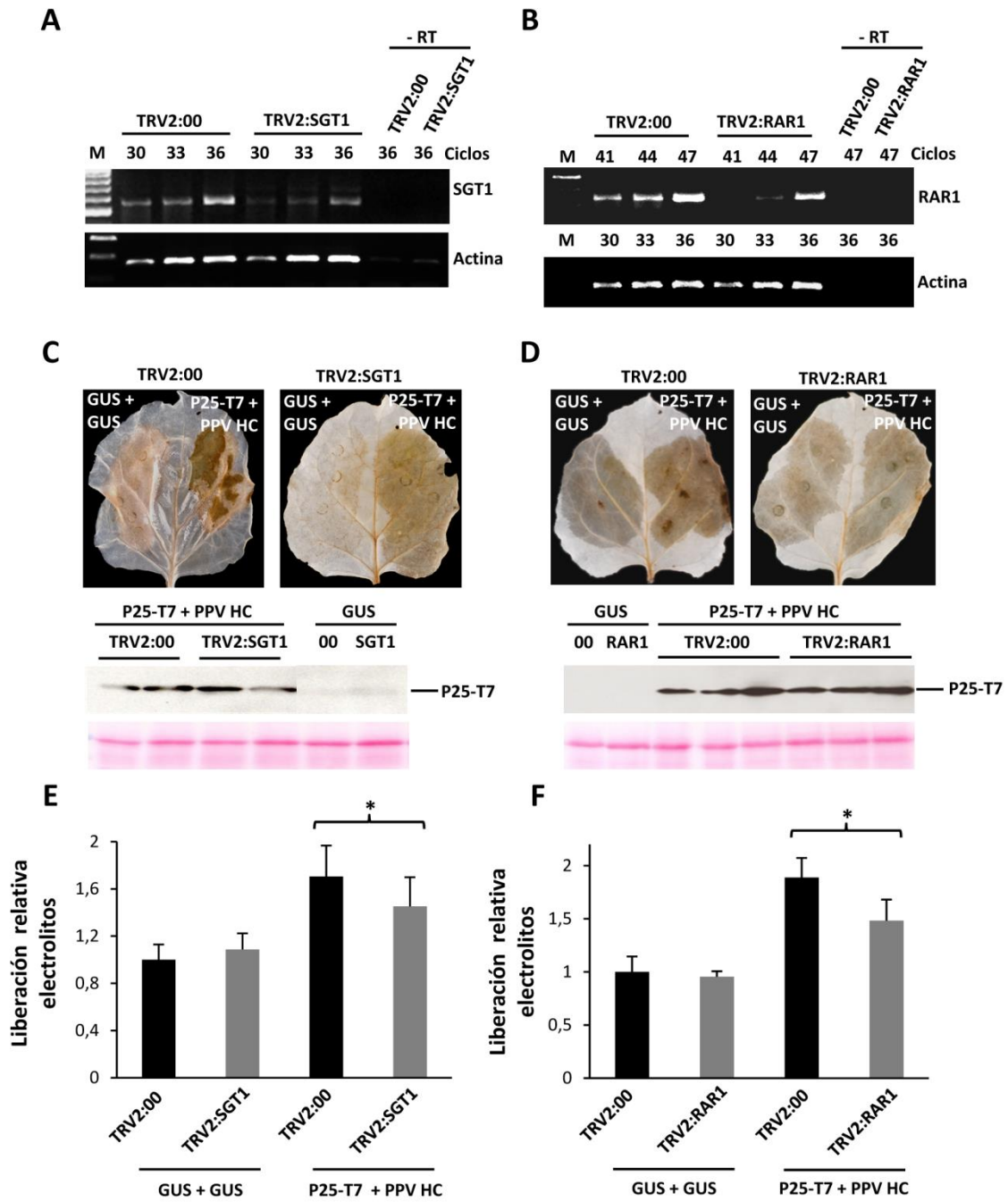
(paneles superiores). A partir de estos parches agroinfiltrados se obtuvieron extractos de RNA total, de los que 10 µg se analizaron por *northern blot*, para lo que se hibridaron con una DIG-ribosonda complementaria al mRNA de GFP (panel inferior). Debajo del *northern blot* se muestra el gel previo en el que se corrió el extracto de RNA total, teñido con bromuro de etidio, a modo de control de carga. **B.** Análisis *western blot* de extractos obtenidos a partir de discos de hoja agroinfiltrados con las combinaciones de PPV HC con P25-T7, o con sus formas mutadas A104V, T117A o K124E, o con P25Stop, a los 6 dpa, empleando anticuerpos anti-T7. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. **C.** Se agroinfiltraron hojas con GUS en solitario o con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* para la expresión de PPV HC junto con P25-T7 silvestre o sus mutantes A104V, T117A, K124E o P25Stop, o junto con GUS. Estas hojas se tiñeron posteriormente con solución DAB, a los 9 dpa. **D.** Determinación de la liberación de electrolitos a 9 dpa en parches de hoja agroinfiltrados con combinaciones de PPV HC o GUS junto con P25-T7 silvestre o sus formas mutadas A104V, T117A, K124E o P25Stop. Se agroinfiltró igualmente GUS en solitario a modo de control. El gráfico representa los promedios  $\pm$  desviación estándar de 18 réplicas, cada una de ellas con material procedente de cuatro plantas, que recibieron el mismo tratamiento en tres experimentos independientes. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente a través del test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ).

Para el análisis se agroinfiltraron versiones de P25 silvestre o mutadas marcadas con el epítipo T7, en combinación con PPV HC o con GUS, estas últimas a modo de control. La combinación del mutante A104V con PPV HC dio lugar a la aparición de necrosis y a la liberación de electrolitos, si bien ligeramente menor que la inducida por la forma no mutada, pero todavía muy por encima de la registrada para la combinación control GUS o la combinación de PPV HC con P25Stop (**FIG. 10C** y **10D**). En cambio, los parches agroinfiltrados con la combinación de PPV HC y el mutante T117A o el K124E no fueron capaces de inducir necrosis, y los niveles de electrolitos registrados fueron similares al de los parches controles. La agroinfiltración de los mutantes T117A o K124E en presencia de la proteína control GUS también dieron lugar a una liberación de electrolitos menor que la que indujeron las combinaciones de GUS con la forma silvestre de P25 o con el mutante A104V. Para descartar que las diferencias observadas en la necrosis fueran debidas a diferencias en los niveles de acumulación para cada mutante, se analizó la estabilidad de los mismos mediante *western*

*blot*, empleando anticuerpos anti-T7, observándose niveles equivalentes a los de la forma silvestre para todos ellos (**FIG. 10B**). En conjunto, todos estos resultados sugieren que la actividad supresora de la proteína P25 es necesaria para activar las respuestas de tipo HR en *N. benthamiana*.

#### **4.1.5. Los factores RAR1 y SGT1 regulan la respuesta de tipo HR inducida por P25 y la virulencia de la quimera PVX-HC**

El funcionamiento de los factores de resistencia (R) depende en muchos casos de su asociación a una serie de complejos con función chaperona, constituidos por varias proteínas entre las que se incluyen los factores SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) y RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*) (Liu *et al.*, 2002*a,b*). Para analizar el papel desempeñado por estos dos factores en la respuesta de tipo HR inducida por la combinación P25/PPV HC, se clonaron separadamente unos fragmentos homólogos a *SGT1* y *RAR1* de *N. benthamiana* en vectores basados en el virus TRV (de *Tobacco rattle tobravirus*), con el objetivo de conseguir su silenciamiento mediante la técnica VIGS (de *Virus-induced gene silencing*). Una serie de plantas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron con el vector recombinante (TRV2:SGT1 o TRV2:RAR1) o con el vector vacío (TRV2:00) como control. A los 14 días tras infiltrar los vectores TRV se llevaron a cabo análisis de RT-PCR semicuantitativa sobre extractos de RNA total obtenidos de las hojas sistémicas, con el objetivo de confirmar el silenciamiento de SGT1 o de RAR1. Tal y como se muestra en las **FIG. 11A** y **11B**, los niveles de sus respectivos transcritos efectivamente se redujeron en relación al de los controles agroinfiltrados con los vectores vacíos TRV2:00. Posteriormente, sobre estas mismas plantas silenciadas y sobre los controles no silenciados se agroinfiltraron las combinaciones P25-T7/PPV HC o GUS, esta última a modo de control, en lados opuestos de una misma hoja. El desarrollo de la respuesta de necrosis y de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por P25-T7/PPV HC se atenuó en las plantas silenciadas en SGT1 o en RAR1, en comparación con las plantas controles no silenciadas, a los 9 dpa (**FIG. 11C** y **11D**). En concordancia con estas observaciones, las plantas silenciadas en SGT1 o en RAR1 infiltradas con P25-T7/PPV HC



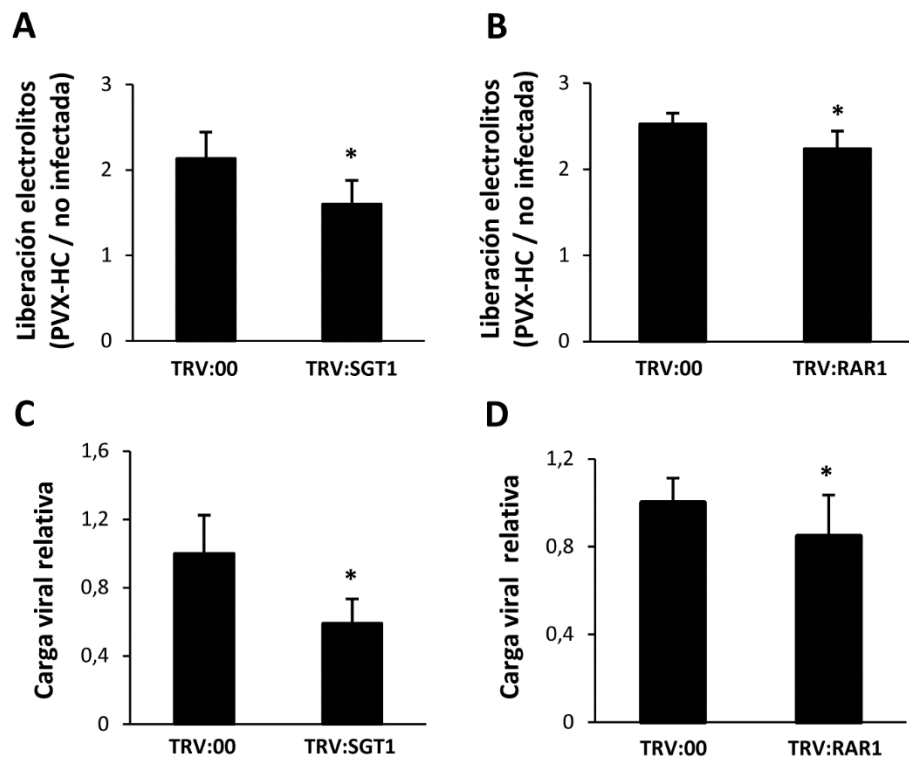
**FIGURA 11.** El silenciamiento de los factores SGT1 o RAR1 en *N. benthamiana* atenúa la respuesta de tipo HR inducida por la combinación PVX P25/PPV HC. Las plantas de *N. benthamiana* se infiltraron con cultivos de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para la expresión de TRV2:SGT1, TRV2:RAR1 o TRV2:00, este último sin inserto, empleado como control. El silenciamiento de los transcritos de SGT1 (A) y de RAR1 (B) se monitorizó a través de RT-PCR semicuantitativa realizada sobre extractos de RNA total obtenidos a partir de hojas sistémicas, a los 14 días tras la infiltración de las construcciones TRV. La misma reacción de retrotranscripción (RT) utilizada para amplificar SGT1 o RAR1, se empleó igualmente para amplificar transcritos de actina, a modo de control. El número de ciclos de PCR se indica debajo de cada tratamiento. (-RT) indica las reacciones control llevadas a cabo sobre muestras sin

retrotranscriptasa. Las hojas de plantas infiltradas previamente con TRV2:SGT1 o TRV2:RAR1, y las plantas control no silenciadas, se agroinfiltraron a los 14 días con la combinación necrogénica P25-T7/PPV HC o con GUS en solitario, este último a modo de control, en mitades opuestas de una misma hoja. Las hojas de plantas silenciadas en SGT1 (**C**) o en RAR1 (**D**) y posteriormente agroinfiltradas con las combinaciones señaladas, se tomaron y tiñeron con solución DAB a los 9 dpa (paneles superiores). Se efectuaron análisis *western blot* sobre extractos obtenidos a partir de parches de hoja agroinfiltrados, tomados a los 6 dpa. En la hibridación se emplearon anticuerpos anti-T7 (paneles intermedios). Los paneles situados inmediatamente debajo de cada hibridación muestran las membranas teñidas con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. A los 9 dpa, también se efectuaron medidas de la liberación de electrolitos sobre discos de hoja agroinfiltrados con las combinaciones P25-T7/PPV HC o con GUS en solitario, obtenidos a partir de plantas silenciadas en SGT1 (**E**) o en RAR1 (**F**), así como de sus respectivos controles no silenciados. Los gráficos muestran los valores promedios  $\pm$  desviación estándar correspondientes a 12 réplicas, cada una de ellas con material procedente de cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento en dos experimentos independientes. Las diferencias entre pares de medias se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney (el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre las plantas silenciadas en SGT1 o RAR1 y sus respectivos controles no silenciados, para cada combinación de proteínas,  $P < 0,05$ ).

mostraron una reducción significativa en la liberación de electrolitos, en comparación con las plantas control (**FIG. 11E y 11F**). Mediante análisis *western blot* se determinó que la acumulación de P25-T7 en las plantas silenciadas en SGT1 o en RAR1 era equivalente al de los controles no silenciados, lo que permite descartar una variación en la acumulación de P25-T7 como responsable de las diferencias de necrosis observadas (**FIG. 11C y 11D**, paneles inferiores).

Para evaluar si SGT1 y RAR1 están también implicados en la SN inducida en el sinergismo PVX-potyvirus, se agroinfiltró la quimera PVX-HC (PVX con PPV HC) en plantas silenciadas en uno de estos dos factores y en controles no silenciados. A los 11 dpa, el número de plantas afectadas por la necrosis alcanzó entre el 95-100% tanto en plantas controles como en plantas silenciadas, aunque el desarrollo de la muerte celular en las hojas silenciadas en SGT1 o en RAR1 se atenuó en comparación con el de los controles no silenciados, medido a través de la liberación de electrolitos, también a 11 dpa (**FIG. 12A y 12B**). Este análisis se realizó sobre cinco réplicas obtenidas a partir de 20 plantas

por tratamiento, y el experimento se repitió un mínimo de dos veces. En estas mismas plantas, se determinó también si la reducción del fenotipo de necrosis estaba asociada a cambios en la acumulación de la quimera PVX-HC, para lo que se analizaron por PCR cuantitativa (qRT-PCR) extractos de RNA total obtenidos a partir de hojas sistémicas de plantas infectadas, silenciadas en SGT1, en RAR1 o en controles no silenciados (**FIG. 12C** y **12D**). Los ensayos de qRT-PCR mostraron como la quimera PVX-HC alcanzó en estas plantas silenciadas niveles ligeramente inferiores a los que presentó en los controles no silenciados, a 11 dpa.

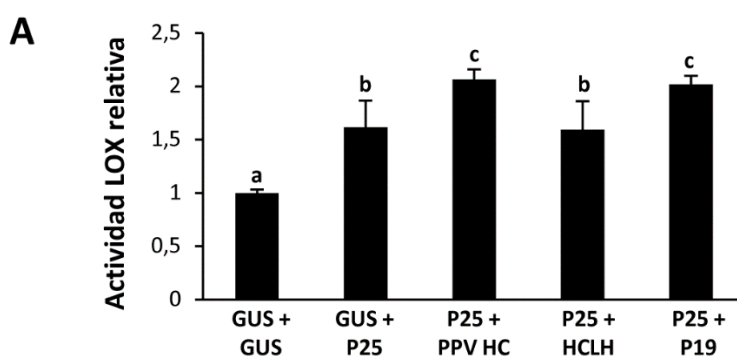


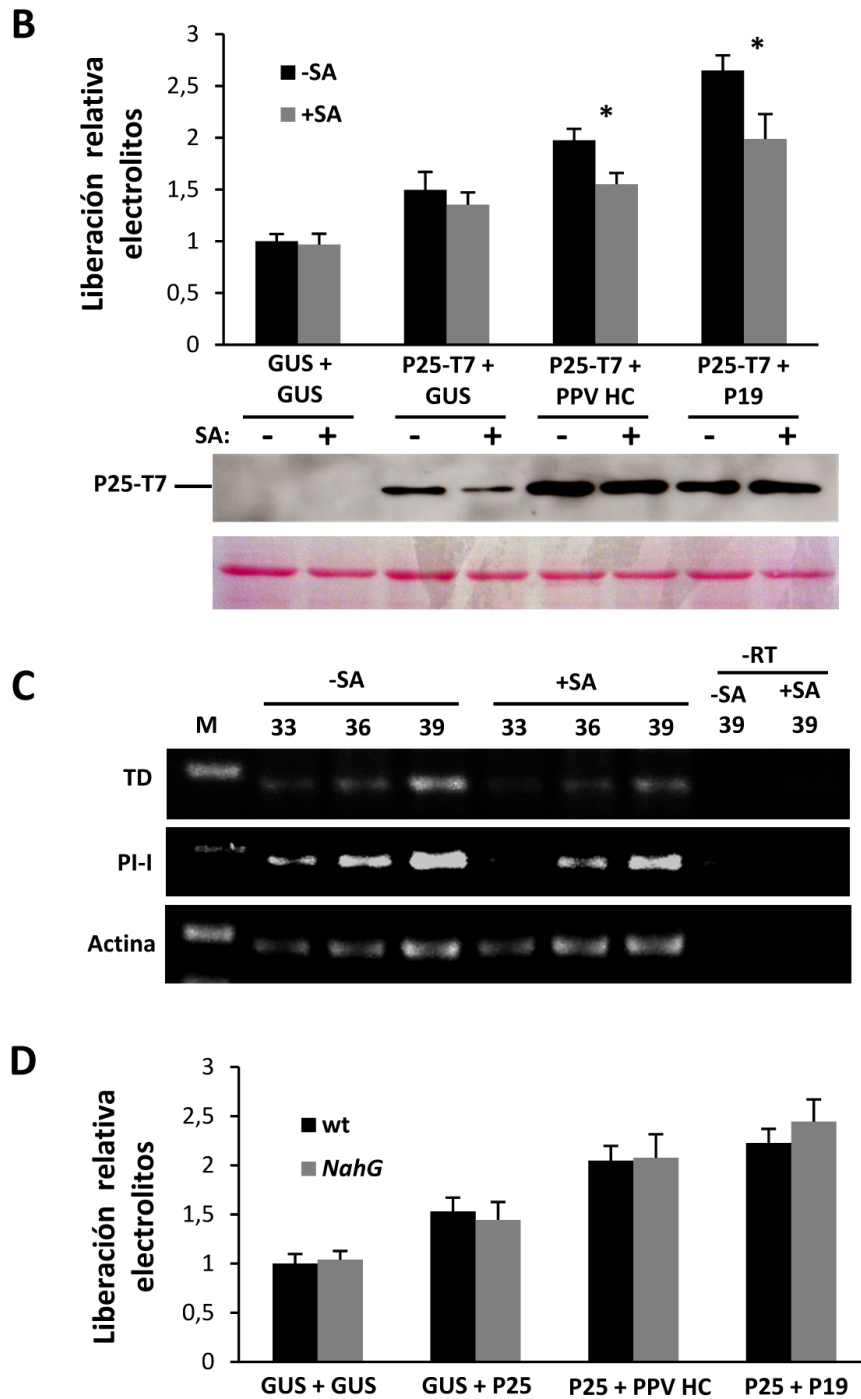
**FIGURA 12.** El silenciamiento de los factores SGT1 o RAR1 en *N. benthamiana* atenúa la SN inducida por la quimera PVX-HC. Las plantas de *N. benthamiana* se infiltraron con cultivos de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para la expresión de TRV2:SGT1, TRV2:RAR1 o TRV2:00, este último sin inserto, a modo de control. Estas mismas plantas se infectaron mediante agroinfiltración con PVX-HC, o se agroinfiltraron con GUS (control no infectado), a los 14 días tras haber iniciado el silenciamiento. Posteriormente, a los 11 días tras la agroinfiltración de PVX-HC o de GUS (11 dpa) se analizó la liberación de electrolitos, a partir de discos de hoja obtenidos de estas plantas. La liberación de electrolitos de plantas silenciadas en SGT1 (**A**) o en RAR1 (**B**), así como de sus respectivos controles no silenciados, se expresó de forma relativa, como el

cociente entre los niveles de liberación en plantas infectadas con PVX-HC frente a los de las plantas no infectadas (agroinfiltradas con GUS). Se analizó mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) la acumulación de PVX-HC en extractos de RNA total, obtenidos a partir de hojas sistémicas de plantas silenciadas en SGT1 (**C**) o en RAR1 (**D**), en comparación con sus respectivos controles no silenciados, a 11 dpa. Los gráficos representan los valores promedios  $\pm$  desviación estándar de cinco réplicas, cada una con material procedente de cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre pares de medias se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney (el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ).

#### 4.1.6. La coexpresión de P25 con VSRs potencia la actividad lipoxigenasa (LOX)

La SN se ha descrito ligada a incrementos en la actividad LOX, en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el par sinérgico PVX-PVY, lo que sugiere la implicación de la señalización por la hormona ácido jasmónico (JA) en la manifestación de síntomas (García-Marcos *et al.*, 2013). En el presente trabajo se ha analizado la actividad LOX en parches de hoja agroinfiltrados con P25 en combinación con PPV HC, HCLH, P19 o GUS, a 7 dpa (**FIG. 13A**). El nivel de actividad enzimática fue mayor en las combinaciones que dieron lugar a respuestas de tipo HR, es decir, en P25 con PPV HC o P19, en comparación con las combinaciones de P25 con HCLH o GUS. Posteriormente se comprobó si el tratamiento con ácido salicílico (SA) podría afectar a la necrosis inducida por P25-T7/VSRs, ya que esta hormona actúa como regulador positivo de numerosas respuestas defensivas. El tratamiento con SA dio lugar a una disminución estadísticamente significativa en la liberación de electrolitos en los parches de hoja infiltrados con las combinaciones de





**FIGURA 13** (comienza en la página anterior). La agroinfiltración de las combinaciones PVX P25/VSRs potencia en *N. benthamiana* la actividad lipoxigenasa (LOX). A. Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para la expresión de PVX P25 junto con GUS, PPV HC, PPV HCLH (HCLH) o TBSV P19 (P19). La actividad LOX se analizó sobre extractos procedentes de discos de hoja agroinfiltrados, a los 7 dpa, empleando ácido linoleico (0,1 mM) como sustrato. El gráfico representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de seis réplicas, cada una de ella con material procedente de cuatro

plantas, que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). **B.** Sobre hojas agroinfiltradas con GUS en solitario, o con combinaciones de cultivos de P25-T7 con GUS, PPV HC o con P19, se pulverizó una solución de ácido salicílico (SA) (2 mM) o agua (para las plantas control). Se tomaron discos de hoja y se analizó la liberación de electrolitos a los 8 dpa (panel superior). También se efectuó un análisis por *western blot* sobre extractos derivados de estos mismos parches agroinfiltrados, a 6 dpa, empleando para ello anticuerpos anti-T7 (panel medio). Inmediatamente debajo de la imagen de la hibridación, se muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. **C.** Análisis de RT-PCR semicuantitativa para determinar la represión de los genes treonina desaminasa (*TD*) e inhibidor de la proteínasa I (*PI-I*), en las plantas tratadas con SA en relación a los controles. La misma reacción de retrotranscripción (RT) utilizada para amplificar TD o PI-I, se empleó igualmente para amplificar transcritos de actina, a modo de control. El número de ciclos de PCR se indica debajo de cada tratamiento. (-RT) indica la reacción control sin retrotranscriptasa. **D.** Se agroinfiltraron plantas transgénicas NahG o silvestres (wt) con las combinaciones de cultivos descritos más arriba. A los 8 dpa se tomaron discos de hoja agroinfiltrados y se analizó su liberación de electrolitos. El gráfico representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de 12 réplicas, cada una de ellas con material procedente de cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento en dos experimentos independientes. La diferencias entre pares de medias, correspondientes a plantas tratadas con SA o controles no tratados, o a plantas NahG frente a wt, se analizaron estadísticamente mediante el test t de Student (los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ).

P25-T7 con PPV HC o con P19, en relación a los controles no tratados (**FIG. 13B**, panel superior). En estos experimentos, al igual que en los anteriores, también se comprobó que efectivamente los niveles de acumulación de P25-T7 en las plantas tratadas con SA era comparable al de las plantas control no tratadas, lo que de nuevo descarta variaciones en la acumulación de proteína como factor responsable de la reducción observada en la necrosis (**FIG. 13B**, panel inferior). La activación de la señalización por SA actúa de forma antagónica sobre la ruta de señalización por JA y sobre su propia biosíntesis (Thaler *et al.*, 2012). Para determinar si la reducción de necrosis observada en plantas tratadas con SA respondía a una inhibición de las respuestas mediadas por JA, se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa la expresión de una serie de genes de respuesta a JA, como son *TD* (de *Threonine deaminase*) y *PI-I* (de *Proteinase inhibitor-I*). Para ello se obtuvieron extractos de RNA total a partir de parches de hoja agroinfiltrados con P25-T7/PPV HC derivados

de plantas tratadas con SA o de controles no tratados. Como era de esperar, el tratamiento con SA reprimió la expresión de *TD* y *PI-I* en comparación con las plantas control (**FIG. 13C**). Para evaluar la contribución del SA a la necrosis inducida por P25/VSRs, se agroinfiltraron estas combinaciones en plantas transgénicas NahG de *N. benthamiana*, las cuales no acumulan SA. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la liberación de electrolitos en estas plantas NahG y la de los controles wt (silvestres). Estos resultados sugieren que el efecto del SA sobre la necrosis inducida por P25/VSRs depende de la relación antagónica existente entre las rutas de señalización de esta hormona y la del JA (**FIG. 13D**).

## 4.2. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se llevaron a cabo ensayos de agroinfiltración para reproducir en el tejido local la respuesta de SN inducida en *N. benthamiana* durante la interacción sinérgica PVX-potyvirus, y por quimeras de PVX que expresan proteínas VSR (Scholthof *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2004). En los trabajos realizados se observó un incremento y/o estabilización de los sgRNAs de PVX, uno de los productos de la replicación viral, cuando PVX se coexpresó con PPV HC o con P19, y también durante la infección mixta PVX-PPV. Sin embargo, no se observaron variaciones importantes en la acumulación del gRNA de PVX. Por ello, la interacción PVX-potyvirus en *N. benthamiana* podría definirse como sinergismo en un sentido amplio, en el que tanto la gravedad de los síntomas como los niveles de acumulación de algunos de los productos virales se incrementan. El grado de acumulación de los RNAs de PVX parece reflejar una accesibilidad diferencial a los mismos por parte de la maquinaria de silenciamiento génico. Esto sugiere que la compartimentalización subcelular del gRNA de PVX en complejos de replicación viral, asociado a compactos sistemas membranosos (Tilsner *et al.*, 2012) puede jugar un papel importante en la limitación de la accesibilidad de la maquinaria de silenciamiento de RNA a su potencial diana. Alternativamente, la encapsidación total o parcial del gRNA

podría protegerlo del silenciamiento. Todo ello llevaría aparejada la ausencia de efectos de un VSR sobre la acumulación del gRNA. En cambio, los sgRNAs, los cuales sí estaría sometidos a la acción del silenciamiento, sí experimentarían cambios apreciables en su nivel de acumulación en presencia de un VSR.

Más adelante, se puso de manifiesto como la expresión de la proteína P25, codificadas por el TGB1 sgRNA1, en presencia de VSRs de distintos virus es capaz de inducir respuestas de necrosis de tipo HR, en *Nicotiana* spp. Es más, P25 demostró actuar como factor capaz de incrementar la virulencia de un vector PPV hasta dar lugar a la aparición de síntomas de necrosis. Estos resultados sugieren que durante el sinergismo asociado a PVX, la aparición de respuestas de necrosis (es decir, la SN) podría ser resultado de una respuesta inmune atrasada inducida por P25, que tiene lugar solo cuando esta proteína alcanza un nivel umbral en etapas tardías de la infección, gracias a la acción de los VSRs. Este modelo contempla la SN como una respuesta defensiva ineficiente debida a un débil reconocimiento de la multiplicación del virus en etapas tempranas del proceso infectivo, o a un reconocimiento tardío, en el que los mecanismos defensivos activados no son lo suficientemente intensos como para restringir la propagación del virus. Más tarde, cuando el nivel de acumulación del factor implicado en este reconocimiento (P25) se incrementa gracias a la acción de los VSRs, se activa una respuesta de tipo HR sistémica, también ineficaz en la contención del patógeno, que finaliza con la muerte de la planta. La dependencia de dosis determinada para la SN en el presente trabajo no es una observación completamente nueva. Komatsu y colaboradores describieron como los síntomas de necrosis inducidos por PLAMV (de *Plantago asiatica mosaic potexivirus*), en *N. benthamiana*, dependen del nivel de acumulación de la RNA polimerasa dependiente de RNA viral (RdRp, de *RNA-dependent RNA polymerase*), cuyo dominio helicasa (HEL) es el determinante inductor de la respuesta de necrosis. El dominio polimerasa (POL) de RdRp, del que depende la replicación viral, modula de este modo los niveles de acumulación de las proteínas del virus, incluida la propia RdRp, y por tanto del dominio HEL inductor de necrosis (Komatsu *et al.*, 2011). En el caso concreto de la interacción

PVX-potyvirus, puede que la presencia de un VSR fuerte como es el HC potyviral reproduzca el efecto del dominio POL sobre la acción inductora de HEL descrito más arriba; este VSR potyviral incrementaría la acumulación de P25 más allá de cierto umbral, desencadenando respuestas de tipo HR. La expresión de P25 por parte de PVX es un proceso finamente regulado, con el objetivo de mantener bajos niveles de acumulación de esta proteína, a través de su expresión a partir del TGB1 sgRNA1 (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). El control de la expresión de P25 podría constituir una estrategia del virus para evitar efectos negativos sobre el hospedador, presentando pequeños cambios en los niveles del TGB1 sgRNA1 un impacto importante sobre la acumulación de la proteína. Este efecto de la acumulación de proteína sobre el grado de necrosis inducida se puso de manifiesto cuando P25 se expresó a distintos niveles, o cuando se agroinfiltró en presencia de VSRs o en ausencia de ellos, determinado como cambios en la liberación de electrolitos, indicador del grado de daño en la membrana celular.

Previamente se ha descrito como la sobreexpresión de la proteína TGB3 de PVX, mediante agroinfiltración, ocasiona lesiones necróticas en *N. benthamiana* (Ye *et al.*, 2011). Los resultados mostrados en la presente tesis, gracias al empleo del mutante PVX $\Delta$ P25, en el cual la ORF de TGB3 no se encuentra alterada, indican que la proteína P25 es el principal determinante de PVX implicado en la inducción de SN en los sinergismos asociados a PVX. Es más, a diferencia de lo observado para TGB3, la actividad inductora de necrosis de la combinación P25/PPV HC en *N. benthamiana* no disminuyó de forma apreciable en un examen *de visu* cuando se coexpresó con BiP, lo que hace improbable que el estrés en el ER sea la causa principal de esta necrosis, aunque no descarta su contribución al proceso mismo. En un contexto más amplio, es probable que la actividad inductora de necrosis de P25 contribuya a la exacerbación de síntomas descrita en otros estudios en los que también se ha hecho uso de formas recombinantes de PVX para la expresión de otros factores virales, entre ellos proteínas con actividad supresora del silenciamiento por RNA (Pfeffer *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Por tanto, deberían tomarse precauciones a la hora de evaluar proteínas víricas como determinantes de patogenicidad cuando se

expresan a partir de quimeras de PVX. Otra implicación que se deriva de este conjunto de resultados es que diferentes determinantes de patogenicidad no descritos aún suficientemente podrían ser responsables de otros casos de sinergismo, en los cuales un virus “ayudante” (de *helper*) codificante de VSRs fuertes (como los potyvirus) incrementaría la acumulación del virus codificante del factor de patogenicidad, o de alguno de los productos derivados de su replicación (Syller, 2012).

Todavía se desconocen los mecanismos por los que PVX P25 induce la SN, una vez alcanza unos niveles de acumulación umbral por acción de VSRs. Sin embargo, los resultados obtenidos apuntan hacia la posible existencia de un gen de resistencia *R*, en *Nicotiana* spp., cuyo producto sea capaz de reconocer P25 como factor de avirulencia *Avr*, en lo que sería un reconocimiento *Avr-R* imperfecto que daría lugar a respuestas de tipo HR ineficaces. Esto podría justificar que el silenciamiento de los factores SGT1 y RAR1 ocasione una disminución en la respuesta de tipo HR inducida por la combinación P25/PPV HC y en la SN inducida por la quimera PVX-HC. Los factores SGT1 y RAR1 son necesarios en numerosas respuestas defensivas contra virus iniciadas bajo la activación de factores *R* (Liu *et al.*, 2002a; Komatsu *et al.*, 2010). Es más, en trabajos previos, empleando el par sinérgico PVX-PVY (García-Marcos *et al.*, 2013), o en el presente trabajo, empleando las combinaciones P25/VSRs, la necrosis inducida ha ido acompañada de marcadores distintivos de la PCD registrada en las respuestas HR (Montillet *et al.*, 2005), entre ellos la acumulación de especies reactivas del oxígeno ( $H_2O_2$ ) y una mayor actividad LOX. Varias estudios previos han mostrado que en la HR de plantas pueden intervenir diferentes actividades de tipo caspasa (Hatsugai *et al.*, 2004, 2015; Jones y Dangl, 2006). Sin embargo, mientras que la acumulación de VPE-1 se incrementó de forma rápida y transitoria en etapas tempranas de la respuesta HR frente a TMV, el mRNA de VPE-1 se reprimió en presencia de P25, sugiriendo que VPE-1 no desempeña un papel relevante en la ejecución de la muerte celular inducida por P25.

La inmunidad vegetal está regulada por una compleja red de rutas de señalización interconectadas. De este modo, se decidió analizar si la ruta de señalización por SA estaba implicada de algún modo en la

regulación de la respuesta de tipo HR inducida por P25. La necrosis registrada en plantas NahG agroinfiltradas con combinaciones necrogénicas P25/VSRs fue equivalente a la obtenida en plantas wt, analizado a través de la liberación de electrolitos, lo que indica que la respuesta de tipo HR inducida por P25 no es dependiente de SA. El efecto de reducción de esta necrosis que sí se observó en plantas tratadas con SA podría atribuirse al efecto antagónico del SA sobre la señalización por JA (Thaler *et al.*, 2012). En este sentido, se ha descrito previamente la participación del metabolismo de oxilipinas en la ejecución de la SN inducida en la interacción sinérgica PVX-potyvirus (García-Marcos *et al.*, 2013).

En trabajos previos ha sido descrito el papel de PVX P25 como factor Avr, en genotipos de patata resistentes portadores del gen *Nb* (Malcuit *et al.*, 1999). Puesto que tanto *Nicotiana* spp. como *Solanum tuberosum* forman parte de la familia *Solanaceae*, muchos de cuyos miembros pueden actuar como hospedadores de PVX, no es descabellado pensar que el supuesto gen R implicado en el reconocimiento de P25 en *N. benthamiana* esté funcionalmente relacionado con el gen *Nb*, e incluso que puedan compartir homología estructural. Esta posibilidad se ve sustentada por los estudios de clonación de genes R, en los que ortólogos de conocidos genes R se han identificado en diversas especies de *Solanaceae* (Grube *et al.*, 2000). De forma alternativa, se ha demostrado que PVX P25 es necesaria y suficiente para remodelar el citoesqueleto de actina y el sistema de endomembranas (Golgi y ER), reclutando a otras proteínas potexvirales, TGB2 y TGB3, hacia los complejos víricos de replicación y movimiento (Tilsner *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012). Esto sugiere que la reorganización subcelular requerida para la replicación de PVX y el movimiento del virus podría estar implicada en la activación de las respuestas de necrosis inducidas por la sobreacumulación de P25. Sin embargo, esta explicación no es apoyada por los resultados obtenidos a partir de los estudios con mutantes de P25. Las mutaciones puntuales T117A y K124E, pero no la A104V, eliminaron la capacidad de P25 para inducir necrosis pese a acumularse a niveles equivalentes a los de la P25 silvestre. Además, en estudios previos se observó como una versión del mutante T117A

marcada con GFP fue capaz de formar estructuras típicas semejantes a los complejos de replicación y movimiento de PVX, pero no así el mutante A104V, cuando se expresaron en *N. benthamiana* (Yan *et al.*, 2012). Esto sugiere que la redistribución de componentes subcelulares y la respuesta de necrosis, ambos inducidos por P25, son procesos independientes.

Varios estudios han puesto de manifiesto que algunos supresores del silenciamiento génico por RNA también actúan a modo de factores de avirulencia *Avr*, aunque ha existido bastante controversia sobre hasta qué punto la actividad supresora de estas proteínas está relacionada con la inducción de respuestas de resistencia mediadas por factores R. La actividad supresora de la proteína CP de TCV (de *Turnip crinkle carmovirus*) y la de NSs de TSWV (de *Tomato spotted wilt tospovirus*) parece ser independiente de su papel como inductores de respuestas de resistencia mediadas por los genes *HRT* y *Tsw*, respectivamente (Choi *et al.*, 2004; de Ronde *et al.*, 2014). Sin embargo, otros estudios apoyan la idea de que la activación del gen R correspondiente requiere la actividad VSR del factor viral que actúa como *Avr*. La proteína 2b del virus TAV (de *Tomato aspermy cucumovirus*) induce una fuerte resistencia en tabaco cuando se expresa a partir de vectores basados en TMV. Es más, en dos estudios independientes se ha puesto de manifiesto la importancia del mismo residuo de Arg en posición 28 de la secuencia de TAV 2b para la actividad como VSR (Chen *et al.*, 2008) y para la inducción de respuestas de resistencia en la planta (Li *et al.*, 1999).

En el presente estudio se muestra como las formas mutantes de P25 afectadas en su capacidad supresora del silenciamiento, T117A y K124E, no son capaces de actuar como determinantes *Avr* en presencia de PPV HC. Este hecho refuerza la importancia de la actividad supresora del silenciamiento por RNA en la inducción de respuestas de tipo HR por VSRs, al menos en algunos casos.

Las proteínas P25 de los potexvirus actúan sobre múltiples dianas en la ruta de silenciamiento antiviral por RNA. Se ha descrito la acción de PVX P25 a nivel de ARGONAUTA 1 (AGO1), induciendo su degradación de forma dependiente de proteasoma (Chiu *et al.*, 2010);

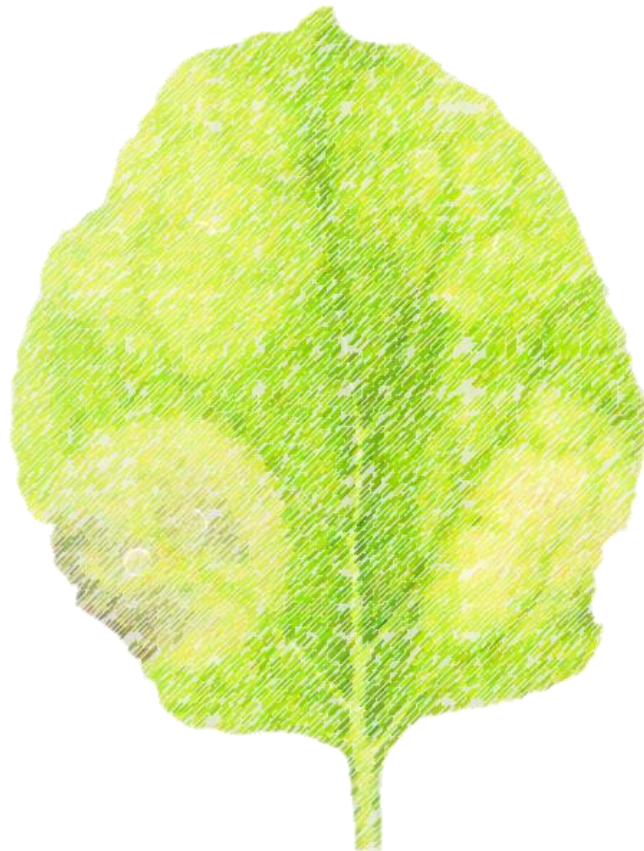
recientemente, también se ha descrito su capacidad para desestabilizar otras AGOs adicionales (Brosseau y Moffett, 2015). Para la proteína PLAMV P25, se ha descrito su acción sobre la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6) y sobre SGS3 (de *Suppressor of Gene Silencing 3*), inhibiendo la síntesis de dsRNA (de *double-stranded RNA*) y la producción de pequeños RNAs secundarios (Okano *et al.*, 2014). Aunque el modo de acción de los genes R dominantes todavía es materia de debate, uno de los modelos comúnmente más aceptados es el de la hipótesis del guardián (de *guard hypothesis*) (Jones y Dangl, 2006; Moffett, 2016). En este modelo de detección indirecta, el factor Avr del patógeno actúa sobre una diana del hospedador, la cual se encuentra bajo el control de la proteína R. La activación del factor R, más que ocurrir de forma directa, tiene lugar cuando los cambios inducidos en la diana celular (*guard*) por el Avr ocasionan cambios conformacionales en el factor R asociado (*guard*). Si AGO1, RDR6 o SGS3 hacen las veces de *guard* en la HR inducida por P25 es algo que debería examinarse en el futuro. Recientemente, se ha determinado como diferentes VSRs, entre ellos HC o P19, son responsables de la sobreacumulación del microRNA168 (miR168), el cual regula negativamente los niveles de acumulación de la proteína AGO1 (Várallyay y Havelda, 2013). Además, muchos VSRs son potentes inhibidores de los mecanismos de silenciamiento mediados por RDR6, los cuales por ejemplo restringen la acumulación de PVX en tabaco (Mallory *et al.*, 2002) y también en *Arabidopsis* (Moissiard *et al.*, 2007). Si durante los sinergismos asociados a PVX, la acción de múltiples VSRs contribuye junto con P25 a la reducción en cantidad/actividad de AGO1/RDR6, con el consiguiente incremento en la acumulación de los sgRNAs de PVX, y cómo estos eventos se relacionan con las respuestas de tipo HR inducidas por P25, son aspectos que deberían analizarse detalladamente en el futuro.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Efectos de la elevación de la concentración de CO<sub>2</sub> o la temperatura sobre la virulencia y los determinantes de patogenicidad del sinergismo *Potato virus X* (PVX)- potyvirus

---



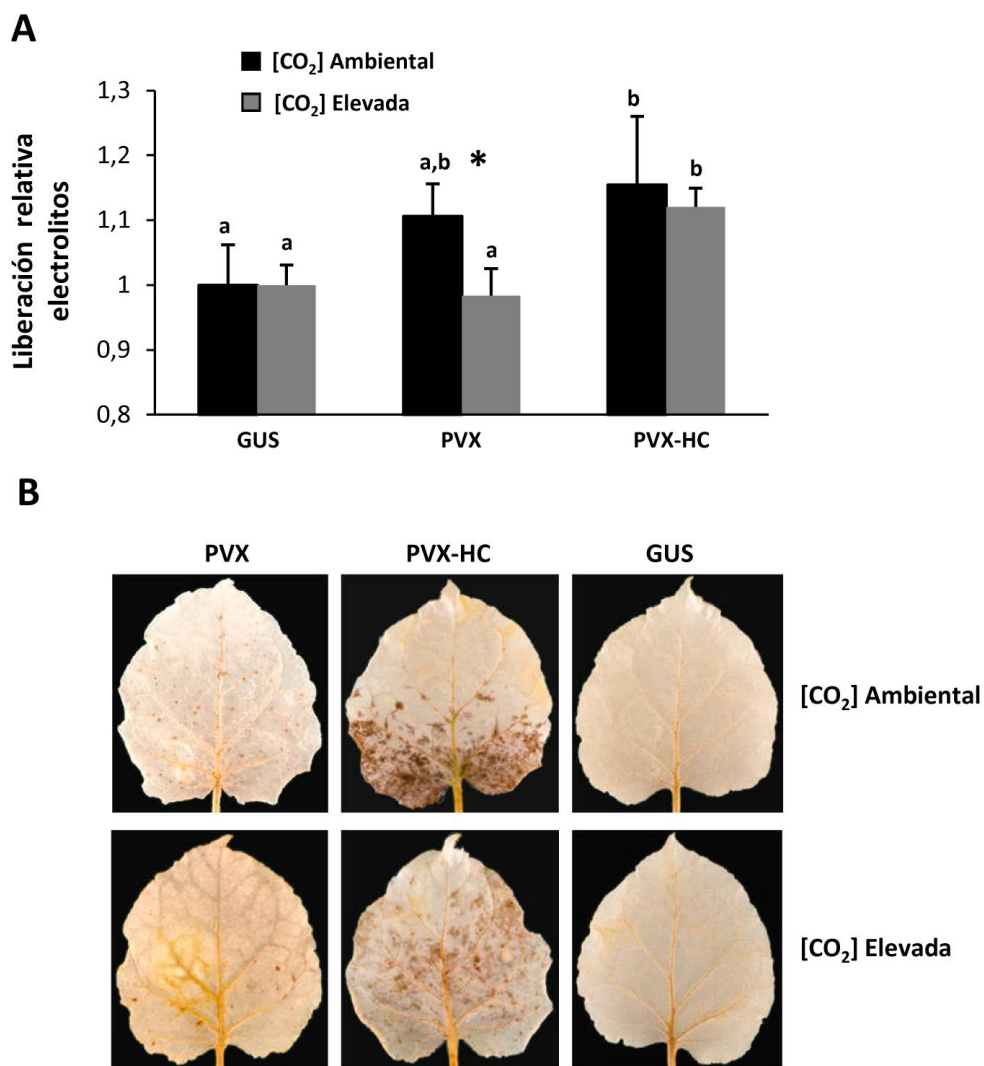


## 5.1. RESULTADOS

### 5.1.1. Efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) en la virulencia de los sinergismos asociados a PVX

Para determinar si la elevada [CO<sub>2</sub>] afecta al incremento de la virulencia de PVX mediada por la expresión de la proteína HC de PPV (HC de *Plum pox potyvirus*, o PPV HC), se infectaron plantas de *N. benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* que contenían construcciones binarias para la expresión de PVX o de la quimera PVX-HC (PVX con PPV HC), en condiciones de [CO<sub>2</sub>] ambiental o elevada (alrededor de 401 partes por millón [ppm] frente a 970 ppm, respectivamente). A modo de control, se inocularon plantas con cultivos de *Agrobacterium* que contenían una construcción binaria para la expresión de la β-glucuronidasa (GUS). Se evaluó la liberación de electrolitos sobre discos de hojas sistémicas infectadas, a los 10 días post-agroinfiltración (10 dpa), lo que permitió determinar la extensión del daño inducido sobre la membrana celular, como indicador cuantitativo de virulencia (De León *et al.*, 2002). Las plantas infectadas con PVX mostraron unos niveles significativamente más bajos de liberación de electrolitos en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>] en comparación con lo ocurrido bajo una concentración ambiental. De hecho, los niveles de liberación de electrolitos en condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>] se redujeron hasta valores equivalentes a los de los controles no infectados. Sin embargo, una alta [CO<sub>2</sub>] en comparación con el nivel ambiental, no fue capaz de inducir alteraciones en la virulencia de la quimera PVX-HC (**FIG. 14A**). Además, la infección PVX-HC indujo incrementos en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un indicador de estrés, en plantas crecidas en ambos niveles de [CO<sub>2</sub>], en relación a lo observado para plantas infectadas con PVX o en el control GUS (**FIG. 14B**). La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizó mediante tinción histoquímica con DAB (3,3'-diaminobenzidina).

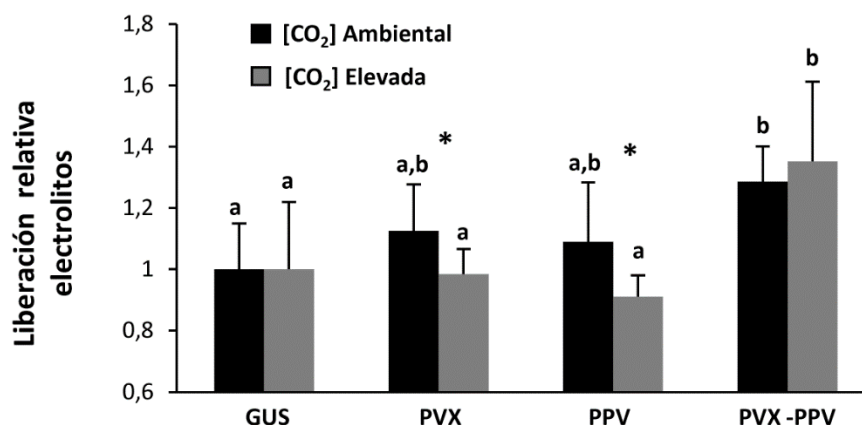
Se infectaron plantas de *N. benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias, para la expresión de PVX o PPV-GFP (quimera de PPV con la secuencia codificante de la GFP; en adelante, PPV). Las infiltraciones se llevaron a cabo con estos



**FIGURA 14.** Análisis del grado de virulencia realizado sobre plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo concentraciones de dióxido de carbono ([CO<sub>2</sub>] ambientales (401 ppm) o elevadas (970 ppm). **A.** Análisis de la liberación de electrolitos realizado a partir de discos de hoja de plantas agroinfiltradas con PVX, PVX-HC o GUS, esta última a modo de control, a los 10 dpa. El grafico representa las medias  $\pm$  desviación estándar de siete réplicas, cada una de ellas con material procedente de cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las mismas concentraciones de CO<sub>2</sub> (a 970 ppm o a 401 ppm) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en alta [CO<sub>2</sub>] frente a los de [CO<sub>2</sub>] ambiental, dentro de un mismo tratamiento vírico, se analizaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,0005$ ). **B.** Las hojas

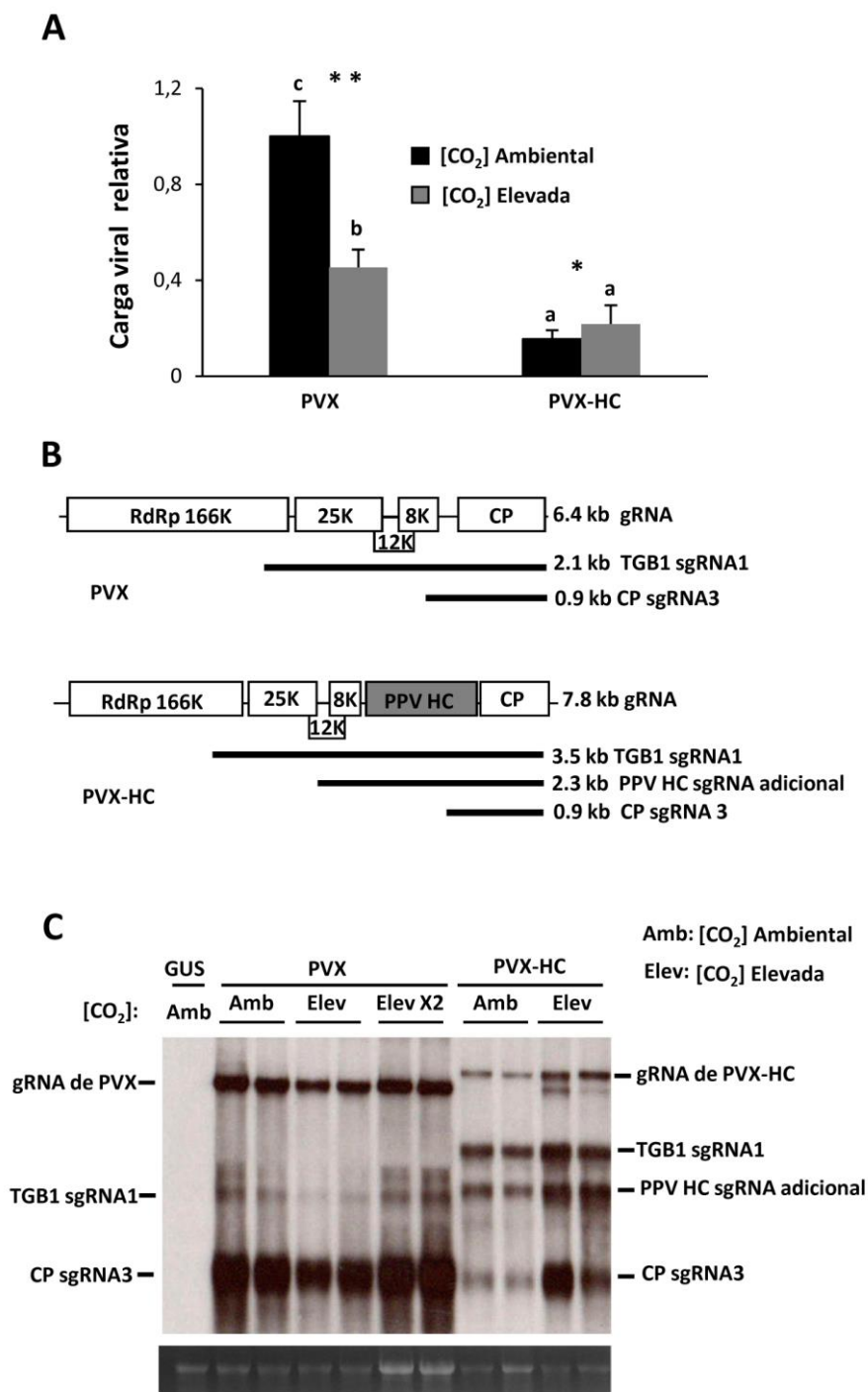
se tiñeron con una solución de DAB a 10 dpa. El DAB forma un precipitado de color marrón intenso tras reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

cultivos aislados o con mezclas de ambos cultivos, en el último caso para conseguir infecciones mixtas PVX-PPV. La virulencia de las infecciones sencillas se vio atenuada bajo alta [CO<sub>2</sub>] en comparación con lo observado en condiciones ambientales, mientras que la virulencia de la infección mixta permaneció inalterada (**FIG. 15**). Así, los resultados obtenidos en el análisis de la virulencia del par sinérgico PVX-PPV en ambas condiciones de [CO<sub>2</sub>], y en relación a las infecciones sencillas, resulta similar a los obtenidos para el virus recombinante PVX-HC.



**FIGURA 15. Análisis de la virulencia de distintas infecciones sobre plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo concentraciones de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) elevada (970 ppm) o ambiental (401 ppm).** Liberación de electrolitos de discos de hoja procedentes de plantas agroinfiltradas con GUS (a modo de control), con las infecciones sencillas PVX y PPV, o con las infecciones mixtas PVX-PPV, a 10 dpa. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de siete réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las mismas concentraciones de CO<sub>2</sub> (a 970 ppm o a 401 ppm) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en alta [CO<sub>2</sub>] frente a los de [CO<sub>2</sub>] ambiental, para un mismo tratamiento vírico, se analizaron con el test t de Student,  $P < 0,05$ ).

Para examinar si la virulencia estaba asociada a los niveles de acumulación de PVX y PVX-HC, se cuantificó la cantidad de RNA viral genómico (gRNA) en plantas infectadas a 10 dpa mediante ensayos de PCR cuantitativa (qRT-PCR) (**FIG. 16A**). El gRNA de PVX se acumuló



**FIGURA 16 (en la página anterior).** Comparación de los niveles de acumulación viral relativos en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo concentraciones de dióxido de carbono ([CO<sub>2</sub>]) ambientales (401 ppm) o elevadas (970 ppm). **A.** Mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) se analizó la acumulación de gRNA en extractos de RNA total procedentes de hojas sistémicas de plantas infectadas con PVX o con la quimera PVX-HC, a los 10 dpa. El gráfico representa las medias  $\pm$  desviación estándar de dos réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,008$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre valores en alta [CO<sub>2</sub>] frente a los de [CO<sub>2</sub>] ambiental, para un mismo tratamiento vírico, se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas, \* $P < 0,05$  o \*\* $P < 0,0001$ ). **B.** Los diagramas muestran la organización de los genomas y los tamaños aproximados de los distintos RNA virales para PVX y para el virus PVX recombinante que contiene la secuencia de HC de *Plum pox potyvirus* (PVX-HC). **C.** Análisis *northern blot* realizado a partir de los mismos extractos de RNA total que en A. El total del RNA (2  $\mu$ g) se hibridó con una DIG-ribosonda complementaria a la secuencia de la CP de PVX. Al lado de las imágenes de la hibridación aparece señalado el RNA genómico (gRNA) y los dos principales RNAs subgenómicos (sgRNAs). TGB1 sgRNA1 es el sgRNA a partir del cual se expresa TGB1, la proteína P25. CP sgRNA3 es el sgRNA a partir del cual se expresa la proteína de la cápsida (CP). Se analizaron dos conjuntos de muestras independientes por combinación. En **Elev X2**, se cargó el doble de RNA que en el resto de carriles, a fin de llevar a cabo la comparación. Debajo del *northern blot* se muestra el gel previo en el que se corrió el extracto de RNA total, teñido con bromuro de etidio, a modo de control de carga.

a menores niveles (una reducción a la mitad) en plantas crecidas bajo elevada [CO<sub>2</sub>] en comparación con la [CO<sub>2</sub>] ambiental, en consonancia con los menores niveles de liberación de electrolitos observados en esas mismas plantas. Sin embargo, se observó un ligero, pero significativo incremento en los niveles de gRNA de PVX-HC en plantas crecidas en alta [CO<sub>2</sub>] respecto a las crecidas a concentraciones ambientales. No obstante, la acumulación del gRNA de PVX-HC en plantas infectadas con la quimera fue varias veces menor que el correspondiente al gRNA de plantas infectadas con PVX, con independencia de la [CO<sub>2</sub>], lo que permite cuestionar el incremento global de la acumulación de gRNA como causa principal de la mayor virulencia exhibida por la quimera PVX-HC. En este sentido, se ha descrito previamente como la inserción de secuencias externas en el vector PVX tiene un efecto debilitador en la

multiplicación del virus en comparación con el vector PVX vacío (Chapman *et al.*, 1992).

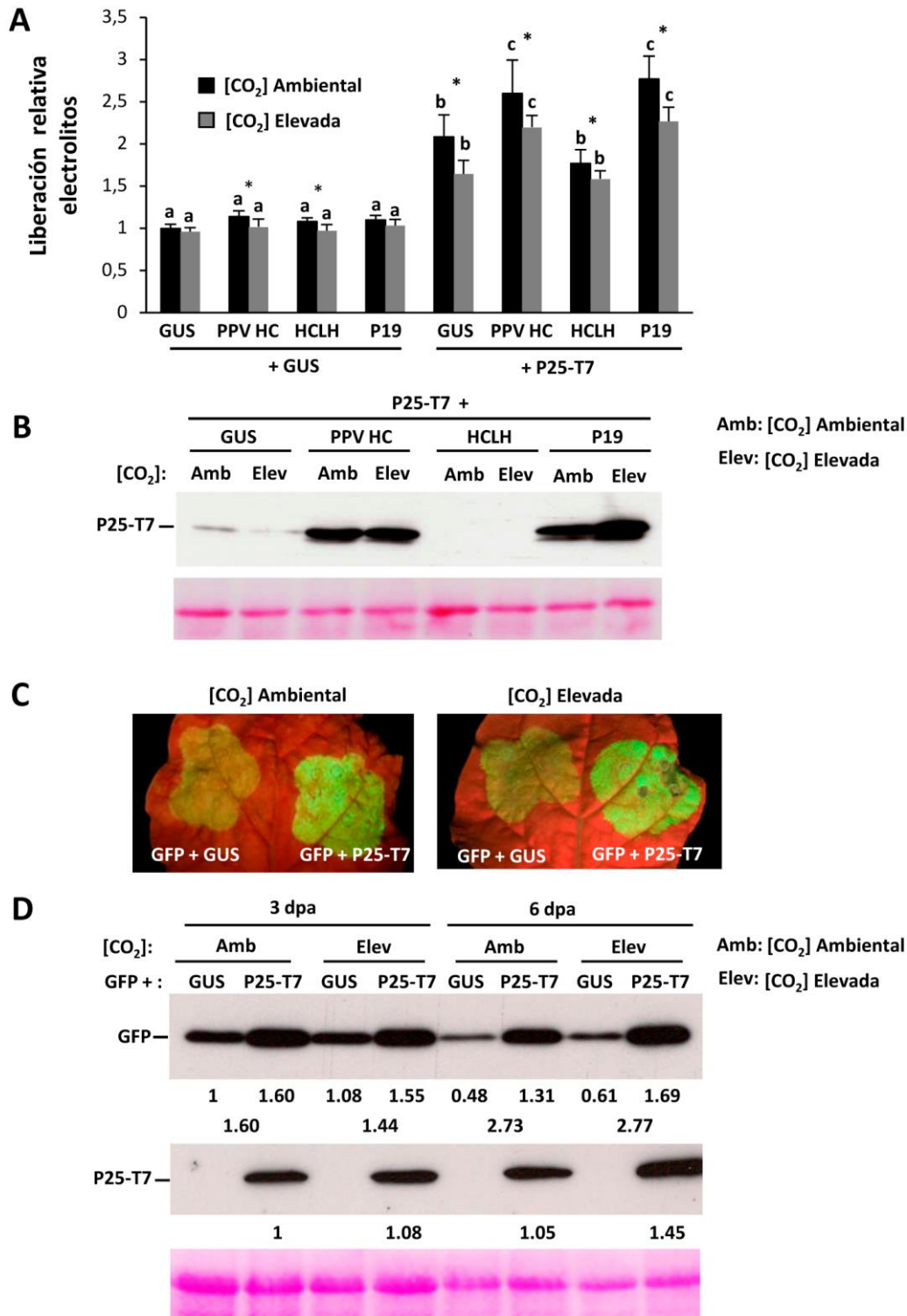
Se ha demostrado que la proteína P25 (o TGB1, de *Triple gene block 1*), expresada a través del RNA subgenómico 1 (TGB1 sgRNA1), actúa como el principal determinante de patogenicidad responsable de la exacerbación de los síntomas en los sinergismos asociados a PVX (capítulo 4 de la presente tesis). Para examinar si la alteración de la virulencia a distintas [CO<sub>2</sub>] estaba relacionada con cambios en la acumulación del TGB1 sgRNA1, se midió la cantidad total de RNA mediante *northern blot*, utilizando las mismas preparaciones de RNA analizadas anteriormente (**FIG. 16B** y **16C**). La acumulación de TGB1 sgRNA1, pero no del sgRNA responsable de la expresión de la CP (CP sgRNA3), fue mucho mayor en plantas infectadas con PVX-HC que en aquellas infectadas con PVX, independientemente de la [CO<sub>2</sub>]. Resulta destacable el hecho de que la que la virulencia atenuada de PVX bajo elevada [CO<sub>2</sub>] también se correlacionase con menores niveles de acumulación de TGB1 sgRNA1 en estas plantas.

### **5.1.2. Efecto de la [CO<sub>2</sub>] en la respuesta de tipo HR inducida por la proteína P25 de PVX**

En el capítulo 4 de la presente tesis, se determinó que la expresión transitoria de PVX P25 a través de *A. tumefaciens* en combinación con otros VSRs reproduce, en tejidos locales, la necrosis inducida por PVX recombinantes que expresan dichos VSRs, en *N. benthamiana*. También se analizó la capacidad necrogénica de P25 marcada con el epítipo T7 (P25-T7), encontrándose equivalente a la de P25 silvestre. Para determinar si la elevada [CO<sub>2</sub>] afecta a las respuestas de tipo HR inducidas por P25-T7, se infiltraron parches de hoja de *N. benthamiana* con P25-T7 en combinación con GUS, a modo de control, o en combinación con la proteína PPV HC, PPV HCLH (HCLH, una variante de PPV HC que contiene una única mutación puntual [L<sub>134</sub>H]) o con TBSV P19 (proteína P19 de *Tomato bushy stunt tombusvirus*, en adelante P19). El proceso se llevó a cabo en condiciones de alta [CO<sub>2</sub>] o de concentración ambiental. HCLH es incapaz de incrementar la

virulencia cuando se expresa a partir de un vector de PVX (González-Jara *et al.*, 2005). La expresión de P25-T7 con GUS, o de combinaciones de P25-T7 junto con PPV HC o P19 dio lugar a una menor liberación de electrolitos en plantas crecidas a alta [CO<sub>2</sub>], a 7 dpa, en comparación con las plantas mantenidas en los valores ambientales (**FIG. 17A**). Los ensayos de *western blot* confirmaron que P25-T7 se acumuló a niveles comparables en las plantas crecidas bajo elevada [CO<sub>2</sub>] y bajo las condiciones control (**FIG. 17B**). Los mayores niveles de liberación de electrolitos observados en las combinaciones de P25-T7 con VSRs, se han correlacionado con una mayor acumulación de P25-T7 en estos parches, en comparación con los registrados para P25-T7 con GUS, o junto al VSR no funcional HCLH, los cuales además inducen menores grados de necrosis (ver capítulo 4).

A continuación se analizó la eficiencia de la actividad supresora del silenciamiento de P25-T7 a elevada [CO<sub>2</sub>] en comparación con las condiciones ambientales. En hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron parches con una construcción para la expresión de la proteína reportera GFP, junto con construcciones para la expresión de GUS (como control de ausencia de actividad supresora) o para la expresión de P25-T7. Después, a 3 dpa, se examinó la fluorescencia derivada de la GFP en cada uno de los parches agroinfiltrados, mediante iluminación con luz UV. En los parches en los que se coexpresó GFP con P25-T7 la fluorescencia detectada fue más intensa que en los que se coexpresó GFP con GUS (**FIG. 17C**). Además, en presencia de P25-T7, tanto la intensidad visual de la fluorescencia como las cantidades de GFP, estas últimas analizadas por *western blot*, a 3 y 6 dpa, fueron similares en ambas condiciones de [CO<sub>2</sub>] (**FIG. 17D**, panel superior). Esta observación indica que P25 muestra una actividad supresora del silenciamiento equivalente bajo [CO<sub>2</sub>] elevada o ambiental. También se detectó P25-T7 mediante *western blot* en los parches correspondientes (**FIG. 17D**, panel intermedio).

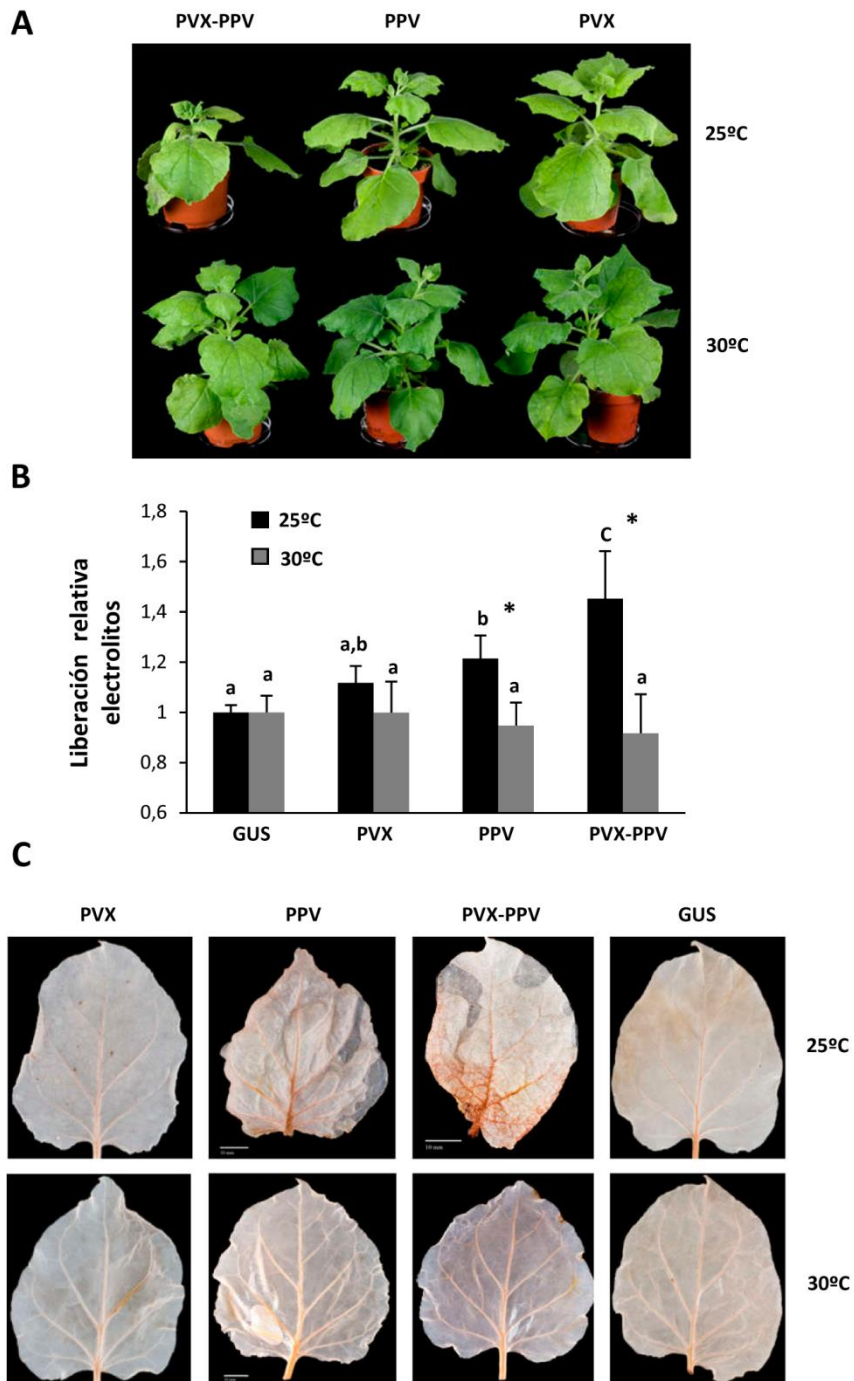


**FIGURA 17.** Expresión transitoria de la proteína PVX P25 junto con VSRs en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo concentraciones de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) ambientales (401 ppm) o elevadas (970 ppm). **A.** Liberación de electrolitos de discos de hoja de *N. benthamiana* infiltrados con mezclas de cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias, para expresar la combinación de P25-T7 (PVX P25 marcada con el epítipo T7) con GUS, o con VSRs como PPV HC, HCLH o P19, y la combinación de GUS junto con PPV HC, HCLH o P19, estas últimas a modo de control, a los 7 dpa, tal y

como se indica en las imágenes. También se agroinfiltró GUS en solitario. El gráfico representa las medias  $\pm$  desviación estándar de seis réplicas, cada una de ellas con material procedente de cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las mismas concentraciones de CO<sub>2</sub> (a 970 ppm o a 401 ppm) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en alta [CO<sub>2</sub>] frente a los de [CO<sub>2</sub>] ambiental, para una misma combinación de proteínas, se analizaron con el test t de Student,  $P < 0,05$ . **B.** Análisis por *western blot* de extractos derivados de parches de hoja infiltrados con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* para la expresión de combinaciones de P25-T7 más GUS, o más PPV HC, HCLH o P19, 7 dpa, utilizando anticuerpos anti-T7. El panel inferior muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo tras la transferencia, a modo de control de carga. **C.** Análisis de la actividad supresora del silenciamiento ejercida por P25-T7 en plantas crecidas a [CO<sub>2</sub>] elevado o ambiental. Las hojas se infiltraron con mezclas de cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias, para la expresión de la proteína reportera GFP junto P25-T7 o GUS, este último a modo de control de ausencia de actividad supresora. Las fotografías se tomaron con luz UV a 3 dpa. **D.** Análisis *western blot* de extractos derivados de parches de hojas agroinfiltrados como en C, a 3 y 6 dpa, utilizando anticuerpos anti-GFP (panel superior) o anti-T7 (panel intermedio). Debajo de los carriles seleccionados se presentan los análisis densitométricos de las bandas de proteína. Para GFP, a los niveles de proteína en la combinación GUS/GFP mantenida a [CO<sub>2</sub>] ambiental se le asignó el valor de 1, y el resto de valores se calcularon en relación a este. Para P25-T7, a los niveles de proteína en la combinación P25-T7/GFP mantenida a [CO<sub>2</sub>] ambiental se le asignó el valor de 1, y el resto de valores se calcularon en relación a este. Además, debajo del análisis densitométrico para GFP se muestran también los cocientes entre la acumulación de GFP en presencia de P25-T7 y la acumulación de GFP en ausencia del VSR (con GUS), para cada día y condición analizada. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.

### 5.1.3. Efecto de la temperatura (T) en la virulencia del sinergismo asociado a PVX

Los intentos iniciales para determinar si la T elevada afecta a la virulencia de la quimera PVX-HC no tuvieron éxito debido a la rápida eliminación de la secuencia de PPV HC a 30°C (dato no mostrado). Por tanto, se optó por infectar las plantas de *N. benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias que expresan PVX o PPV, o se mezclaron ambos tipos de cultivos para conseguir infecciones mixtas de PVX-PPV. Estas plantas infectadas se analizaron tanto en

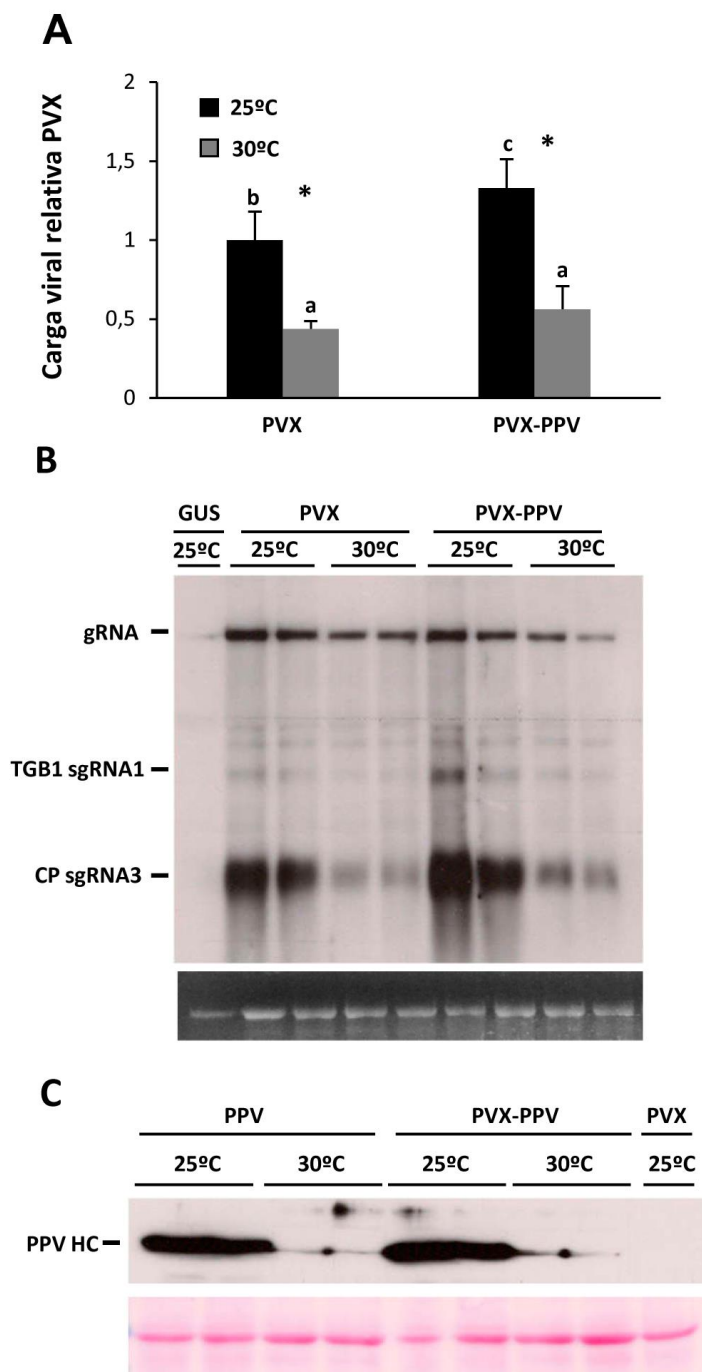


**FIGURA 18.** Análisis del grado de virulencia de las infecciones sobre plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo temperatura (T) estándar (25 °C) o elevada (30 °C). **A.** Plantas infectadas con PVX, PPV o la combinación PVX-PPV, crecidas a 25 o 30°C, tal y como aparecen los 13 dpa. **B.** Liberación de electrolitos determinada a 13 dpa sobre discos de hoja procedentes de plantas infectadas por PVX, PPV o por la combinación PVX-PPV, o de plantas agroinfiltradas solo con GUS a modo de control. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de seis réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes

a plantas crecidas bajo las mismas condiciones de T (a 30°C o a 25°C) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en alta T frente a los de T ambiental, dentro de un mismo tratamiento vírico, se analizaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,005$ ). **C.** Las hojas de plantas crecidas a 25°C (fila superior) o a 30°C (línea inferior) se tiñeron con una solución de DAB a 13 dpa. El DAB forma un precipitado marrón intenso tras reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

condiciones de T elevada como a T estándar (30°C frente a 25 °C). A 30°C, las plantas infectadas con combinaciones PVX-PPV mostraron síntomas atenuados en comparación con aquellas infectadas y mantenidas a 25°C (**FIG. 18A**). La medida de la liberación de electrolitos reveló que la virulencia de las infecciones mixtas se atenuó a elevada T en comparación con las plantas a la T estándar, a 13 dpa (**FIG. 18B**). En concordancia con los resultados anteriores, las plantas infectadas por PVX-PPV que crecieron bajo alta T presentaron una reducción en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con las plantas a T estándar (**FIG. 18C**). Las plantas infectadas únicamente con PPV mostraron una ligera reducción en la liberación de electrolitos a elevada T en contraposición con la T estándar. Sin embargo, la alta T no alteró la virulencia de PVX.

A fin de examinar si los cambios en la virulencia a elevada T estaban asociados con cambios en la carga viral, se cuantificó la acumulación de virus en plantas infectadas a 13 dpa. Los análisis comparativos de acumulación de PVX realizados mediante qRT-PCR revelaron que los niveles de gRNA de PVX se habían reducido a la mitad, en plantas crecidas bajo elevada T en relación a las crecidas bajo T estándar, tanto en plantas con infecciones sencillas como con infecciones mixtas (**FIG. 19A**). Como observación relevante, cabe destacar que la virulencia atenuada de PVX-PPV en condiciones de alta T también correlacionó con menores niveles de acumulación del TGB1 sgRNA, de acuerdo al análisis realizado por *northern blot* (**FIG. 19B**). De forma similar, los niveles de proteína PPV HC (**FIG. 19C**) y CP (no mostrado) se redujeron drásticamente a alta T tanto en plantas con infecciones sencillas como con infecciones mixtas, en comparación con lo observado a T estándar.

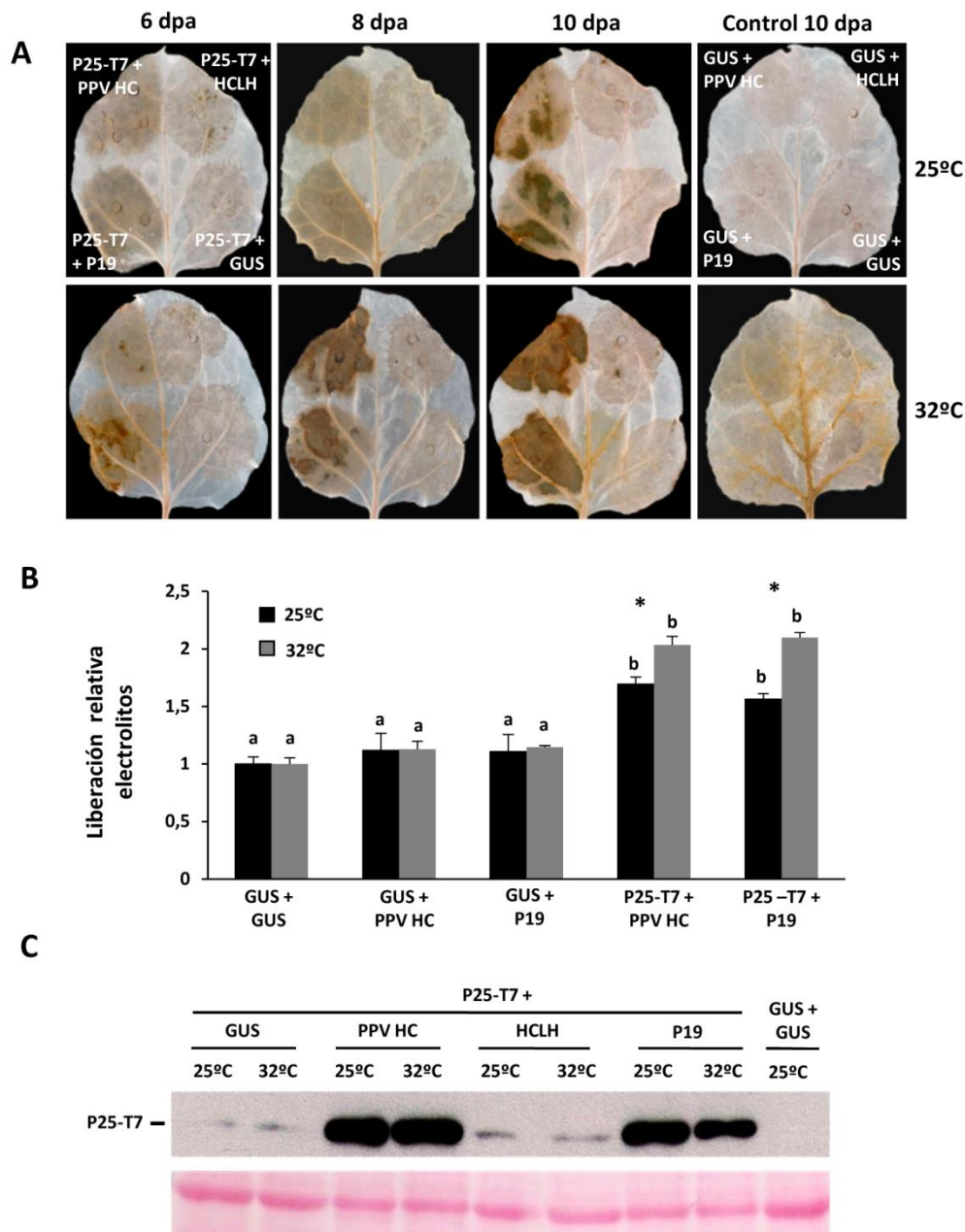


**FIGURA 19.** Comparación de los niveles de acumulación viral relativos en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo temperatura (T) estándar (25°C) o elevada (30°C). **A.** Mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) se analizó la acumulación del gRNA de PVX en extractos de RNA total procedentes de hojas sistémicas de plantas infectadas con PVX o con la combinación PVX-PPV, a los 13 dpa. El gráfico representa las medias  $\pm$  desviación estándar de dos réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,008$ ). Las comparaciones

entre pares de medias, realizadas entre valores en alta T frente a los de T estándar, para un mismo tratamiento vírico, se efectuaron con el test U de Mann-Withney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,01$ ). **B.** Análisis *northern blot* realizado a partir de los mismos extractos de RNA total que en A. El total del RNA (2 µg) se hibridó con una DIG-ribosonda complementaria a la secuencia de la CP de PVX. Al lado de las imágenes de la hibridación aparece señalado el RNA genómico (gRNA) y los dos principales RNAs subgenómicos (sgRNAs). TGB1 sgRNA1 es el sgRNA a partir del cual se expresa TGB1, la proteína P25. CP sgRNA3 es el sgRNA a partir del cual se expresa la proteína de la cápsida (CP). Para cada combinación se analizaron dos conjuntos independientes de muestras. Debajo del *northern blot* se muestra el gel previo en el que se corrió el extracto de RNA total, teñido con bromuro de etidio, a modo de control de carga. **C.** Análisis *western blot* realizado sobre extractos derivados de plantas infectadas con PPV, la combinación PVX-PPV o PVX como control a 13 dpa. Se emplearon anticuerpos anti-PPV HC. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.

#### 5.1.4. Efecto de la T en la respuesta de tipo HR inducida por la proteína P25 de PVX

Con el objetivo de determinar si la elevada T afecta a la respuesta de tipo HR inducida por P25, se llevó a cabo un análisis de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes días, mediante tinción DAB. Se analizaron parches de hoja agroinfiltrados con P25-T7 junto con GUS, o en combinación con las proteínas PPV HC, HCLH o P19. El ensayo se realizó a T estándar o elevada. Después de una serie de experimentos preliminares, la T elevada se incrementó de los 30°C previos a 32°C, ya que 30°C se observaron solo pequeñas diferencias en comparación con la T estándar (25°C), mientras que a 32°C estas diferencias fueron más nítidas. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue más rápida e intensa a alta T en los parches con las combinaciones P25-T7/PPV HC y P25-T7/P19, en relación a la T estándar (**Fig. 20A**). Este incremento en la respuesta de tipo HR inducida por P25 en combinación con VSRs funcionales se corroboró mediante ensayos de liberación de electrolitos realizados a 7 dpa (**FIG. 20B**). Los ensayos mediante *western blot* confirmaron que P25-T7 se acumuló a niveles comparables en plantas a elevada T y a la T estándar (**FIG. 20C**). Por el contrario, la expresión de P25-T7 con GUS o de la combinación de P25-T7 con PPV HC, a 16°C, dio lugar a una respuesta de tipo HR desfasada en el tiempo y de menor intensidad que a la T

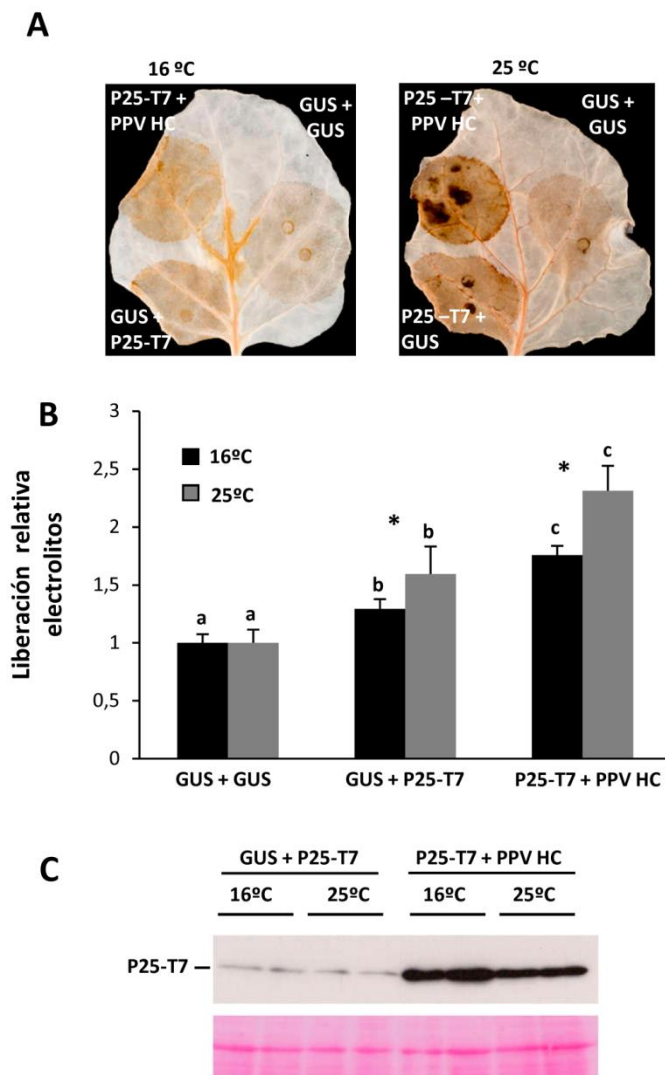


**FIGURA 20. Expresión transitoria de la proteína PVX P25 junto con VSRs en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo condiciones de temperatura (T) elevada (32°C) o estándar (25°C).** **A.** Se infiltró *N. benthamiana* con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* portadoras de construcciones binarias, para expresar la proteína P25-T7 (PVX P25 marcada con el epítipo T7) junto con GUS, PPV HC, HCLH o P19, y GUS en solitario o con las proteínas PPV HC, HCLH o P19, tal y como se indica. Las plantas se mantuvieron a 25 °C (serie superior) o a 32 °C (serie inferior) y se tiñeron con una solución de DAB a 6, 8 y 10 dpa. **B.** Liberación de electrolitos a 7 dpa de discos de hoja infiltrados con diferentes combinaciones de cultivos de *Agrobacterium*. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que reciben el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las mismas condiciones de T (a 32°C o a 25°C) se

analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en alta T frente a los de T estándar, dentro de una misma combinación de proteínas, se analizaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). **C.** Análisis *western blot* realizado sobre extractos derivados de parches de hojas infiltradas con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* para la expresión de P25-T7 junto con GUS, PPV HC, HCLH o P19. Las muestras proceden de plantas mantenidas a T elevada o a T estándar, recogidas a 7 dpa. Las membranas se hibridaron con anticuerpos anti-T7. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.

ambiental, tal y como se puso de manifiesto en la reducción estadísticamente significativa de la liberación de electrolitos, y en la menor intensidad de la tinción con DAB, determinadas para estas plantas en comparación con las de plantas mantenidas a T estándar (**FIG. 21**).

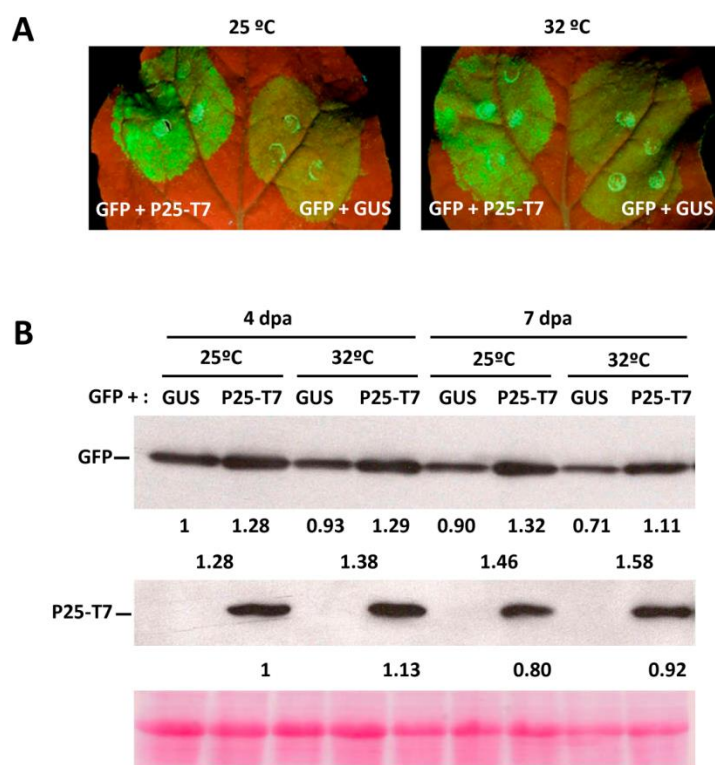
A continuación se analizó la eficiencia de la actividad supresora del silenciamiento de P25-T7 a elevada T, en comparación con las condiciones estándar. En hojas de *N. benthamiana* se agroinfiltraron parches con una construcción para la expresión de la proteína reportera GFP, junto con construcciones para la expresión de GUS (como control de ausencia de actividad supresora) o para la expresión de P25-T7. Después, a 4 dpa, se examinó la fluorescencia derivada de la GFP en cada uno de los parches agroinfiltrados, mediante iluminación con luz UV. En los parches en los que se coexpresó GFP con P25-T7 la fluorescencia detectada fue más intensa que en los que se coexpresó GFP con GUS (**FIG. 22A**). Además, en presencia de P25-T7, tanto la intensidad visual de la fluorescencia como las cantidades de GFP, estas últimas analizadas por *western blot*, a 4 y 7 dpa, fueron similares en ambas condiciones de T (**FIG. 22B**, panel superior). Esta observación indica que P25 muestra una actividad supresora del silenciamiento equivalente bajo ambas condiciones de T. También se detectó P25-T7 mediante *western blot* en los parches correspondientes (**FIG. 22B**, panel intermedio). Sin embargo, el empleo de formas mutantes de P25-T7 puso de manifiesto que la actividad supresora del silenciamiento de esta proteína sí es requerida para la potenciación de la respuesta HR bajo



**FIGURA 21.** Expresión de la proteína PVX P25 junto con PPV HC en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo condiciones de temperatura (T) estándar (25°C) o a baja T (16°C). **A.** Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias, para expresar la proteína P25-T7 (proteína PVX P25 marcada con el epítipo T7) más GUS o PPV HC. Se infiltró GUS en solitario como control. Las hojas se tiñeron con una solución de DAB a 7 dpa. **B.** Liberación de electrolitos a 7 dpa de discos de hoja infiltrados con las distintas combinaciones de cultivos de *Agrobacterium*. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de seis réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las mismas T (a 25°C o a 16°C) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en T estándar frente a los de baja T, para una misma combinación de proteínas, se analizaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). **C.** Análisis *western blot* realizado sobre extractos derivados de parches

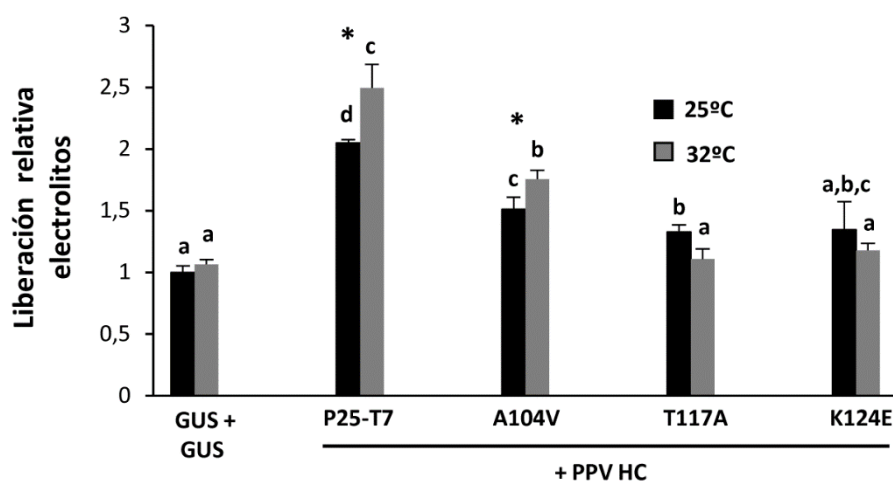
de hojas infiltrados con combinaciones de cultivos de *Agrobacterium*, para la expresión de P25-T7 más GUS o HC de PPV, y GUS en solitario, a 7 dpa. En la hibridación se emplearon anticuerpos anti-T7. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.

elevada T. De este modo, los mutantes puntuales de P25-T7 afectados en la actividad supresora (T117A y K124E), agroinfiltrados en combinación con PPV HC, no indujeron mayores niveles de liberación de electrolitos a elevada T, en relación a la liberación de electrolitos mostrada por las plantas mantenidas a T estándar. Por el contrario, el mutante A104V, el cual conserva la actividad supresora del silenciamiento, sí indujo mayores niveles de liberación de electrolitos a elevada T (**FIG. 23**).



**FIGURA 22. Análisis de la actividad supresora del silenciamiento ejercida por P25-T7 en plantas crecidas a T elevada (32°C) o estándar (25°C).** A. Las hojas de *N. benthamiana* se infiltraron con mezclas de cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias, para la expresión de la proteína reportera GFP junto P25-T7 o GUS, este último a modo de control de ausencia de actividad supresora. Las plantas se sometieron a crecimiento bajo T elevada o T estándar. Las fotografías se tomaron con luz

UV a 4 dpa para la detección de GFP. **B.** Análisis *western blot* de extractos derivados de parches de hojas agroinfiltrados como en A, a 4 y 7 dpa, e hibridados con anticuerpos anti-GFP (panel superior) o anti-T7 (panel intermedio). Debajo de los carriles seleccionados se presentan los análisis densitométricos de las bandas de proteína. Para GFP, a los niveles de proteína en la combinación GUS/GFP mantenida a la T estándar se le asignó el valor de 1, y el resto de valores se calcularon en relación a este. Para P25-T7, a los niveles de proteína en la combinación P25-T7/GFP mantenida a T ambiental se le asignó el valor de 1, y el resto de valores se calcularon en relación a este. Además, debajo del análisis densitométrico para GFP se muestran también los cocientes entre la acumulación de GFP en presencia de P25-T7 y la acumulación de GFP en ausencia del VSR (con GUS), para cada día y condición analizada. El panel situado inmediatamente debajo de la hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga.



**FIGURA 23.** La actividad de PVX P25 como supresor del silenciamiento por RNA es necesaria para el incremento en la respuesta de tipo HR inducido por temperatura (T) elevada (32°C). Liberación de electrolitos a 8 dpa en discos de hoja infiltrados con mezclas de cultivos de *Agrobacterium* portadores de construcciones binarias. Se agroinfiltraron combinaciones de PPV HC con P25-T7 (PVX P25 marcada con epítipo T7) silvestre o con sus versiones mutantes. También se agroinfiltró GUS en solitario, como control. Los mutantes de P25-T7 analizados, A104V, T117A y K124E, ya se han descrito en el capítulo 4. Los mutantes T117A y K124E fueron deficientes en la supresión del silenciamiento de la proteína reportera GFP, mientras que A104V mantuvo esta función. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar de seis réplicas, cada una de ellas consistente en cuatro plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas crecidas bajo las misma T (a 25°C o a 32°C) se analizaron independientemente, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las diferencias entre pares de medias, entre valores de liberación de electrolitos en elevada T frente a los de T estándar, para una misma combinación de proteínas, se analizaron con el test t de Student,  $P < 0,05$ ).

## 5.2. DISCUSIÓN

La aparición de enfermedad en la planta está fuertemente condicionada por los factores ambientales en los que se desarrolla la interacción planta-patógeno (McElrone *et al.*, 2010). La alta [CO<sub>2</sub>] y la elevada T son factores ambientales asociados al cambio climático (IPCC, 2013). Varios estudios previos se han centrado en los efectos de estos dos factores en la susceptibilidad de especies vegetales a virus individuales (Qu *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha, no existían estudios que abordasen la influencia de la alta [CO<sub>2</sub>] y la elevada T sobre las interacciones víricas sinérgicas, desconociéndose sus efectos sobre parámetros tales como la virulencia y la carga viral. Esta cuestión ha sido objeto de estudio en el presente trabajo, utilizando como patosistema modelo a *N. benthamiana*-PVX-potyvirus.

La virulencia de PVX se redujo en plantas de *N. benthamiana* crecidas bajo elevada [CO<sub>2</sub>], probablemente debido a una reducción de la carga viral. De forma similar, varios estudios previos centrados en las respuestas sistémicas de tomate frente a TYLCV (de *Tomato yellow leaf begomovirus*) y de tabaco frente al potyvirus PVY (de *Potato virus Y*), describen que la elevada [CO<sub>2</sub>] disminuye la incidencia y gravedad de la enfermedad (Matros *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2012).

Estos hallazgos sugieren que las plantas hospedadoras podrían beneficiarse de un futuro aumento de las concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico, a través de una reducción en el daño causado por los patógenos virales. En contraposición a esto, la virulencia del PVX recombinante PVX-HC, y la del par sinérgico PVX-PPV, se mantuvo inalterada bajo elevada [CO<sub>2</sub>]. De forma general, se asume que la mayor parte de las respuestas defensivas a los virus están mediadas por la ruta de señalización del ácido salicílico (SA) (Whitham *et al.*, 2006). De hecho, el tratamiento con SA induce resistencia a PVX en *N. benthamiana* (Lee *et al.*, 2011). Se ha descrito que la elevada [CO<sub>2</sub>] puede inducir incrementos en el nivel de SA en plantas de tomate y *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015), sugiriendo que la reducción en la virulencia de PVX bajo elevada [CO<sub>2</sub>] que se observó en este trabajo está potencialmente relacionada con cambios en los niveles

de esta fitohormona. La falta de efecto de la alta  $[\text{CO}_2]$  en la virulencia de PVX-HC podrían estar conectados con hallazgos previos que sugieren que la proteína potyviral HC causa una alteración en la regulación de la señalización mediada por SA (Murphy *et al.*, 2004; Alamillo *et al.*, 2006). De esta forma, la interferencia de la PPV HC codificada por PVX-HC sobre la señalización de SA podría contrarrestar el aumento de las defensas descrito en plantas crecidas a elevada  $[\text{CO}_2]$ .

La presencia de secuencias génicas externas en formas recombinantes de PVX representa una carga desventajosa, ya que tienden a eliminarse durante la infección, especialmente en condiciones de fuerte presión selectiva (Barajas *et al.*, 2006). Este pareció ser el caso en PVX-HC a T de 30°C, impidiendo su uso en el estudio de la virulencia en plantas crecidas a elevada T. La alta T tuvo un impacto negativo tanto en la virulencia como en la carga viral del par sinérgico PVX-PPV, lo que podría implicar que la virulencia estaba, hasta cierto punto, asociada con la acumulación del virus. Se ha descrito que el silenciamiento mediado por RNA se incrementa con el aumento de T, observándose una tendencia general de atenuación de los síntomas a temperaturas elevadas, incluso en infecciones virales en las que están presentes VSRs fuertes (Szittyá *et al.*, 2003; Chellappan *et al.*, 2005). Sin embargo, a juzgar por los ensayos de supresión transitoria del silenciamiento realizados en este trabajo, la elevada T no afectó negativamente a la actividad de P25 como supresor del silenciamiento por RNA, en comparación con las condiciones estándar, y la misma ausencia de efecto negativo se ha descrito para la proteína HC (Del Toro *et al.*, 2015). Estos hallazgos sugieren que la restricción de la acumulación de PVX y PPV a alta T no se encuentra relacionada con la efectividad de la supresión del silenciamiento por RNA ejercida por los dos VSRs involucradas en el sinergismo PVX-potyvirus. De este modo, otros procesos, distintos al silenciamiento por RNA, podrían estar teniendo lugar en plantas infectadas por virus, los cuales reducirían la virulencia y la carga viral a altas temperaturas. Las interacciones entre productos víricos y factores del huésped, involucrados en movimiento o en replicación viral, o en ambos procesos, podrían ser menos efectivas con

T elevada y, en consecuencia, se producirían reducciones en la acumulación del virus y su virulencia (Chellappan *et al.*, 2005).

Los hallazgos descritos previamente (capítulo 4) han mostrado que P25 es el principal factor de PVX implicado en la inducción de respuestas sistémicas de tipo HR, en los sinergismos asociados a PVX. De hecho, las marcas distintivas de una muerte celular programada de tipo HR (Montillet *et al.*, 2005), como por ejemplo daño en las membranas celulares, acumulación de especies reactivas de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y actividad lipoxigenasa (LOX) incrementada, se han documentado tanto para plantas infectadas con el par sinérgico PVX-PVY como para la infección con la quimera PVX-HC (Pacheco *et al.*, 2012; García-Marcos *et al.*, 2013). En el presente trabajo de tesis, estas características también acompañaron a la necrosis inducida por combinaciones del factor PVX P25 con otros VSRs. Así, P25 se comporta como un determinante de virulencia en *Nicotiana* spp., cuya capacidad necrogénica correlaciona con su capacidad para suprimir el silenciamiento por RNA (capítulo 4). Varios estudios indican que algunos supresores del silenciamiento por RNA pueden actuar también como factores víricos inductores de respuestas defensivas mediadas por genes de resistencia R (Li *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015). En este trabajo se determinó que la respuesta de tipo HR inducida por P25 en combinación con VSRs fuertes aumentó significativamente a la T de 32°C. En general, las altas temperaturas perjudican la respuesta defensivas mediadas por factores R, inclusive la respuesta HR, en distintos sistemas vegetales (Zhu *et al.*, 2010), aunque también se han descrito los efectos contrarios (Carter *et al.*, 2009). La proteína P25 de PVX tiene como diana a múltiples componentes de la ruta de silenciamiento por RNA. Por ejemplo, se ha descrito la interacción de PVX P25 con ARGONAUTA 1 (AGO1), induciendo su degradación a través de rutas dependientes del proteasoma (Chiu *et al.*, 2010). Para la P25 de PIAMV (de *Plantago asiatica mosaic potexvirus*) se ha descrito su interacción con la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6) y con SGS3 (de *Suppressor of gene silencing 3*), inhibiendo la síntesis de dsRNA (de *double-stranded* RNA) y de los pequeños siRNAs secundarios (de *small interfering RNA*) (Okano *et al.*, 2014). Es interesante mencionar

que la expresión de RDR6 se encuentra inducida en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TCV (de *Turnip crinckle carmovirus*) y crecidas a 27°C, en comparación con plantas infectadas mantenidas a 21°C (Qu *et al.*, 2005). Por otra parte, un incremento en la T desde los 22°C hasta los 30°C reduce la abundancia de la proteína SGS3 en *Arabidopsis*, atenuando la formación del dsRNA estable necesario para la biogénesis de siRNAs (Zhong *et al.*, 2013). Será necesario realizar nuevas investigaciones a fin de determinar si las variaciones en la acumulación de proteínas del huésped implicadas en interacciones con P25, o de las propias dianas de P25, contribuyen al incremento observado en la inducción de respuestas de tipo HR a alta T.

En este trabajo se ha mostrado como la respuesta de tipo HR inducida por P25 en combinación con VSRs fuertes disminuye significativamente a elevada [CO<sub>2</sub>]. Como se ha mencionado antes, la alta [CO<sub>2</sub>] generalmente favorece la biosíntesis de SA y su señalización, pero al mismo tiempo la ruta del ácido jasmónico (JA) se ve reprimida (Zhang *et al.*, 2015). En el capítulo 4 se ha descrito como la respuesta HR mediada por P25 se correlaciona con un incremento en la actividad LOX, lo que sugiere la implicación de la señalización por JA en esta respuesta. Además, el tratamiento con SA induce un retraso en la HR y una significativa reducción de la liberación de electrolitos en los parches de hoja infiltrados con combinaciones de P25 junto con PPV HC o P19, en comparación con las plantas no tratadas, lo que correlaciona con la represión de genes de respuesta a JA. Así, los efectos sobre la HR inducida por P25 observados tanto en el tratamiento con SA (capítulo 4) como por la elevada [CO<sub>2</sub>] (en el presente capítulo) podrían atribuirse al efecto antagónico del SA sobre la señalización por JA. Una interpretación más compleja requiere la observación relativa a por qué la elevada [CO<sub>2</sub>] redujo la respuesta tipo HR inducida por combinaciones P25/PPV HC mientras que la misma alta [CO<sub>2</sub>] no alteró la virulencia de la quimera PVX-HC ni de la combinación PVX-PPV, en comparación con la [CO<sub>2</sub>] ambiental. Pudiera ser que la mayor acumulación de gRNA y del TGB1 sgRNA1 registrada para la quimera PVX-HC a alta [CO<sub>2</sub>], conlleve una mayor acumulación de proteína P25 en la célula, lo que podría compensar esa menor virulencia registrada para P25 en estas

condiciones de elevada [CO<sub>2</sub>]. Por otra parte, podría existir alguna diferencia fundamental a nivel de señalización hormonal entre la expresión transitoria de determinantes víricos de virulencia (respuesta local) y la infección por el virus (respuesta sistémica), o algún efecto atribuible a otros genes víricos o a la propia agrobacteria.

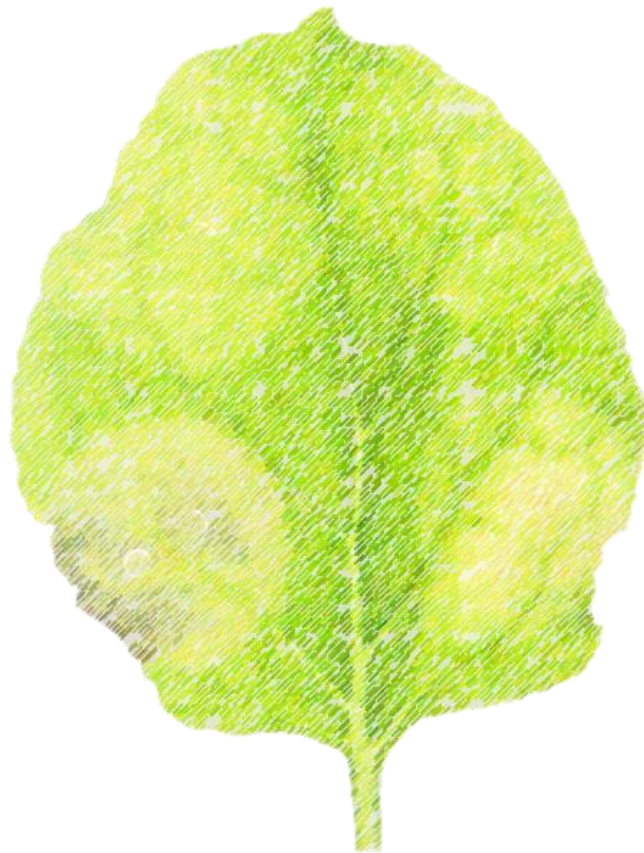
Los miembros del género *Potyvirus* se transmiten predominante por pulgones de una forma no persistente, mientras que la transmisión de PVX se produce exclusivamente por medios mecánicos (Hull, 2002). Los cambios ambientales asociados al calentamiento global probablemente conllevarán un marcado efecto sobre las poblaciones de pulgones, debido a sus cortos ciclos de generación y a sus bajos umbrales térmicos de desarrollo, así como a su habilidad para sobrevivir a inviernos suaves (Harrington *et al.*, 2007). Incrementos en la frecuencia y en la intensidad de las tormentas de verano con vientos fuertes, lluvia y granizo darán lugar a un mayor número de heridas en las plantas y en consecuencia a un incremento en la transmisión de los virus por medios mecánicos. Por lo tanto, a pesar del efecto de atenuación en la virulencia de PVX-PPV observada a T elevada, es esperable que sinergismos como los de PVX-potyvirus aumenten su importancia relativa respecto a las infecciones sencillas en condiciones de cambio climático. Es esperable que la importancia de estos sinergismos sea incluso mayor si la alta [CO<sub>2</sub>] contribuye en cierta medida a aumentar las defensas a través del SA, que aunque son efectivas contra la infección sencilla por PVX, parecen ineficaces en infecciones mixtas PVX-potyvirus. Además, los hallazgos presentados en este trabajo sobre el efecto de la T en la necrosis inducida por la proteína PVX P25 sugieren que la virulencia causada por los sinergismos PVX-potyvirus podría incrementarse a alta T, una vez que se superara por adaptación la sensibilidad térmica de los procesos de movimiento y replicación viral, a través de mutaciones específicas que confirieran funciones termoestables. La investigación futura debería considerar los efectos de la interacción entre los factores elevada T-elevada [CO<sub>2</sub>] en la virulencia de los sinergismos PVX-potyvirus.



## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

**Las infecciones víricas inducen efectos beneficiosos en las plantas durante el estrés por sequía, a través de la producción de ácido salicílico**

---





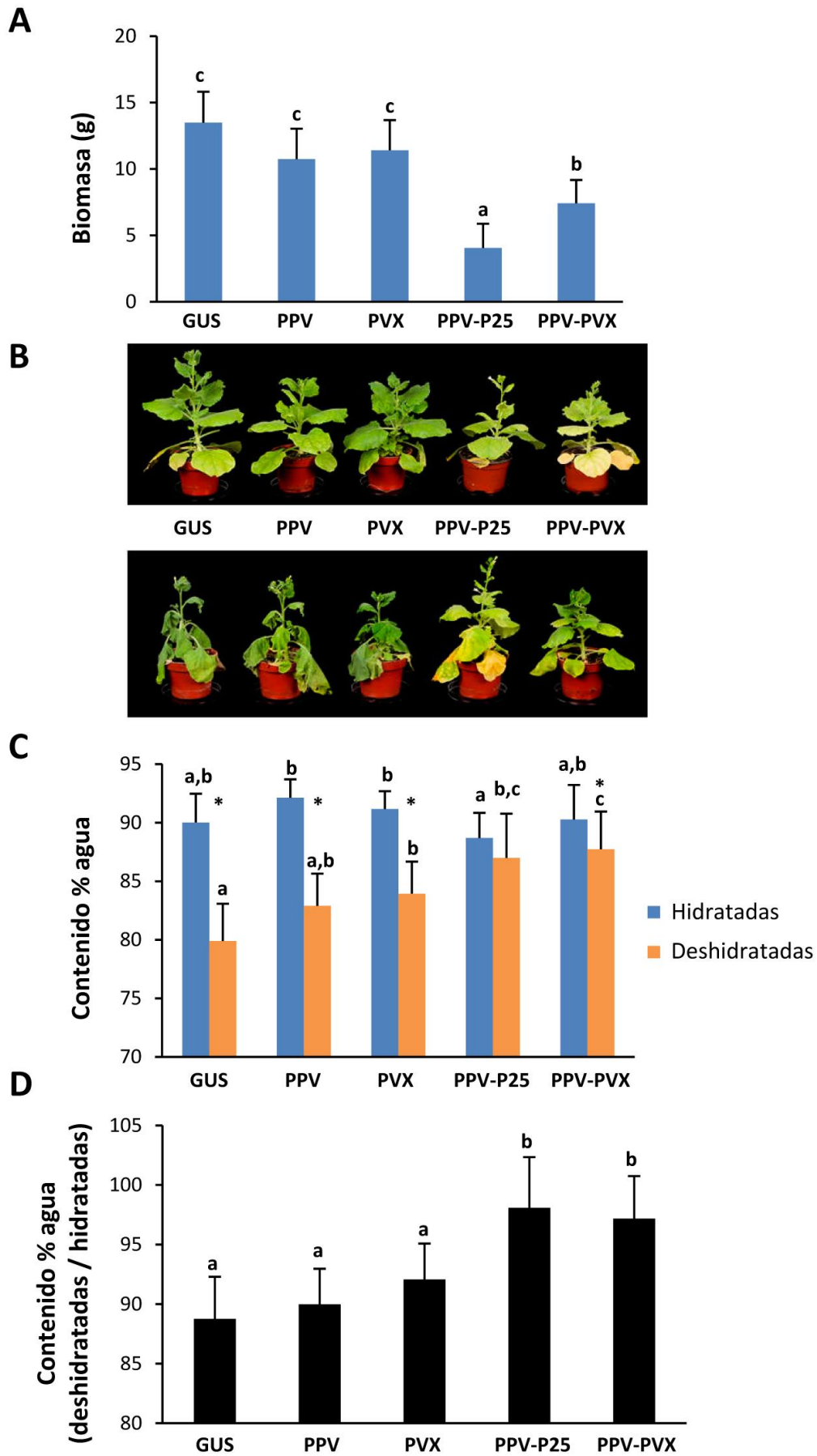
## 6.1. RESULTADOS

### 6.1.1. Tolerancia a la sequía en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con virus

Para estudiar la tolerancia a la sequía en *N. benthamiana*, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se agroinfiltraron las plantas con la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS, controles no infectados con virus), PVX (potexvirus *Potato virus X*), PPV-P25 (quimera derivada del *Plum pox potyvirus* con la secuencia codificante de P25), PPV-GFP (quimera de PPV a la que se le ha insertado la secuencia codificante de GFP; en adelante, PPV) o con la combinación PVX-PPV. La acumulación de los virus se determinó mediante *western blot* a partir de extractos obtenidos con material derivado de hojas sistémicas infectadas (**FIG. 25A**). Se analizaron plantas infectadas con virus o no infectadas (agroinfiltradas con GUS) que, o bien se continuaron regando normalmente (controles hidratados), o bien se sometieron a estrés por sequía a partir de los 10 días post-agroinfiltración (10 dpa). La gravedad de los síntomas de la infección, estimada a través de sus efectos sobre la cantidad de biomasa generada por la planta (tejido aéreo) en condiciones de riego habitual, fue mayor para las infecciones con PPV-P25 y con la combinación PVX-PPV, en relación a las infecciones sencillas con PPV o PVX (**FIG. 24A**), a 17 dpa.

Después de retirar el riego, los síntomas de deshidratación aparecieron primero en las plantas no infectadas, consistentes en marchitamiento, pérdida de turgencia y rizado de las hojas. El período de sequía finalizó con el colapso de estas plantas (**FIG. 24B**, panel inferior). En las plantas infectadas con PPV-P25 o con PVX-PPV, y en menor medida las infectadas con PVX o con PPV, la aparición de los síntomas de deshidratación se retrasó varios días y, en general, mostraron mejor apariencia (tejido foliar con menor flacidez) que las plantas no infectadas a lo largo de todo el experimento.

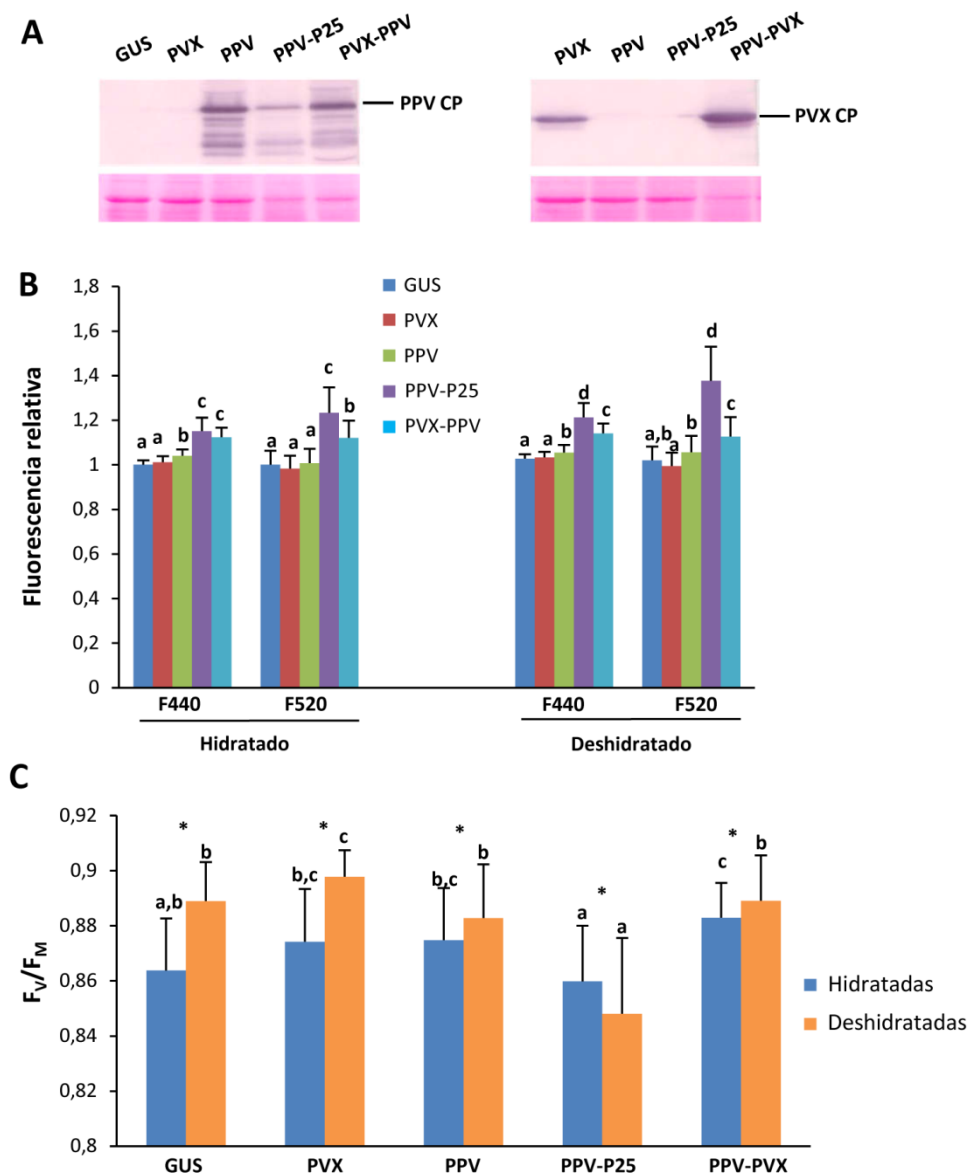
La obtención de imágenes de fluorescencia de clorofila (Chl-F, de *Chlorophyll fluorescence*) y de fluorescencia multicolor (MCFI, de *Multicolor*



**FIGURA 24 (en la página anterior). Comparación de la tolerancia a la sequía entre plantas de *N. benthamiana* no infectadas e infectadas por virus.** **A.** Producción de biomasa correspondiente al tejido aéreo de plantas hidratadas infectadas o no infectadas, a los 17 dpa. Los gráficos representan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de, al menos, 14 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). **B.** A los siete días de ausencia de riego (7 días post-riego, o 7 dpr) (panel inferior), se fotografiaron una serie de plantas con fenotipo representativo, al lado de las cuales se muestran los correspondientes controles hidratados (sometidos al riego habitual) a la misma edad (panel superior). **C.** Contenido (%) en agua en plantas infectadas o no infectadas, sometidas a riego habitual o a estrés por sequía, a los 7 dpr. **D.** Proporción (%) entre el contenido (%) en agua de plantas deshidratadas frente al de las hidratadas que recibieron el mismo tratamiento vírico. Los gráficos representan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de 14 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias correspondientes a plantas de cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o plantas sometidas a estrés por sequía) se analizaron independientemente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,005 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,005$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinfiltrados con GUS).

*fluorescence imaging*) constituyen técnicas que proporcionan información útil sobre las alteraciones en el metabolismo primario y secundario asociados a respuestas de estrés (Pérez-Bueno *et al.*, 2016) (**FIG. 25**). De este modo, fue posible observar aumentos en la emisión de fluorescencia azul (F440, de 440 nm) y verde (F520, de 520 nm) en las plantas infectadas con PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV bajo riego habitual, aumentos que fueron más importantes a los 3 días tras haber retirado el agua (3 días post-riego, o dpr). Simultáneamente, los estudios de Chl-F mostraron como la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (valor  $F_v / F_M$  para el PSII) decreció en plantas infectadas con PPV-P25 a los 3 dpr, en relación a los valores en las plantas no infectadas o infectadas con otros virus a ese mismo tiempo.

Se realizaron comparaciones del contenido (%) en agua de las plantas no infectadas y de las infectadas con virus, bajo condiciones de riego habitual o de estrés hídrico, a los 17 dpa (7 dpr, **FIG. 24C**). El contenido en agua promedio de las plantas sometidas a estrés por sequía



**FIGURA 25. Impacto de la infección viral en la fotosíntesis y el metabolismo secundario de *N. benthamiana*.** **A.** Análisis por *western blot* de extractos derivados de hojas sistémicas de plantas infectadas o no infectadas a los 15 dpa, utilizando anticuerpos anti-PPV CP (panel izquierdo) o anti-PVX CP (panel derecho). El panel situado inmediatamente debajo de cada hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. **B.** Valores relativos de fluorescencia azul (F440) y verde (F520) determinada por técnicas de MCFI. **C.** Valores de eficiencia del PSII ( $F_v / F_m$ ) determinada por técnicas de Chl-F. Los análisis se realizaron sobre hojas de plantas no infectadas o infectadas con virus, bajo condiciones de riego habitual (a los 10 dpa) o a los 3 dpr (13 dpa). Para la obtención de imágenes se posicionaron de forma adecuada un mínimo de cuatro hojas por planta, y se analizó un total de 6 plantas por tratamiento. En B se tomaron como referencia los valores de fluorescencia correspondientes a las muestras de plantas hidratadas no infectadas, a los que

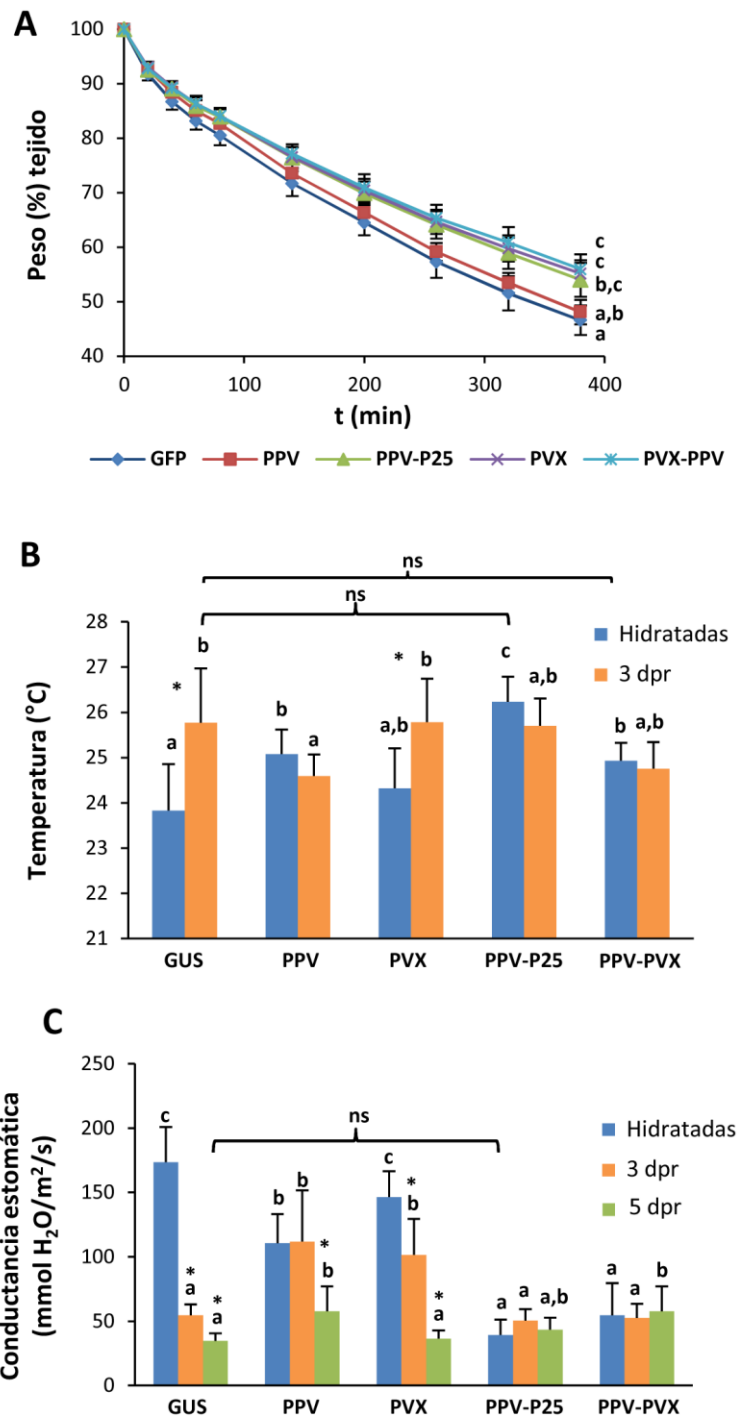
se les asignó el valor 1, y el resto de muestras se calcularon en relación a ella. Los gráficos muestran los promedios de los valores de fluorescencia relativos  $\pm$  desviación estándar de 6 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se compararon entre sí de forma independiente para cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o sometidas a sequía) y tipo de fluorescencia (F440, F520 o Chl-F), mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,005 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,005$ ). Las comparaciones entre pares de medias de Chl-F, realizadas entre plantas hidratadas o deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinfiltrados con GUS).

fue mayor en las infectadas con PVX, PPV-P25 y PVX-PPV que en las no infectadas, mientras que la infección con PPV solo incrementó mínimamente este contenido en agua. También, el contenido en agua fue significativamente menor en las plantas hidratadas infectadas con PPV-P25 que en las hidratadas infectadas con PPV o con PVX. Cuando se calculó la proporción entre el contenido en agua de plantas deshidratadas frente al de las hidratadas se pudieron observar diferencias significativas en las plantas infectadas con PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV, en comparación con los niveles observados en las plantas sanas o con cualquiera de las infecciones sencillas (**FIG. 24D**). Estos resultados muestran una correlación positiva entre la tolerancia al estrés por sequía inducida por los virus en *N. benthamiana* y la virulencia, y una contribución del factor PVX P25 al balance hídrico de la planta en infecciones con PPV-P25, en relación a las infectadas por PPV.

### **6.1.2. La transpiración disminuye en plantas de *N. benthamiana* infectadas por virus**

Debido a que la disminución de la transpiración es un mecanismo fundamental de resistencia a la deshidratación, se examinó la pérdida de agua a lo largo del tiempo en discos de hoja tomados de plantas de *N. benthamiana* hidratadas, sanas o infectadas (**FIG. 26A**). Los discos de hojas de plantas infectadas con PVX, PVX-PPV o PPV-P25 perdieron agua de forma significativamente más lenta que los de plantas no infectadas, mientras que los de plantas infectadas con PPV no

presentaron un comportamiento significativamente diferente a los de plantas no infectadas. La temperatura de las hojas puede emplearse como indicador de las diferencias en transpiración, pues incrementos en la transpiración llevan aparejada una disminución de la temperatura de la hoja (Merlot *et al.*, 2002). Cuando se analizó la emisión infrarroja de





desviación estándar de 10 réplicas (plantas) que recibieron el mismo tratamiento. Un mínimo de 4 hojas por planta se analizaron simultáneamente mediante su correcto posicionamiento para la toma de imágenes térmicas. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o plantas sometidas a estrés por sequía) se analizaron independientemente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre las plantas hidratada y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, o entre tratamientos de interés, se efectuaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ; ns, diferencias no significativas).

**C.** Efecto de la sequía en la conductancia estomática de plantas infectadas o no infectadas crecidas en condiciones de riego habitual (10 dpa), a 3 dpr (13 dpa) o a 5 dpr (15 dpa). Las diferencias entre medias correspondientes a plantas de cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas, plantas a 3 dpr o plantas a 5 dpr) se analizaron independientemente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,005 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,005$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, o entre tratamientos de interés, se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ; ns, diferencias no significativas).

**D.** Para el análisis del contenido de estomas se realizaron impresiones en agarosa correspondientes a la cara abaxial de las hojas, las cuales se examinaron bajo microscopio. Se tomaron imágenes a 20X y se analizó el número de estomas y de células epiteliales ( $n = 40$  campos por tratamiento). Se analizaron estadísticamente las diferencias entre los promedios de densidad estomática (número de estomas por campo) por tratamiento vírico mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). Las imágenes mostradas se corresponden con campos representativos de plantas no infectadas o infectadas con PPV. La barra de escala, en la esquina superior izquierda de estas imágenes, representa 40  $\mu\text{m}$ . El índice estomático (relación número de estomas:número total de células de la epidermis, incluido estomas) se calculó a partir de estas imágenes; la comparación de los valores promedios de este índice entre plantas no infectadas o infectadas con PPV se realizó con el test t de Student, sin que se determinasen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). GUS o GFP hacen referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinfiltrados con GUS o GFP).

estas plantas, a través de la toma de imágenes térmicas, se determinó un incremento de la temperatura de las plantas infectadas hidratadas, en comparación con las no infectadas hidratadas, más acentuada en el caso de la infección con PPV-P25 (**FIG. 26B**). Estos resultados sugieren que las plantas de *N. benthamiana* infectadas presentan una conductancia estomática reducida en comparación con las no infectadas. De hecho, cuando se efectuaron medidas de conductancia estomática en estas

mismas plantas, mediante la aplicación directa de un conductímetro o “porómetro” sobre la hoja, se observó que efectivamente estas infecciones víricas ocasionaban una disminución de la conductancia estomática, mucho más acentuada en la infección con PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV (**FIG. 26C**). Estos resultados muestran una correlación entre una mayor tolerancia a la sequía y unos menores niveles de transpiración en *N. benthamiana* bajo el efecto de las infecciones analizadas.

Tras varios días de ausencia de riego, las plantas infectadas con PVX o con PPV mostraron una reducción en la conductancia estomática, en comparación con lo observado para estas mismas infecciones bajo riego habitual, mientras que las infectadas con PPV-P25 o la combinación PVX-PPV no mostraron cambios en la conductancia a lo largo del tiempo (**FIG. 26C**). En concordancia con estas últimas observaciones, la temperatura de las plantas infectadas con PPV-P25 o con PVX-PPV no mostró cambios significativos cuando se crecieron bajo riego o cuando se sometieron a estrés por sequía (**FIG. 26B**). Es más, tanto la temperatura como la conductancia estomática que mostraron las plantas no infectadas bajo déficit hídrico fue similar al observado para las plantas infectadas con PPV-P25 o PVX-PPV crecidas bajo riego habitual.

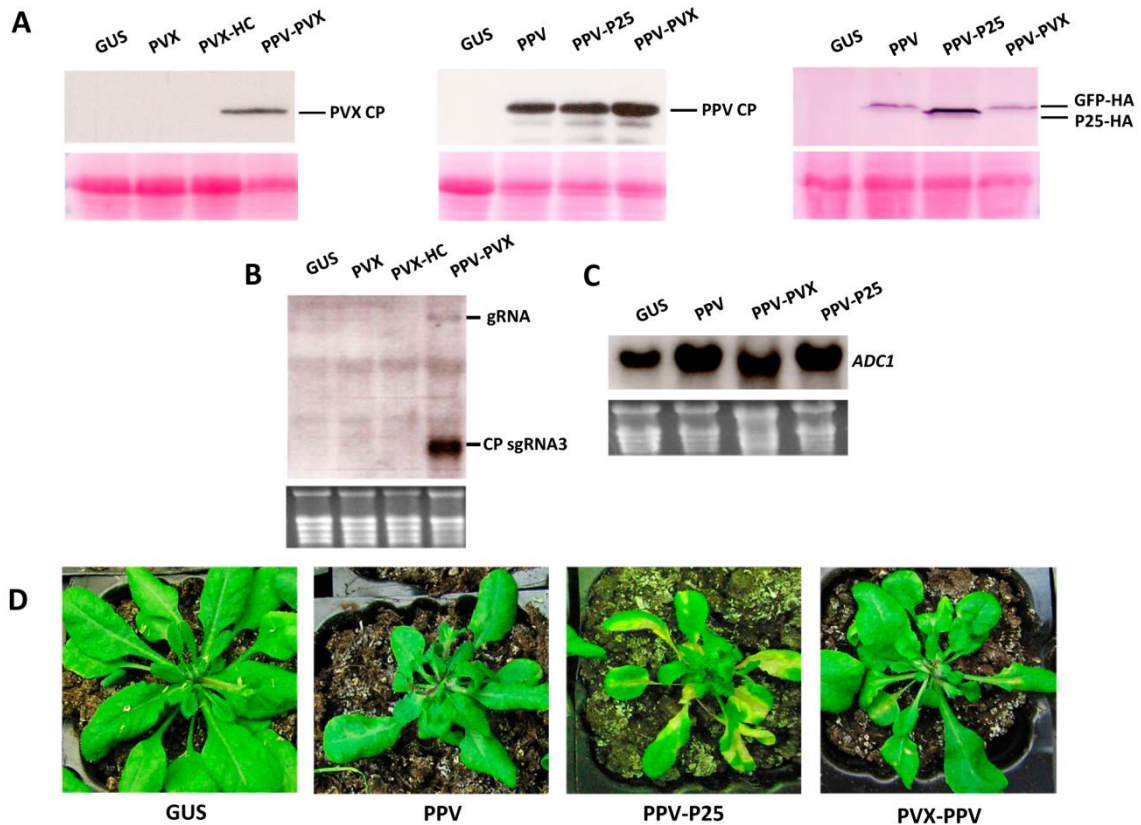
Posteriormente, se examinó si las infecciones podrían estar induciendo alteraciones en el número de estomas, para lo que se realizaron impresiones en agarosa de la parte abaxial de la hoja, y se analizaron por microscopio. Este análisis llevó a la conclusión de que, efectivamente, la densidad estomática era mayor en las plantas infectadas con los distintos virus en relación a las plantas no infectadas. Debido a que las células epidérmicas de las plantas infectadas eran menores que las de las plantas no infectadas, el índice estomático (proporción  $n^{\circ}$  estomas / [ $n^{\circ}$  células epidérmicas +  $n^{\circ}$  estomas]) fue similar en todas ellas (**FIG. 26D**). Todos estos resultados sugieren que, pese al incremento observado en la densidad estomática, las infecciones de *N. benthamiana* con los virus analizados modulan la conductancia estomática en el mismo sentido en el que lo hacen las plantas no infectadas durante el estrés hídrico, esto es cerrando estomas para evitar la pérdida de agua.

### 6.1.3. Tolerancia a la sequía en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con virus

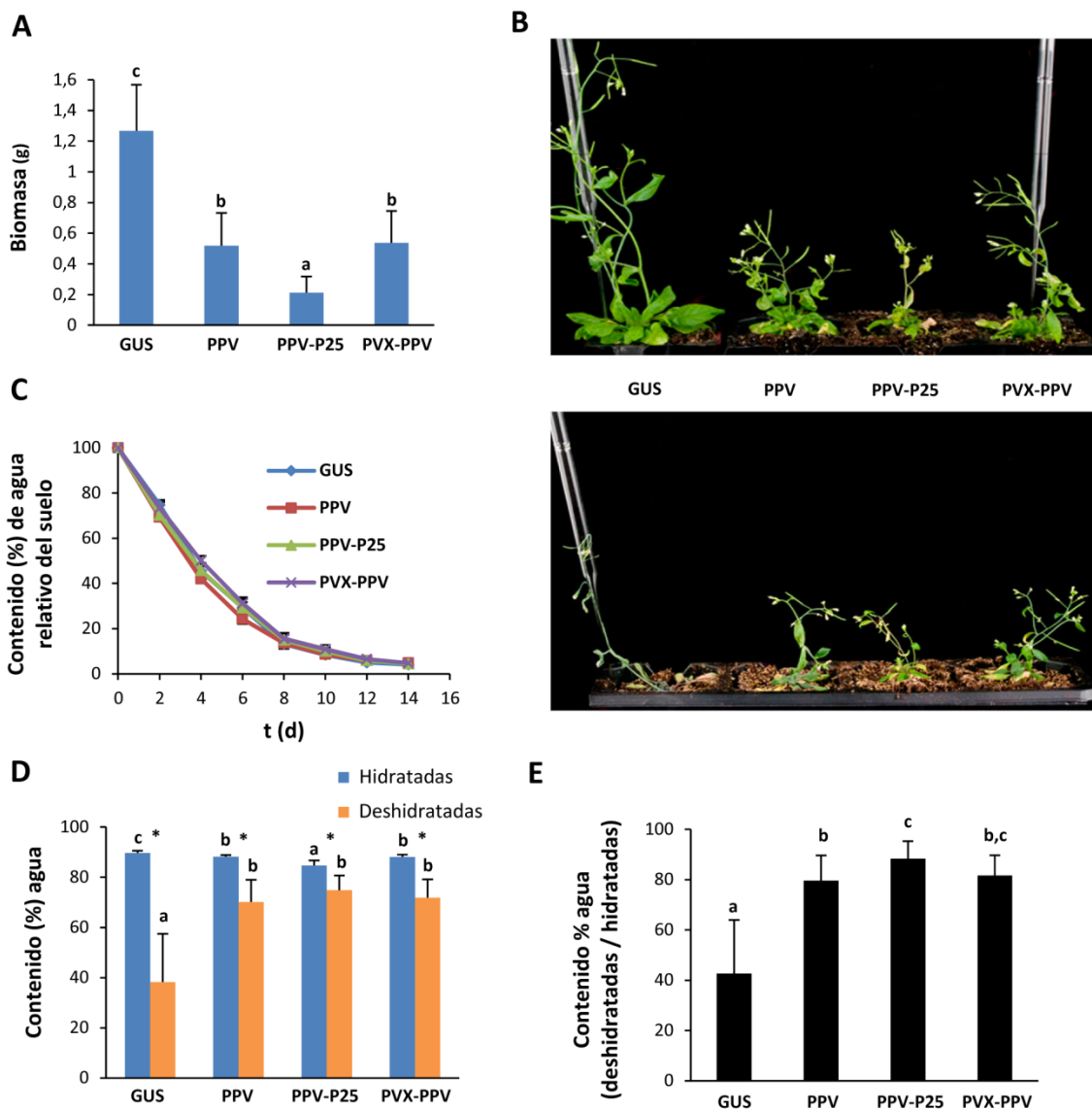
Para estudiar la tolerancia a la sequía en esta planta modelo, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que las plántulas de *A. thaliana* se crecieron *in vitro* y se agroinocularon con GUS, PVX, PPV, PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV. Los niveles de acumulación de los virus se analizaron por *western blot* y *northern blot* en extractos derivados de hojas jóvenes de la roseta, no inoculadas, a los 11 dpa (**FIG. 27A** y **27B**). *A. thaliana* se ha descrito habitualmente como un “no huésped” para PVX (Jaubert *et al.*, 2011); otros autores han sido capaces de detectar acumulación sistémica de PVX en este hospedador, aunque a niveles mínimos, en lo que ha sido descrito como una “infección subliminal” (Andika *et al.*, 2015). Sin embargo en el presente trabajo, la acumulación de PVX en *A. thaliana* solo fue detectable en coinfecciones con PPV. Es más, la infección con la quimera PVX-HC, la cual expresa el VSR de PPV (PPV HC), tampoco llevó a una acumulación del virus detectable por *western* o *northern blot*. Estas observaciones sugieren que la replicación de PVX en este hospedador podría no estar limitada exclusivamente por el silenciamiento génico. Por todo ello, las infecciones sencillas con PVX se excluyeron de este análisis.

A los 11 días post-agroinoculación (11 dpa), las plantas se transfirieron desde la placa a crecimiento en tierra. Todos los tratamientos continuaron con el riego habitual o se sometieron a estrés por sequía a partir de los 16 dpa. Los síntomas de infección observados en las plantas inoculadas con PPV-P25 fueron pronto mucho más graves que los observados en las infectadas con PPV o con la combinación PVX-PPV, incluyendo fuerte retraso del crecimiento, rizado de hojas y mayor necrosis (**FIG. 27D**). La gravedad de los síntomas de la infección, estimada a través de sus efectos sobre la cantidad de biomasa generada por la planta (tejido aéreo) en condiciones de riego habitual, fue mayor para PPV-P25 que para PVX-PPV o PPV, a los 30 dpa (**FIG. 28A**).

Una vez suprimido el riego, comenzaron a aparecer los primeros síntomas de deshidratación en las plantas no infectadas, consistentes en hojas lacias y marchitas, y tallos deshidratados (**FIG. 28B**, panel inferior).



**FIGURA 27. Efectos de la infección en *A. thaliana* y acumulación viral.** **A.** Análisis por *western blot* de extractos procedentes de hojas de la roseta no agroinoculadas, a los 11 dpa, utilizando anticuerpos anti-PVX CP (panel izquierdo), anti-PPV CP (panel central) y contra el epítipo de hemaglutinina (anti-HA, panel derecho); este anti-HA permite detectar las proteínas expresadas a partir de los vectores PPV, esto es GFP-HA (para PPV [PPV-GFP]) y P25-HA (para PPV-P25). El panel situado inmediatamente debajo de cada hibridación muestra la membrana teñida con Ponceau-S justo después de la transferencia, a modo de control de carga. **B.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total empleando una DIG-ribosonda complementaria a la secuencia de la CP de PVX. En la imagen se señalan el RNA genómico (gRNA) y uno de los RNAs subgenómicos (el sgRNA3, a partir del cual se expresa la CP, o CP sgRNA3). Las bandas específicas correspondientes a las secuencias de PVX aparecieron solo tras unos tiempos de exposición elevados. **C.** Análisis por *northern blot* de extractos de RNA total empleando una  $^{32}\text{P}$ -sonda complementaria a la secuencia de ADC1, gen de biosíntesis de putrescina (Put). Debajo de los *northern blots* se muestran los geles previos en los que se corrió el extracto de RNA total, teñidos con bromuro de etidio, a modo de control de carga. **D.** Imágenes de fenotipos representativos de *A. thaliana* infectada con los distintos virus empleados en estos experimentos, a 16 dpa. Nótese la mayor gravedad de los síntomas inducidos por la quimera PPV-P25 en este hospedador, manifestado a través de un incremento en la clorosis y en el número y extensión de lesiones necróticas. PVX-HC es la quimera correspondiente al virus PVX portando el factor HC de PPV. GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

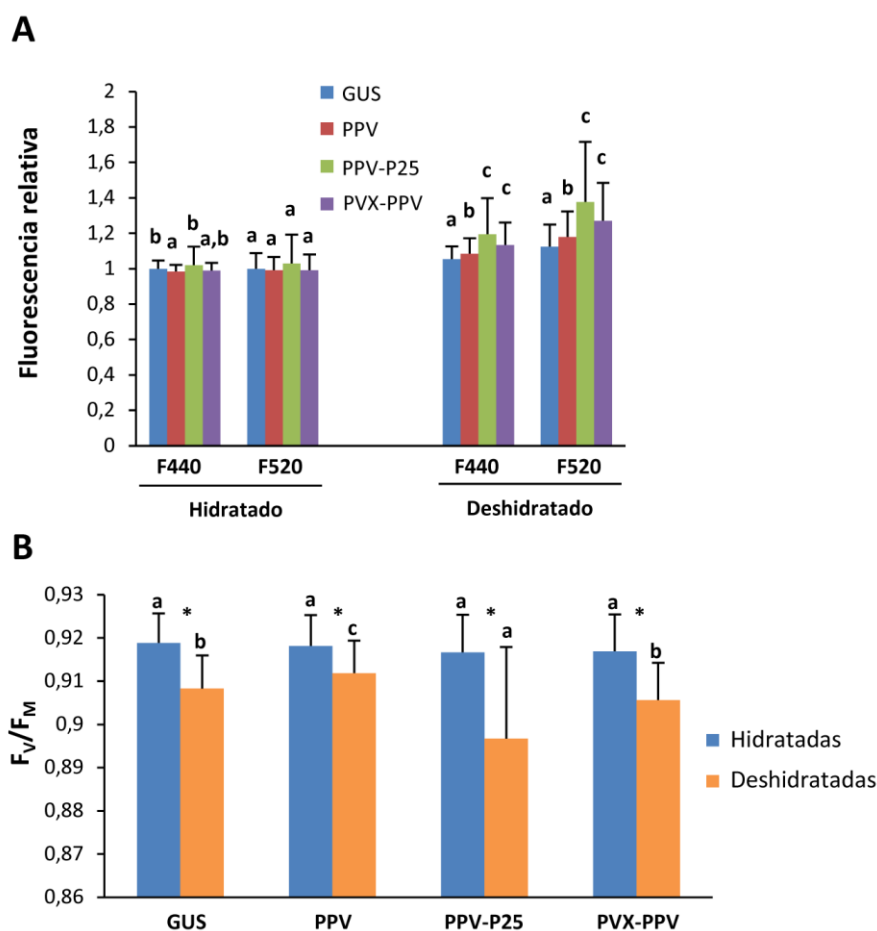


**FIGURA 28. Comparación de la tolerancia a la sequía entre plantas de *A. thaliana* no infectadas e infectadas por virus. A.** Producción de biomasa correspondiente al tejido aéreo de plantas hidratadas infectadas o no infectadas, a los 30 dpa. **B.** A los 12 dpr se fotografiaron una serie de plantas con fenotipo representativo (panel inferior), al lado de las cuales se muestran los correspondientes controles hidratados (sometidos al riego habitual) a la misma edad (panel superior). **C.** Determinación y evolución del contenido (%) en agua relativo del suelo después de 3 h de homogeneización con riego intenso (0 d), y en los días posteriores en ausencia de riego, hasta el final del experimento, para los tiestos correspondientes a plantas de cada uno de los tratamientos víricos (n = 20 por tratamiento). **D.** Contenido (%) en agua en plantas infectadas o no infectadas, sometidas a riego habitual o a estrés por sequía, a los 15 dpr. **E.** Proporción (%) entre el contenido (%) en agua de plantas deshidratadas frente al de las hidratadas que recibieron el mismo tratamiento vírico. En todos los casos se muestra el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de 14 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o plantas sometidas a estrés

por sequía) se analizaron independientemente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico se efectuaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

El estrés por sequía prolongada finalmente ocasionó el colapso completo de la planta. En las plantas infectadas, la aparición de los síntomas de deshidratación se retrasó varios días, y cuando comenzaron a aparecer fueron menos evidentes que en plantas no infectadas, mostrando en general mejor aspecto y mayor turgencia a lo largo de todo el experimento. La ADC1 (de *Arginine decarboxylase 1*; At2g16500) es una de las enzimas responsables de la biosíntesis de la Putrescina (Put), una poliamina implicada en la tolerancia a estreses abióticos (Alet *et al.*, 2011); el incremento de su expresión se confirmó en las plantas infectadas en el presente trabajo, mediante ensayos de *northern blot* (**FIG. 27C**). También se realizó una cinética del contenido (%) relativo de agua del sustrato, siendo similar en todos los tratamientos, lo que sugiere que la evaporación de agua es el principal motivo de la desecación del sustrato a medida que el estrés hídrico progresa (**FIG. 28C**), y permite descartar a este factor como responsable de las diferencias de comportamiento observadas entre plantas infectadas y no infectadas.

La alteración del metabolismo primario y secundario en las plantas infectadas se determinó mediante el análisis de la Chl-F y MCFI en hojas de la roseta. Bajo condiciones de riego habitual, el valor  $F_v / F_M$  fue equivalente en plantas infectadas y no infectadas, y solo se detectaron pequeñas diferencias entre tratamientos en la emisión de fluorescencia F440 (**FIG. 29**). Sin embargo, en etapas más avanzadas de la infección, a 7 dpr, las plantas infectadas mostraron niveles de fluorescencia F440 y F520 superiores a los de las plantas no infectadas, indicativos de la activación del metabolismo secundario, particularmente notable en el caso de las plantas infectadas con PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV. También se registraron disminuciones del valor  $F_v / F_M$  en las plantas infectadas con PPV-P25, indicativo de pérdida de actividad del PSII.



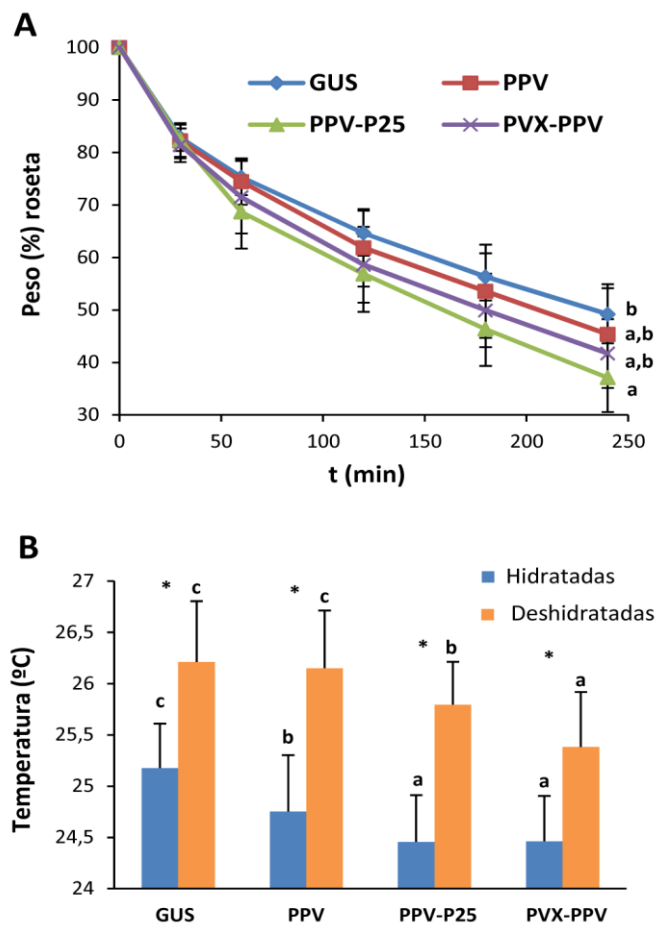
**FIGURA 29. Impacto de la infección viral en la fotosíntesis y el metabolismo secundario de *A. thaliana*.** **A.** Valores relativos de fluorescencia azul (F440) y verde (F520) determinada por técnicas de MCFI. **B.** Valores de eficiencia del PSII ( $F_v / F_M$ ) determinada por técnicas de Chl-F. Los análisis se realizaron sobre hojas de rosetas no infectadas o infectadas con virus, bajo condiciones de riego habitual (a los 16 dpa) o a los 7 dpr (23 dpa). Se obtuvieron cuatro imágenes de fluorescencia por tratamiento, consistentes en un mínimo de cuatro rosetas cada una, y se analizó la fluorescencia correspondiente a un mínimo de seis hojas por roseta. En A se tomaron como referencia los valores de fluorescencia correspondientes a las muestras de plantas hidratadas no infectadas, a los que se les asignó el valor 1, y el resto de muestras se calcularon en relación a ella. Los gráficos muestran los promedios de los valores de fluorescencia relativos  $\pm$  desviación estándar de 16 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se compararon entre sí de forma independiente para cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o sometidas a sequía) y tipo de fluorescencia (F440, F520 o Chl-F), mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,008$ ). Las comparaciones entre pares de medias de Chl-F, realizadas entre plantas hidratadas o deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

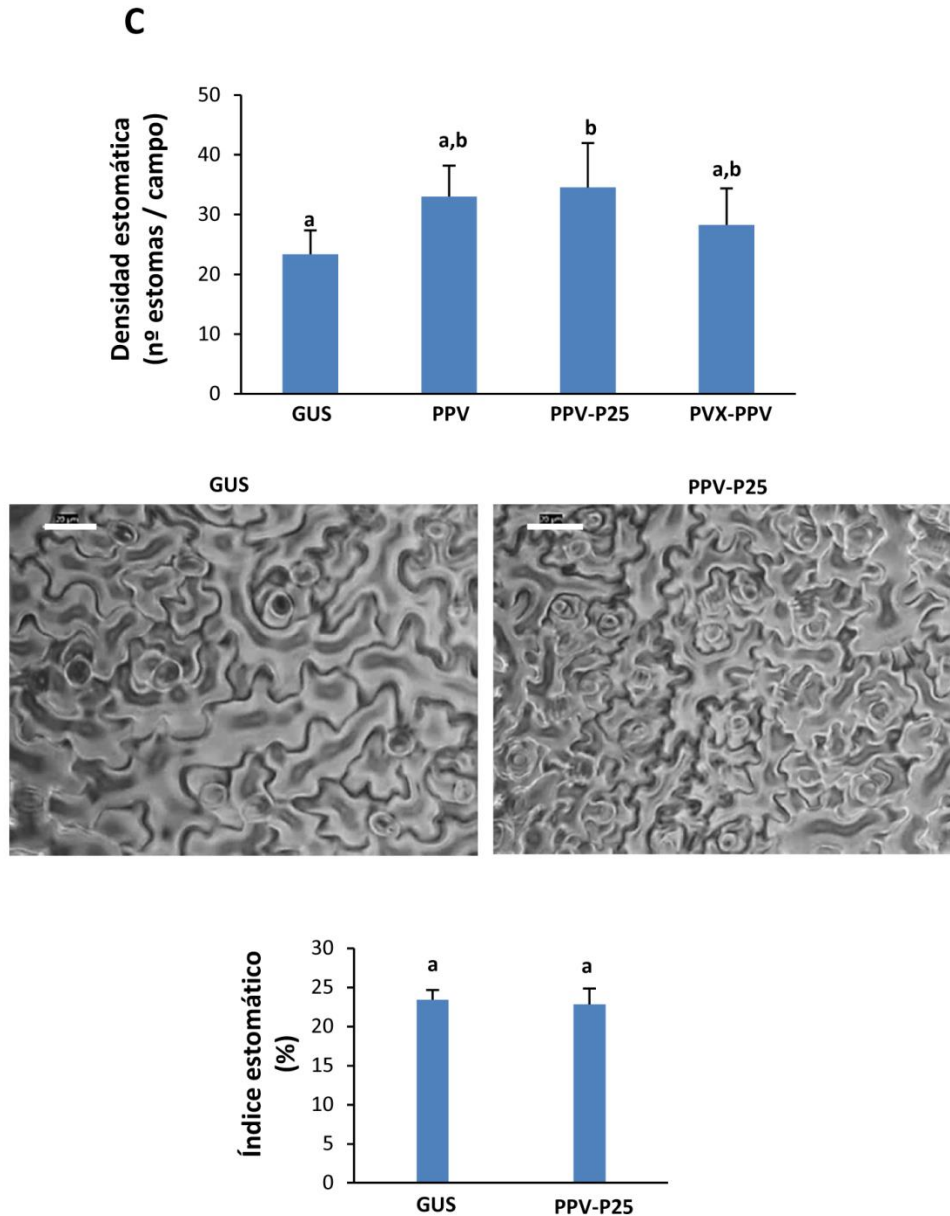
A los 30 dpa (14 dpr), se llevaron a cabo comparaciones del contenido en agua entre las plantas infectadas con los virus y las no infectadas. El contenido en agua promedio fue mayor en las plantas infectadas comparado con el de las plantas no infectadas, en crecimiento bajo estrés por sequía; en el caso de los controles mantenidos con riego habitual, el contenido en agua de las plantas infectadas fue inferior comparado con el de las plantas no infectadas (**FIG. 28D**). Además, el contenido en agua fue significativamente menor en las plantas hidratadas infectadas con PPV-P25 comparado con el de las infectadas con PPV o con la combinación PVX-PPV. También se llevó a cabo el cálculo de la proporción entre el contenido en agua de las plantas deshidratadas en relación a las hidratadas, obteniéndose para este parámetro un valor significativamente mayor en las infecciones con PPV-P25 en relación a las infecciones con PPV (**FIG. 28E**). Estos resultados sugieren para *A. thaliana*, al igual que para *N. benthamiana*, una correlación positiva entre la virulencia y la tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección.

#### **6.1.4. La transpiración se incrementa en plantas de *A. thaliana* infectadas por virus**

Para el análisis de la pérdida de agua a lo largo del tiempo en *A. thaliana*, se tomaron rosetas de plantas regadas de forma habitual, sanas o infectadas, las cuales se cortaron a ras de suelo. Como para *N. benthamiana*, estas curvas de pérdida de agua son indicativas del grado de transpiración (**FIG. 30A**). Paradójicamente, las plantas infectadas con PPV-P25 mostraron ser las de mayor grado de transpiración, pues su pérdida de peso tras la escisión fue significativamente más rápida que la de las plantas no infectadas, mientras que las infectadas con PPV o con la combinación PVX-PPV mostraron valores intermedios. La temperatura de las hojas de plantas hidratadas, medida mediante la toma de imágenes térmicas, fue menor en las plantas infectadas comparada con la de las plantas no infectadas, más acentuado en el caso de las infecciones con PPV-P25 o con la combinación PVX-PPV (**FIG. 30B**). A los 7 días de ausencia de riego (7dpr), la temperatura de las hojas de las plantas no infectadas y de las infectadas se incrementó en comparación

con la que se registró bajo riego habitual. Sin embargo, la temperatura de las hojas de plantas infectadas con PPV-P25 o PVX-PPV continuó siendo más baja que la del resto de tratamientos, y por tanto estas infecciones indujeron en la planta mayores tasas de transpiración que en las plantas no infectadas. De este modo, las diferencias entre tratamientos en las tasas de transpiración antes y después del establecimiento del estrés por sequía, no tuvieron correlación con la tolerancia incrementada observada en las plantas infectadas de *A. thaliana*. Al igual que para *N. benthamiana*, en *A. thaliana* infectada con PPV-P25 también se determinó una mayor densidad estomática, pero igual índice estomático, en comparación con las plantas no infectadas. Para plantas infectadas con PPV o con PVX-PPV también se observó una tendencia hacia un incremento en el número de estomas, comparado con las plantas no infectadas (**FIG. 30C**).



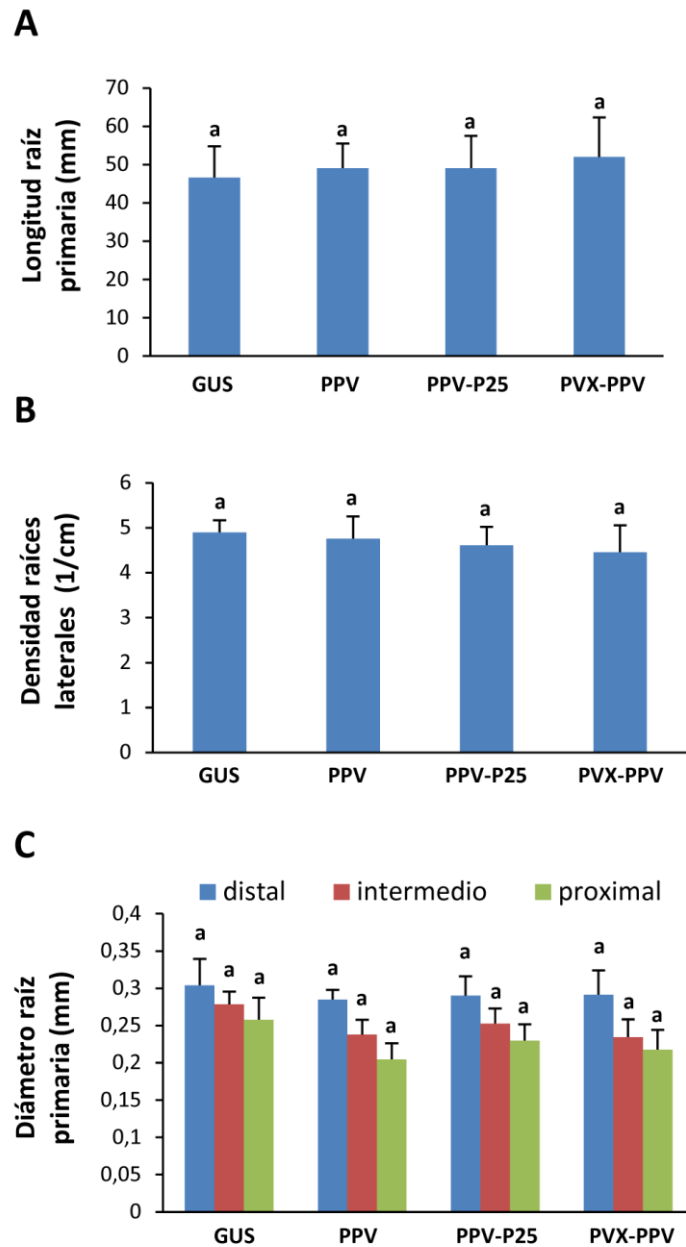


**FIGURA 30 (comienza en la página anterior).** Comparaciones de pérdida de agua entre plantas de *A. thaliana* no infectadas o infectadas con virus. **A.** Doce rosetas procedentes de plantas sanas o infectadas se cortaron a ras de suelo a los 23 dpa y se colocaron sobre una placa Petri con la cara abaxial expuesta. Tras medir el peso inicial de estas muestras, se continuaron efectuando medidas cada cierto intervalo de tiempo, durante un período de 4 h, considerando el peso inicial como el valor 100% de contenido en agua, y calculando los pesos de cada uno de los tiempos posteriores como un porcentaje relativo al mismo. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). **B.** Temperaturas promedio de las hojas de plantas no infectadas o infectadas por virus, bajo riego habitual (a los 16 dpa) o a los 7 dpr (23 dpa). Los gráficos representan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 réplicas (cada una de 4 plantas) que recibieron el mismo tratamiento. Un mínimo de 6 hojas por

planta se analizaron simultáneamente mediante su correcto posicionamiento para la toma de imágenes térmicas. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o plantas sometidas a estrés por sequía) se analizaron independientemente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (diferentes letras indican diferencias significativas,  $P < 0,008$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). **C.** Para el análisis del contenido de estomas se realizaron impresiones en agarosa correspondientes a la cara abaxial de las hojas, las cuales se examinaron bajo microscopio. Se tomaron imágenes a 20X y se analizó el número de estomas y de células epiteliales ( $n = 40$  campos por tratamiento). Se analizaron estadísticamente las diferencias entre los promedios de densidad estomática (número de estomas por campo) por tratamiento vírico mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). Las imágenes mostradas se corresponden con campos representativos de plantas no infectadas o infectadas con PPV-P25. La barra de escala, en la esquina superior izquierda de estas imágenes, representa 40  $\mu\text{m}$ . El índice estomático (relación número de estomas:número total de células de la epidermis, incluido estomas) se calculó a partir de estas imágenes; la comparación de los valores promedios de este índice entre plantas no infectadas o infectadas con PPV-P25 se realizó con el test t de Student, sin que se determinasen diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

Estos resultados muestran que en *A. thaliana* las infecciones con estos virus incrementan la densidad estomática, lo que podría relacionarse con las mayores tasas de transpiración observadas en comparación con las plantas no infectadas, incluso en situaciones de estrés hídrico.

Estudios previos han demostrado como la modificación de la arquitectura radicular puede incrementar la tolerancia a la deshidratación (Uga *et al.*, 2013). Por ello, en este trabajo también se efectuaron análisis comparativos del sistema radicular de plantas infectadas y no infectadas, consistentes en la cuantificación de parámetros de la raíz primaria y de la densidad de raíces laterales, analizadas a los 11 dpa a través de ImageJ. No se observaron diferencias significativas en el valor de ninguno de los parámetros analizados, entre plántulas infectadas y no infectadas (**FIG. 31**).



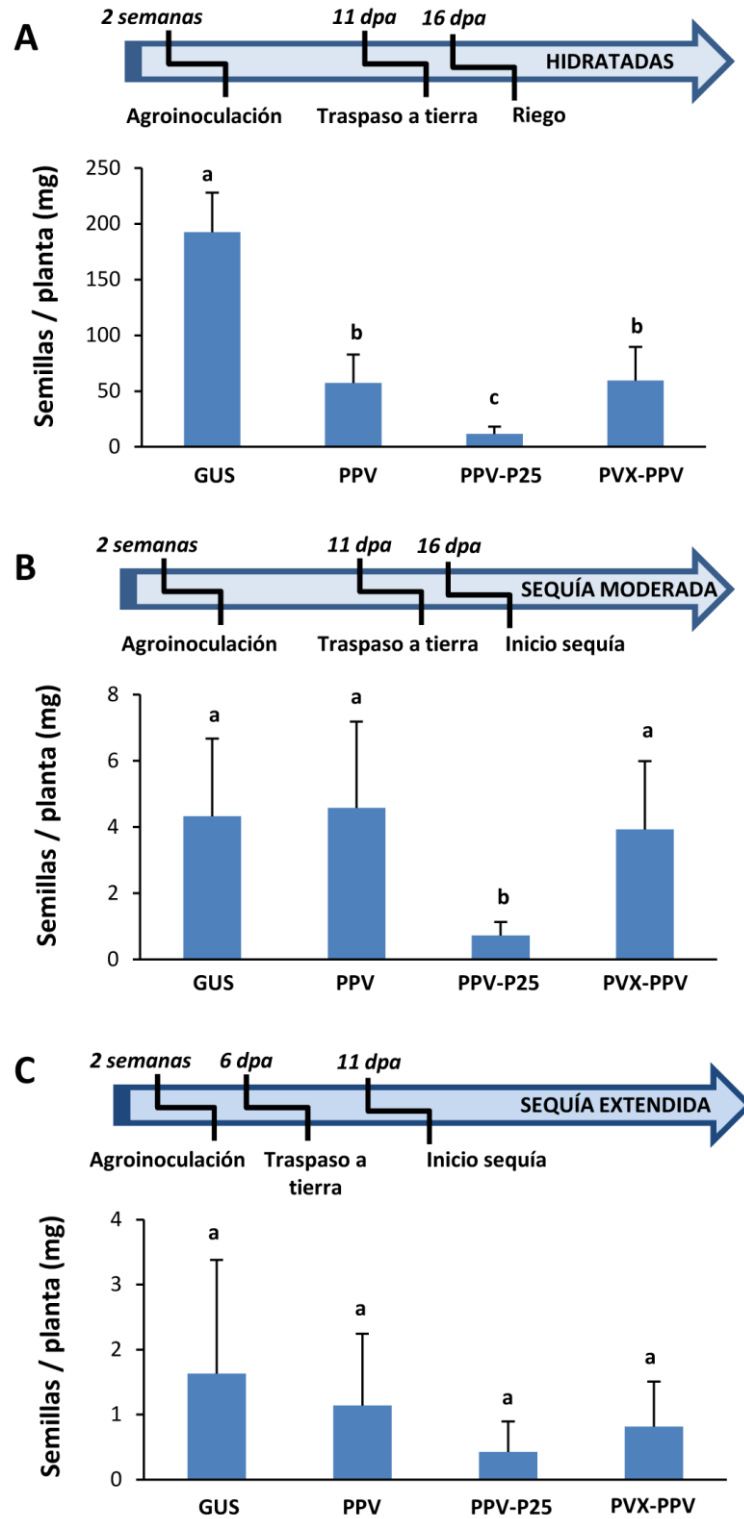
**FIGURA 31. La arquitectura radicular en *A. thaliana* no se altera por la infección.** Los parámetros de las raíces se determinaron en plántulas crecidas en placas verticales, a los 11 días tras la agroinfiltración de los distintos virus (21 días de edad). Los parámetros analizados fueron los siguientes. **A.** Longitud de la raíz primaria (mm). **B.** Número de raíces laterales por centímetro de raíz primaria (densidad de raíces,  $\text{cm}^{-1}$ ). **C.** Diámetro de la raíz principal (mm) medido a distintas alturas, desde el inicio hasta el extremo de la raíz. Los gráficos muestran los valores promedios  $\pm$  desviación estándar de 12 plántulas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias de medias de un mismo parámetro entre tratamientos víricos se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (mismas letras indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0.05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinocuidos con GUS).

### 6.1.5. Eficacia reproductiva (*fitness*) en plantas infectadas por virus

Se estimó el efecto de las distintas infecciones víricas en la eficacia reproductiva o biológica (*fitness*) en plantas de *A. thaliana* o de *N. benthamiana* crecidas bajo el régimen hídrico habitual o sometidas a estrés por sequía. Para ello, se determinó el número de plantas productoras de semillas y el peso total de semillas producidas en plantas infectadas bajo estas condiciones, y se compararon con la producción en las plantas no infectadas.

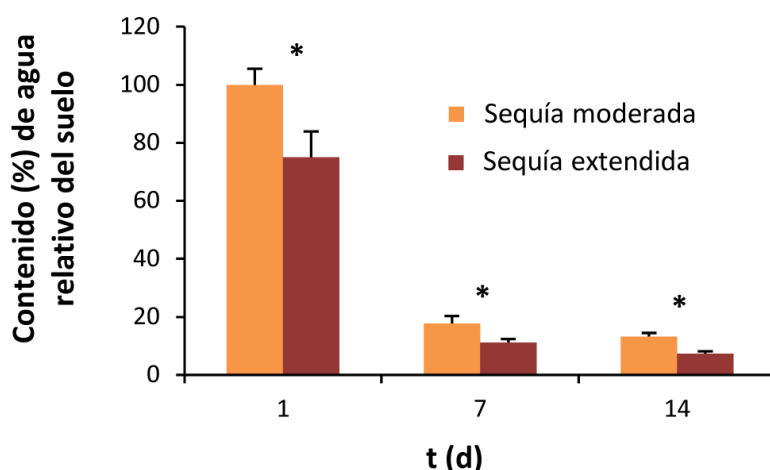
En *A. thaliana* bajo condiciones de riego habitual, las infecciones víricas no alteraron el número de plantas productoras de semillas (**TABLA 4**). Sin embargo, las plantas infectadas con PPV o con PVX-PPV mostraron una producción de semillas hasta cuatro veces menor en comparación con la producción de las plantas no infectadas; la infección con PPV-P25 tuvo un efecto negativo aún mayor en la eficacia biológica (**FIG. 32A**). Bajo las condiciones de estrés hídrico habituales (sequía moderada), la producción de semillas en plantas infectadas con PPV o con PVX-PPV se igualó a la de las plantas no infectadas, con diferencias negligibles en el número de plantas productoras de semillas. La infección por PPV-P25, aun en condiciones de estrés hídrico, ocasionó un efecto negativo sobre la producción de semillas por planta, en relación al resto de tratamientos (**FIG. 32B, TABLA4**).

Se examinó el efecto en *A. thaliana* de un estrés por sequía más acentuado (sequía extendida), transfiriendo las plantas agroinoculadas de placa a tierra a los 6 dpa, en vez de a los 11 dpa habituales, y permaneciendo sin riego desde los 11 dpa, y no desde los 16 dpa habituales. Las diferencias en el contenido de agua relativo del suelo bajo estos dos tipos de estreses hídricos se confirmaron a distintos días, tal y como se muestra en la **FIG. 33**. Bajo el estrés por sequía extendida se observó una eficacia biológica incrementada (de hasta el doble) en las plantas infectadas con PPV o con PVX-PPV, en comparación con las plantas no infectadas, como se puso de manifiesto a través del número de plantas productoras de semillas (**TABLA 4**). No se observaron diferencias significativas en la producción de semillas entre plantas



**FIGURA 32.** Efectos de la infección con virus en la producción de semillas (eficacia biológica o *fitness*) en plantas de *A. thaliana* crecidas bajo distintos regímenes hídricos. Los esquemas ilustran el diseño experimental para de las plantas sometidas a hidratación por riego habitual (A), o a estrés por sequía moderada (B) o extendida (C). Las semillas se recogieron, limpiaron y pesaron separadamente para cada planta. El número de individuos analizados por tratamiento vírico fue de 12 (no infectadas), 27 (PPV), 19 (PPV-P25) y 21 (PVX-PPV) para plantas hidratadas; 30 (no infectadas), 26 (PPV), 24 (PPV-P25) y 21 (PVX-PPV) para plantas hidratadas; 30 (no infectadas), 26 (PPV), 24 (PPV-P25)

y 23 (PVX-PPV) para sequía moderada; y 11 (no infectadas), 23 (PPV), 8 (PPV-P25) y 26 (PVX-PPV) para sequía extendida. Los gráficos muestran el promedio del peso de semillas por planta  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (A) o con T3 de Dunnett (B y C) (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).



**FIGURA 33. Análisis del estatus hídrico del suelo en sequía moderada y sequía extendida.** El contenido (%) en agua relativo del suelo se determinó un día después de haber eliminado la bolsa de plástico ( $t = 1$ ), momento a partir del cual las plantas no se volvieron a regar. A diferencia de las plantas sometidas a sequía extendida, las plantas del tratamiento de sequía moderada recibieron un riego intenso de 3 h inmediatamente después de la apertura de la bolsa de plástico. Este parámetro se analizó también a 7 y a 14 días tras el inicio del estrés hídrico. El gráfico muestra los valores promedios  $\pm$  desviación estándar de 15 plantas que recibieron el mismo tratamiento para cada día. Las comparaciones de medias realizadas para cada día entre sequía moderada y sequía extendida se realizaron con el test de U de Mann-Whitney (el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ).

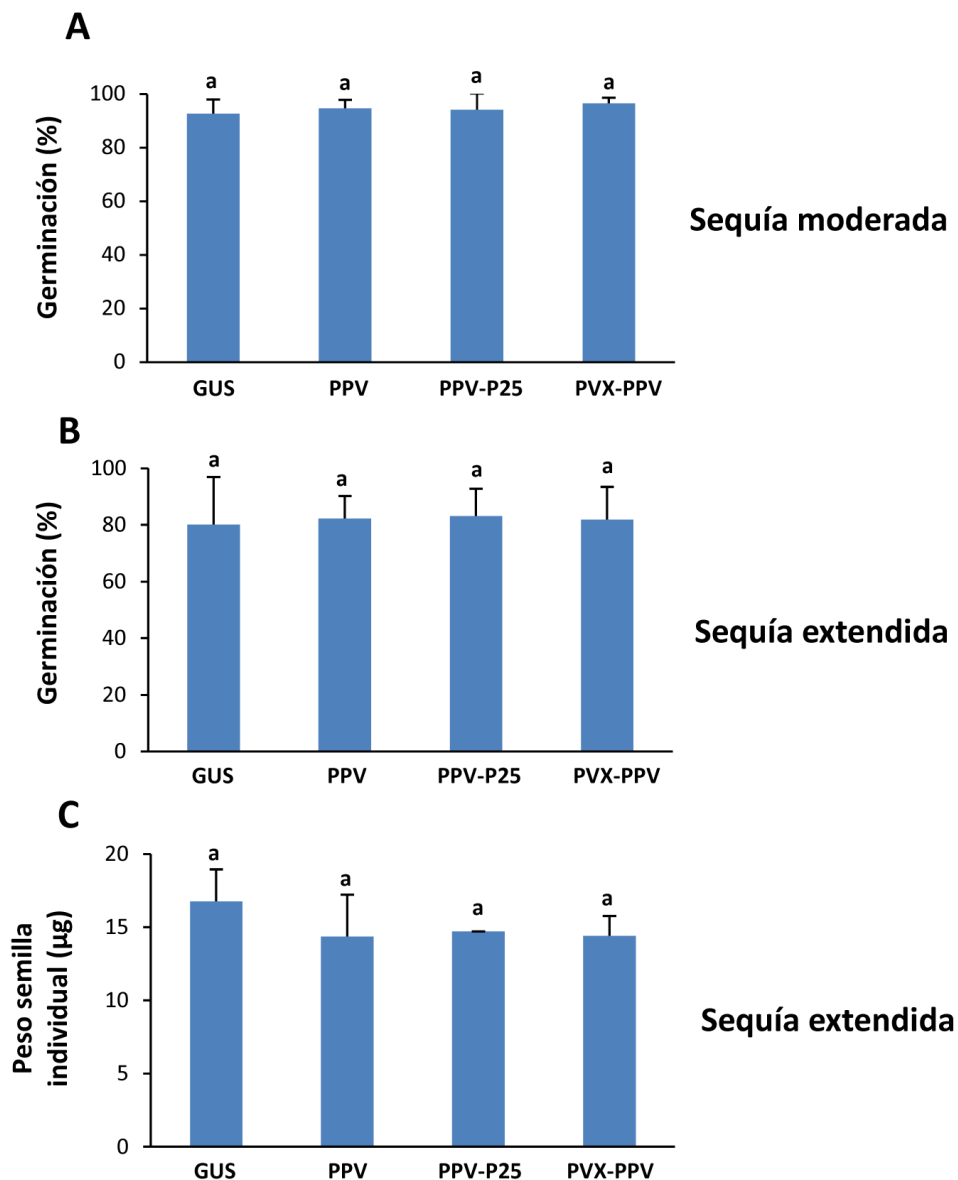
infectadas o no infectadas bajo estas condiciones de sequía extendida (**FIG. 32C**). Las infecciones tampoco afectaron al peso individual de la semilla o a la viabilidad de las mismas, tanto en condiciones de sequía moderada como de sequía extendida (**FIG. 34**). Por tanto, las infecciones con PPV o con la combinación PVX-PPV fueron capaces de conferir

una mayor eficacia biológica a *A. thaliana* en condiciones de estrés por déficit hídrico extendido.

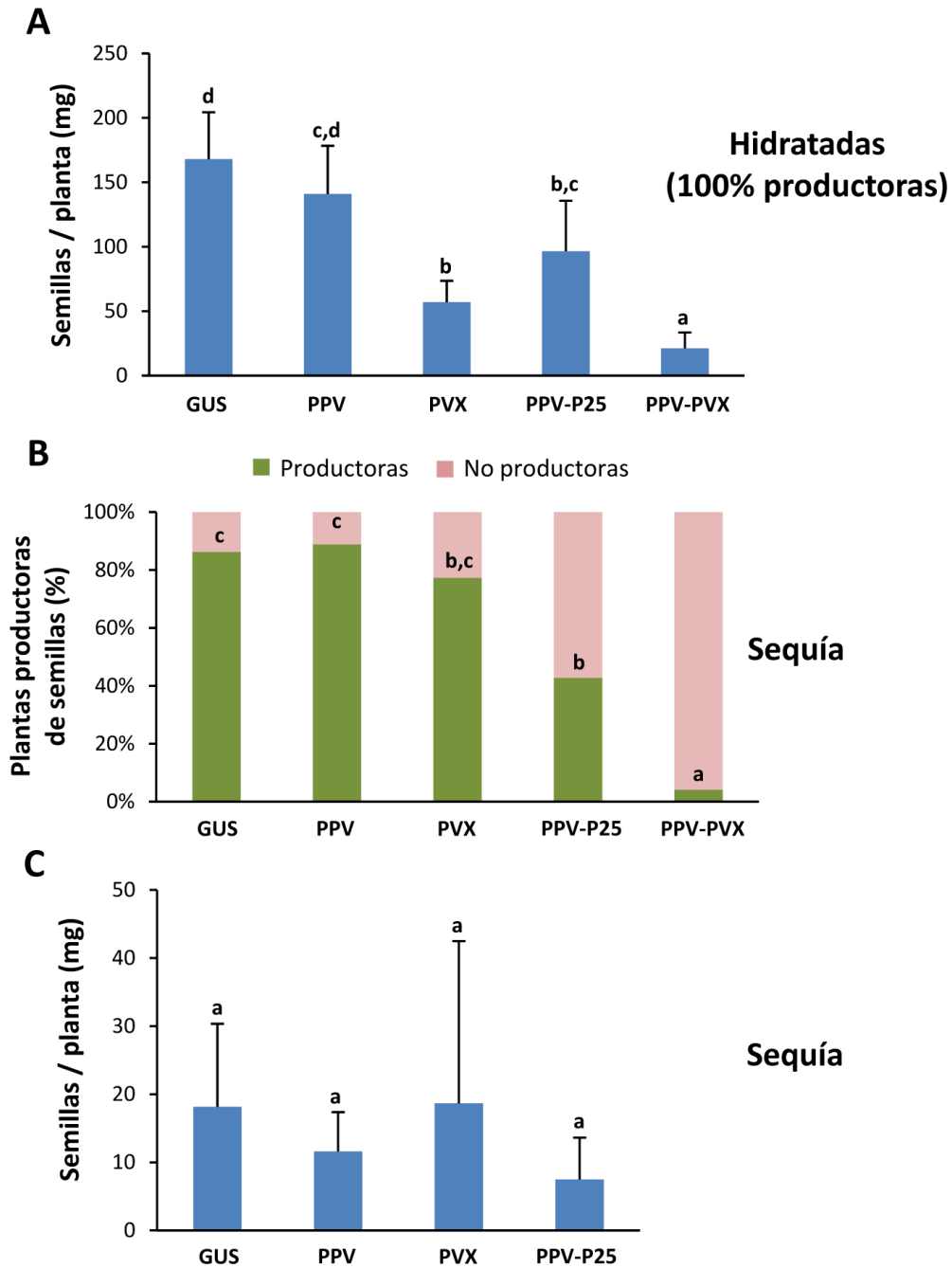
Hidratación	Infección	n	%
Riego habitual	GUS	12	100a
	PPV	19	100a
	PPV-P25	27	100a
	PVX-PPV	21	100a
Sequía moderada	GUS	35	45,7a
	PPV	37	40,5a
	PPV-P25	38	31,6a
	PVX-PPV	38	39,5a
Sequía extendida	GUS	63	20,6a
	PPV	77	44,1b
	PPV-P25	79	10,1a
	PVX-PPV	72	43b

**TABLA 4.** Efectos de las infecciones víricas sobre el número (%) de plantas de *A. thaliana* productoras de semillas, bajo condiciones de riego habitual, estrés por sequía moderada o estrés por sequía extendida. Las diferencias en los % de plantas productoras entre infecciones dentro de un mismo tratamiento hídrico (plantas hidratadas, en sequía moderada o en sequía extendida) se analizaron independientemente con el test exacto de Fisher, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (diferentes letras indican diferencias significativas,  $P < 0,008$ ). Con: n, como número de plantas analizadas en la producción de semillas; %, porcentaje de plantas productoras de semillas determinado sobre el total n; GUS, hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

En *N. benthamiana*, las infecciones con PVX, PPV-P25 o PVX-PPV tuvieron un efecto negativo en la producción de semillas bajo condiciones de riego habitual. Bajo condiciones del estrés por sequía, sin embargo, la producción de semillas y el número de plantas productoras de semillas en infecciones con PVX fue equivalente al de las plantas no infectadas. Las plantas infectadas con PPV-P25 o PVX-PPV, bajo estrés por sequía, presentaron reducciones muy importantes en el número de plantas productoras de semillas (PPV-P25 y PVX-PPV) y en la producción de semillas (PVX-PPV) (**FIG. 35**).



**FIGURA 34.** Efecto de la infección en la viabilidad de las semillas y en el peso individual de la semilla en *A. thaliana* crecida bajo estrés por sequía moderada o extendida. **A.** Viabilidad de semillas en sequía moderada. **B.** Viabilidad de semillas en sequía extendida. A y B, se determinaron como el % germinación en ca. 100 semillas por planta, para lo que se analizaron las semillas producidas por 11 (sequía moderada) o 4 (sequía extendida) individuos por tratamiento vírico. **C.** Peso individual de cada semilla según tratamiento vírico bajo estrés por sequía extendida. El peso de cada semilla se estimó a partir del peso conjunto de una alícuota de 200 semillas por individuo, analizándose cuatro de estas alícuotas derivadas de otros tantos individuos. Las diferencias se analizaron estadísticamente en A mediante el test T3 de Dunnett, y en B y C con el test de múltiples rangos de Scheffé (mismas letras indican ausencia de diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).



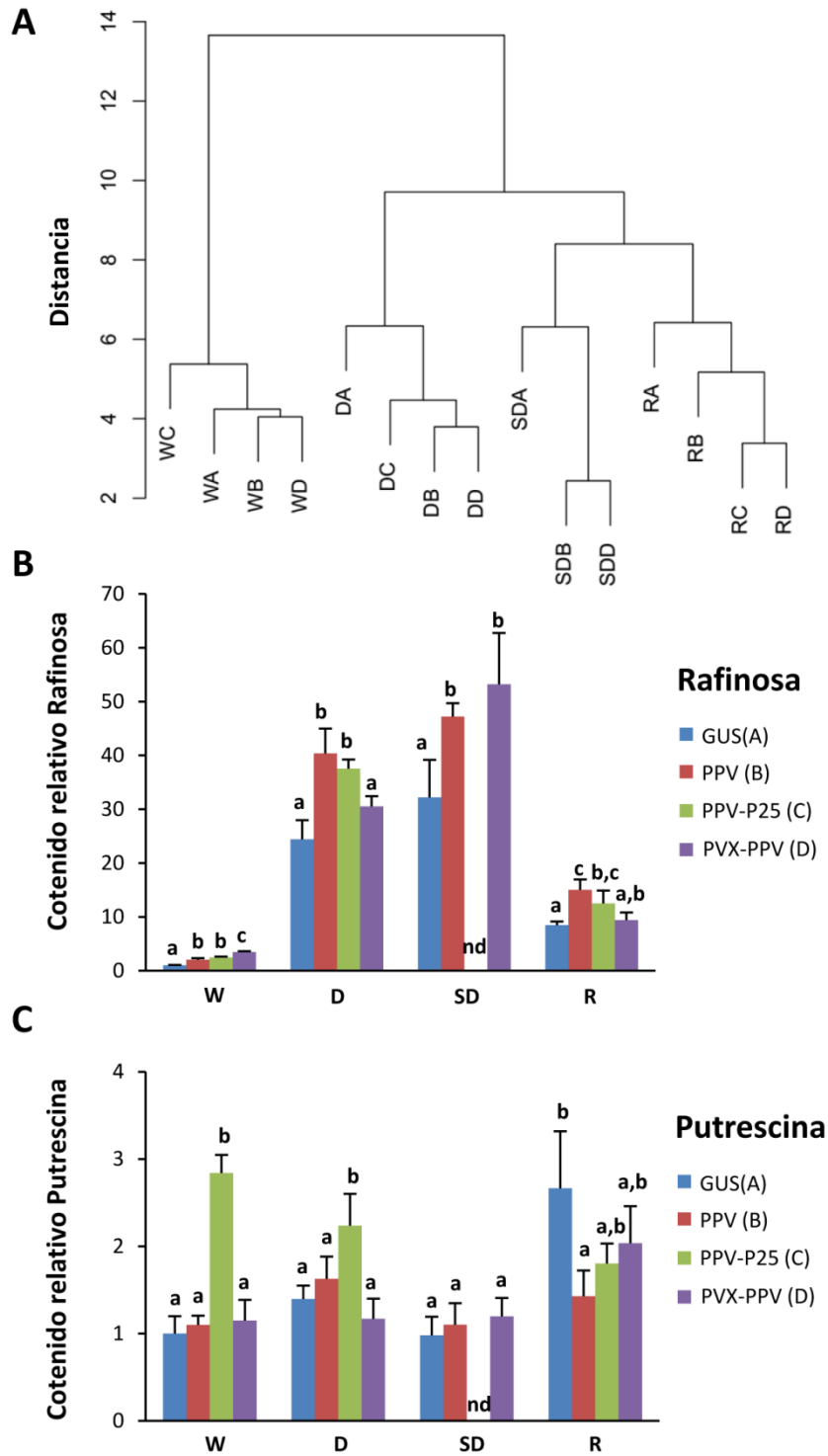
**FIGURA 35. Efectos de la infección con virus en la producción de semillas y en el número de plantas productoras de semillas (eficacia biológica o *fitness*) en plantas de *N. benthamiana*.** *N. benthamiana* se creció bajo condiciones de riego habitual (A) o condiciones de estrés por sequía (B y C). Todas las plantas crecidas bajo condiciones de hidratación, tanto infectadas como no infectadas, produjeron semillas. Las semillas se recogieron, limpiaron y pesaron separadamente para cada planta. El número de individuos analizados por tratamiento vírico fue en A (plantas hidratadas) de 7 (no infectadas), 7 (PVX), 7 (PPV), 7 (PPV-P25) y 6 (PVX-PPV); y en C (plantas en sequía) de 7 (no infectadas), 4 (PVX), 6 (PPV) y 4 (PPV-P25). De las tres repeticiones realizadas para B y C, solo hubo producción de semillas en un único individuo con infección mixta, siendo contabilizado para B pero impidiendo su inclusión en C. Los gráficos muestran en A y C el

promedio del peso de semillas por planta  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se analizaron estadísticamente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). En el gráfico B se muestran los % de plantas productoras de semillas. Las diferencias entre los % de plantas productoras-no productoras entre tratamientos víricos se analizaron estadísticamente mediante el test exacto de Fisher, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,005 para comparaciones múltiples (diferentes letras indican diferencias significativas,  $P < 0,005$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinfiltrados con GUS).

### **6.1.6. Análisis metabólico y hormonal de *A. thaliana* infectada por virus y sometida a estrés por sequía**

Para estudiar el impacto de la infección viral y la falta del agua en la respuestas de la planta, se analizó el perfil metabólico y hormonal en muestras de hojas de *A. thaliana* infectada o no infectada a 16, 23 y 26 dpa, tiempos de infección correspondientes a los regímenes hídricos de 0 dpr (tratamiento hidratado, W), 7 dpr (tratamiento de sequía suave, D) y 10 dpr (tratamiento de sequía intensa, SD), respectivamente. Además, un cuarto régimen hídrico analizado consistió en plantas sometidas a SD, a las que transcurridos los 10 dpr se rehidrató abundantemente durante 6 h (tratamiento de rehidratación, R). Las muestras correspondientes a plantas no infectadas se identificaron como “A”; y las infectadas por PPV, PPV-P25 o PVX-PPV como B, C o D, respectivamente. En las muestras de estos distintos tratamientos se analizaron los niveles de acumulación de 44 metabolitos a través de cromatografía de gases seguida de espectrometría de masas. Los niveles estimados de estos metabolitos se relativizaron respecto a su concentración en las plantas no inoculadas del tratamiento W (muestras WA) (TABLA S1, en soporte electrónico). Los compuestos identificados se clasificaron en una de las siguientes tres categorías: azúcares y alcoholes de azúcares (14 compuestos), aminoácidos y aminas (21) y ácidos orgánicos (9).

Para determinar el grado de similitud de los distintos tratamientos de acuerdo a su perfil metabólico completo, se efectuaron análisis de agrupamiento jerárquico (de *Hierarchical clustering*) sobre el conjunto de todos los datos metabólicos obtenidos (FIG. 36A). El principal factor



**FIGURA 36.** Perfil metabólico de plantas de *A. thaliana* infectadas con virus o no infectadas, crecidas bajo diferentes regímenes hídricos. **A.** Agrupamiento jerárquico (*Hierarchical clustering*) realizado sobre el conjunto de todos los datos metabólicos, en el que quedan separadas en distintas ramas las muestras correspondientes a distintos regímenes hídricos. El conjunto de datos metabólicos procede del análisis de 4 muestras (4 réplicas,  $n=4$ ) obtenidas por tratamiento hídrico y por infección, en las que se analizaron los niveles de 44 metabolitos representativos. Los regímenes hídricos seguidos fueron: riego habitual o tratamiento hidratado (W), sequía (D), sequía intensa (SD) y rehidratación (R). Los

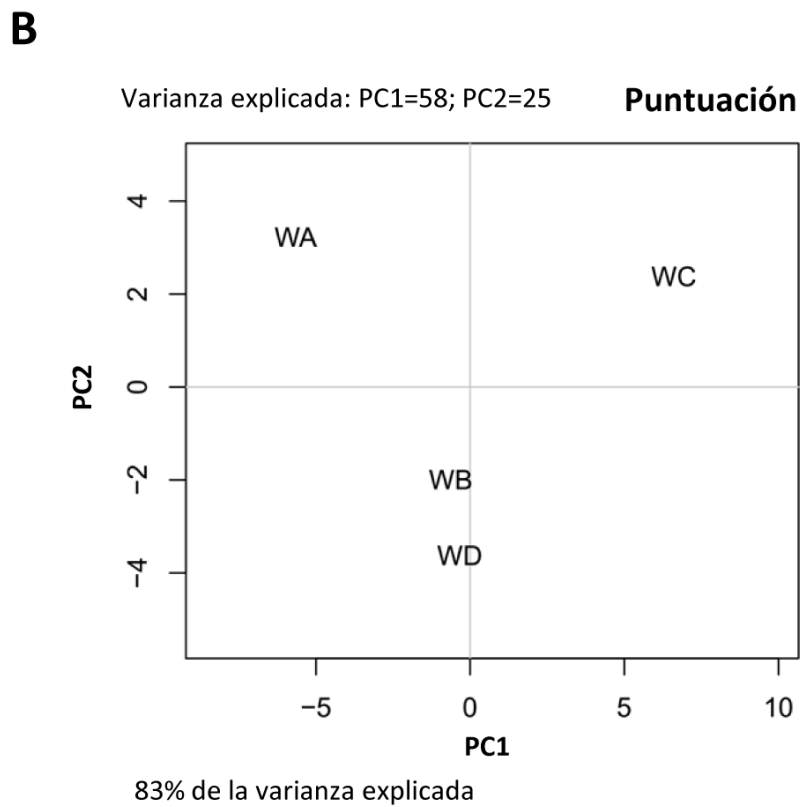
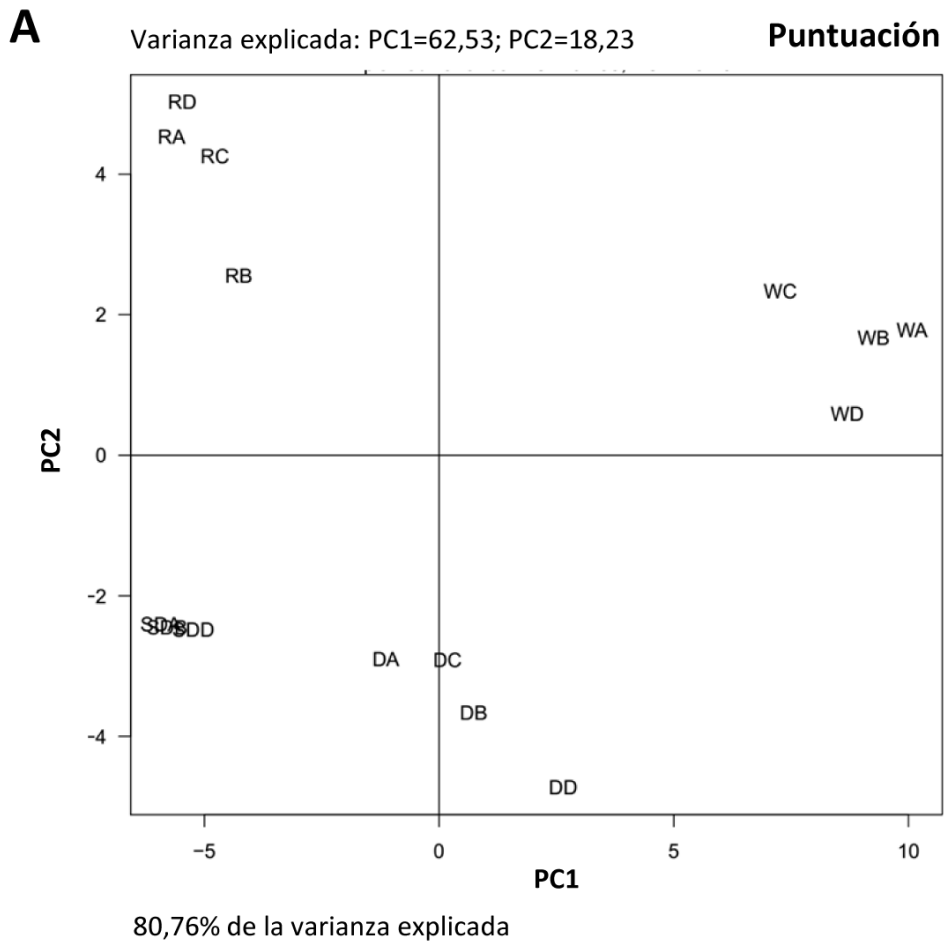
tratamientos víricos seguidos fueron: plantas no infectadas (A), PPV (B), PPV-P25 (C) y PVX-PPV (D). El agrupamiento se realizó mediante programación en lenguaje R. **B.** Contenidos relativos de rafinosa. **C.** Contenidos relativos de putrescina (Put). Para B y C, la cantidad de metabolito por peso fresco de la muestra WA se tomó como referencia y se le asignó el valor de 1, calculando el resto de tratamientos en relación a este. Las gráficas muestran los valores relativos promedios  $\pm$  desviación estándar correspondientes a 4 réplicas. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se compararon entre sí de forma independiente para cada régimen hídrico, mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ; nd, muestras no determinadas). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

condicionante del agrupamiento fue el tipo de régimen hídrico al que estuvieron sometidas las plantas (W, D, SD y R), especialmente relevante en el caso de las muestras correspondientes a W, las cuales formaron un grupo aislado de las demás en el dendrograma obtenido. En este dendrograma, además, dentro de la rama correspondiente a las muestras W, las plantas infectadas con PPV-P25 (WC) también aparecieron separadas de forma evidente del resto de infecciones y de las plantas no infectadas, lo que sugiere un estatus metabólico característico y diferenciado del resto conferido por esta infección de forma previa al estrés por sequía. Bajo las condiciones D, el perfil metabólico de las muestras PPV-P25 (DC) aún se encontró separado de los correspondientes al resto de infecciones víricas. Dentro de las ramas del dendrograma correspondientes a regímenes hídricos con estrés por sequía (D, SD y R), las plantas no infectadas (DA, SDA y RA) pudieron distinguirse claramente por su perfil metabólico del resto de plantas con los distintos tipos de infecciones, lo que sugiere que la infección vírica confiere un importante cambio metabólico aparte del ocasionado por el propio estrés por sequía. Las muestras correspondientes al régimen hídrico R agruparon de forma separada de las del régimen SD, por lo que en las 6 h de riego adicional las plantas sometidas a estrés hídrico fueron capaces de responder a nivel metabólico a la nueva disponibilidad de agua.

Para analizar más detalladamente las diferencias de perfiles metabólicos entre muestras, y determinar la contribución de cada metabolito a las diferencias observadas, se realizaron análisis de

componentes principales (PCA, de *Principal component analysis*). Dos componentes principales fueron capaces de explicar el 80,7% de la varianza del conjunto de los datos metabólicos (62,53 y 18,23% para los componentes principales 1 [PC1] y 2 [PC2], respectivamente; **FIG. 37A**). De nuevo, el análisis por PCA reveló una clara separación de las distintas muestras de acuerdo al régimen hídrico al que habían sido sometidas, como la principal fuente de variación. Entre los metabolitos cuya contribución al PC1 fue mayor (valores de *loading* más elevados en términos absolutos) se encuentran el triptófano (Trp), galactinol, fructosa (Fru), prolina (Pro), rafinosa, 4-hidroxiprolina, isoleucina (Ile), fenilalanina (Phe) y glucosa (Glc) (TABLA S2, en soporte electrónico), cuyos niveles estaban incrementados en todas las muestras procedentes de plantas sometidas a estrés hídrico (D, SD y R) en comparación con las muestras W. Además, el PC2 definió una clara separación entre muestras en las que las plantas habían recibido riego en algún momento (W y R) y las correspondientes a plantas sin riego desde el inicio del experimento (D y SD). Los metabolitos que mostraron mayores niveles en muestras R frente a las SD pertenecen fundamentalmente a la clase correspondiente a aminoácidos, mientras que aquellos con niveles reducidos en R frente SD se corresponden sobre todo con azúcares.

A continuación, se identificaron metabolitos cuyos niveles se alteraron de forma significativa en las plantas infectadas en relación a las no infectadas, para cada régimen hídrico analizado (**TABLA S1**, en soporte electrónico). En las muestras W, los niveles de acumulación de 18, 29 y 17 metabolitos sufrieron modificaciones significativas tras la infección con PPV, PPV-P25 y PVX-PPV, respectivamente (**TABLA 5**). La mayor parte de las diferencias entre PPV-P25 y las otras infecciones ocurrieron en el número de metabolitos cuyos niveles se incrementaron. Siguiendo la progresión de la infección, en el régimen hídrico D un número mayor de metabolitos también incrementaron su acumulación en las plantas infectadas con PPV-P25 (DC), en comparación con las infectadas con PPV o PVX-PPV. Sin embargo, el número de metabolitos totales cuyos niveles se vieron alterados fue convergiendo entre las distintas infecciones en los regímenes hídricos D, SD y R. También se efectuó un análisis PCA sobre las muestras correspondientes al



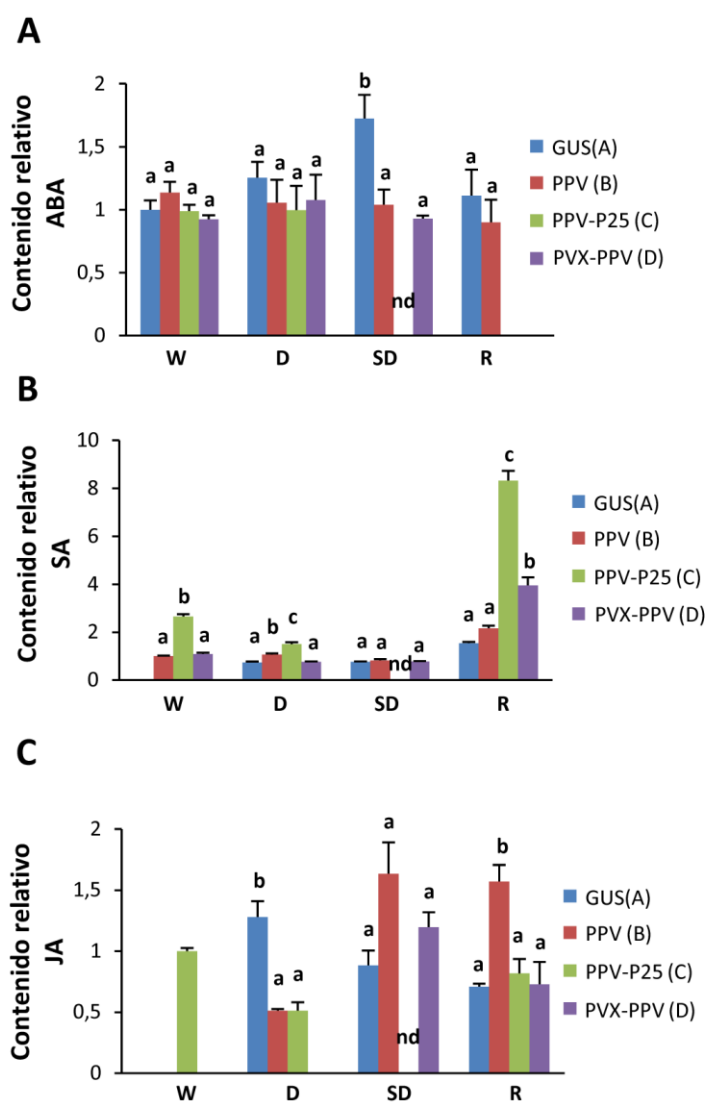
**FIGURA 37 (en la página anterior). Análisis de componentes principales (PCA)** realizado sobre el conjunto del total de datos metabólicos, consistente en el análisis de la acumulación de 44 metabolitos relevantes determinados por GC/TOF-MS. Las muestras analizadas se corresponden con plantas de *A. thaliana* infectadas o no infectadas, sometidas a distintos regímenes hídricos (en **A**) o correspondientes únicamente a plantas hidratadas (en **B**). El % de varianza explicada por cada componente principal (PC) aparece reflejado en cada gráfico. Los regímenes hídricos seguidos fueron: riego habitual o tratamiento hidratado (W), sequía (D), sequía intensa (SD) y rehidratación (R). Los tratamientos víricos seguidos fueron: plantas no infectadas (A), PPV (B), PPV-P25 (C) y PVX-PPV (D). El análisis de PCA se realizó mediante R.

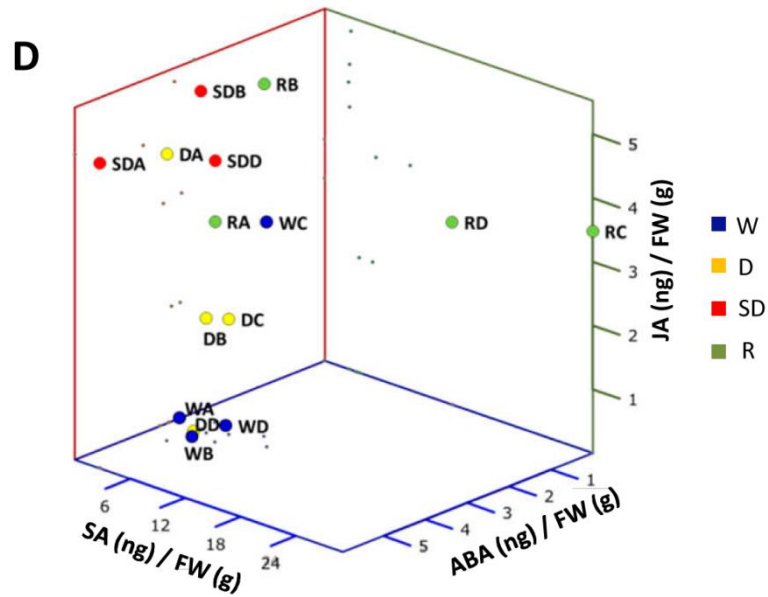
Hidratación	Infección	Incremento	Reducción	Total
Riego habitual (W)	PPV	12	6	18
	PPV-P25	23	6	29
	PVX-PPV	10	7	17
Sequía (D)	PPV	7	15	22
	PPV-P25	14	13	27
	PVX-PPV	2	25	27
Sequía intensa (SD)	PPV	10	15	25
	PVX-PPV	11	18	24
Rehidratación (R)	PPV	6	18	24
	PPV-P25	15	12	27
	PVX-PPV	13	12	27

**TABLA 5. Número de metabolitos cuyos niveles se alteraron significativamente** (aumentaron o disminuyeron) en las plantas infectadas en relación al control no infectado (controles agroinoculados con GUS), para cada uno de los regímenes hídricos examinados.

tratamiento hídrico W, para evaluar la contribución individual de cada metabolito (**FIG. 37B; TABLA S2**, en soporte electrónico). Los principales metabolitos que contribuyeron al PC1, dando cuenta del 58% de la varianza, fueron la serina (Ser) y la treonina (Thr), cuyos niveles se incrementaron en las tres infecciones en comparación con las plantas no infectadas. Otros metabolitos importantes en su contribución al PC1 fueron la lisina (Lys), fucosa y Glc, los cuales se acumularon a mayor nivel únicamente en infecciones con PPV-P25. Los principales

metabolitos que contribuyeron al PC2 (25% de la varianza) fueron el ácido treónico, Fru y rafinosa, cuyos niveles se elevaron en las tres infecciones. Es más, cambios significativos en los niveles de acumulación de rafinosa se detectaron en todas las muestras correspondientes a las plantas infectadas por virus en todos los regímenes hídricos examinados (**FIG. 36B**). También fueron notables los incrementos en la acumulación de Put en las muestras de los regímenes hídricos W y D correspondientes a plantas infectadas por PPV-P25 (WC y DC), pero no en las infecciones de PPV o PVX-PPV (**FIG. 36C**). Tanto la rafinosa como la Put funcionan como osmoprotectores durante el estrés por sequía (Seki *et al.*, 2007).

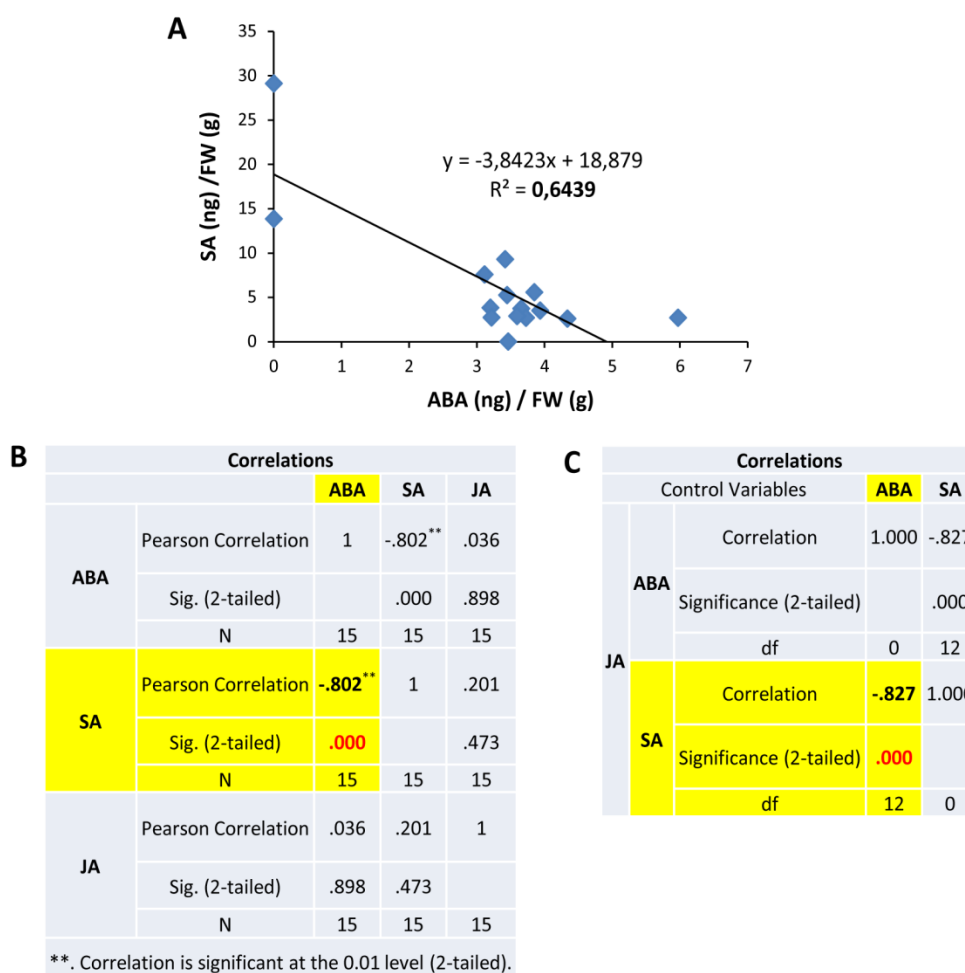




**FIGURA 38 (comienza en la página anterior).** Perfil hormonal de plantas de *A. thaliana* infectadas con virus o no infectadas, crecidas bajo diferentes regímenes hídricos. El conjunto de datos hormonales procede del análisis de 4 muestras (4 réplicas,  $n=4$ ) obtenidas por tratamiento hídrico y por infección, en las que se analizaron los niveles de ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA). **A.** Niveles relativos de ABA. **B.** Niveles relativos de SA. **C.** Niveles relativos de JA. Para A, B y C, a la cantidad de hormona por peso fresco de la muestra no infectada (WA para ABA; WB para SA; WC para JA) se tomó como referencia y se le asignó el valor de 1, calculando el resto de tratamientos en relación a este. Las gráficas muestran los valores relativos promedios  $\pm$  desviación estándar correspondientes a 4 réplicas. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico se compararon entre sí de forma independiente para cada régimen hídrico, mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,008 para comparaciones múltiples (para A; distintas letras indican diferencias significativas,  $P<0,008$ ; nd, muestras no determinadas), o el test de rangos múltiples de Scheffé (para B y C; distintas letras indican diferencias significativas,  $P<0,05$ ; nd, muestras no determinadas). **D.** Representación tridimensional de los perfiles hormonales para cada tratamiento. Los regímenes hídricos seguidos fueron: riego habitual o tratamiento hidratado (W), sequía (D), sequía intensa (SD) y rehidratación (R). Los tratamientos víricos seguidos fueron: plantas no infectadas (A), PPV (B), PPV-P25 (C) y PVX-PPV (D). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS). FW indica peso fresco (de *fresh weight*).

En paralelo con el análisis metabólico anterior, se evaluó por GC-MS la dinámica de acumulación de las hormonas ácido salicílico (SA), jasmónico (JA) y abscísico (ABA) a través de los distintos regímenes hídricos (TABLA S1, en soporte electrónico; FIG. 38). El ABA se

acumuló a niveles similares en plantas infectadas por virus y no infectadas en el régimen hídrico W. La privación de agua (tratamientos D y SD) ocasionó un incremento progresivo de los niveles de ABA en las plantas no infectadas, mientras que las plantas infectadas no mostraron incrementos significativos en el contenido de ABA bajo estrés por sequía. La hormona SA fue indetectable en las plantas hidratadas no infectadas (WA). Sin embargo, la infección con PPV-P25 indujo una mayor acumulación de SA que las infecciones PPV o PVX-PPV en todos los regímenes hídricos examinados. Los niveles de ABA en las muestras R correspondientes a plantas infectadas con PPV-P25 y PVX-PPV (RC y RD) se encontraron por debajo del límite de detección, lo cual podría explicarse por los elevados niveles de SA que se detectaron en estas



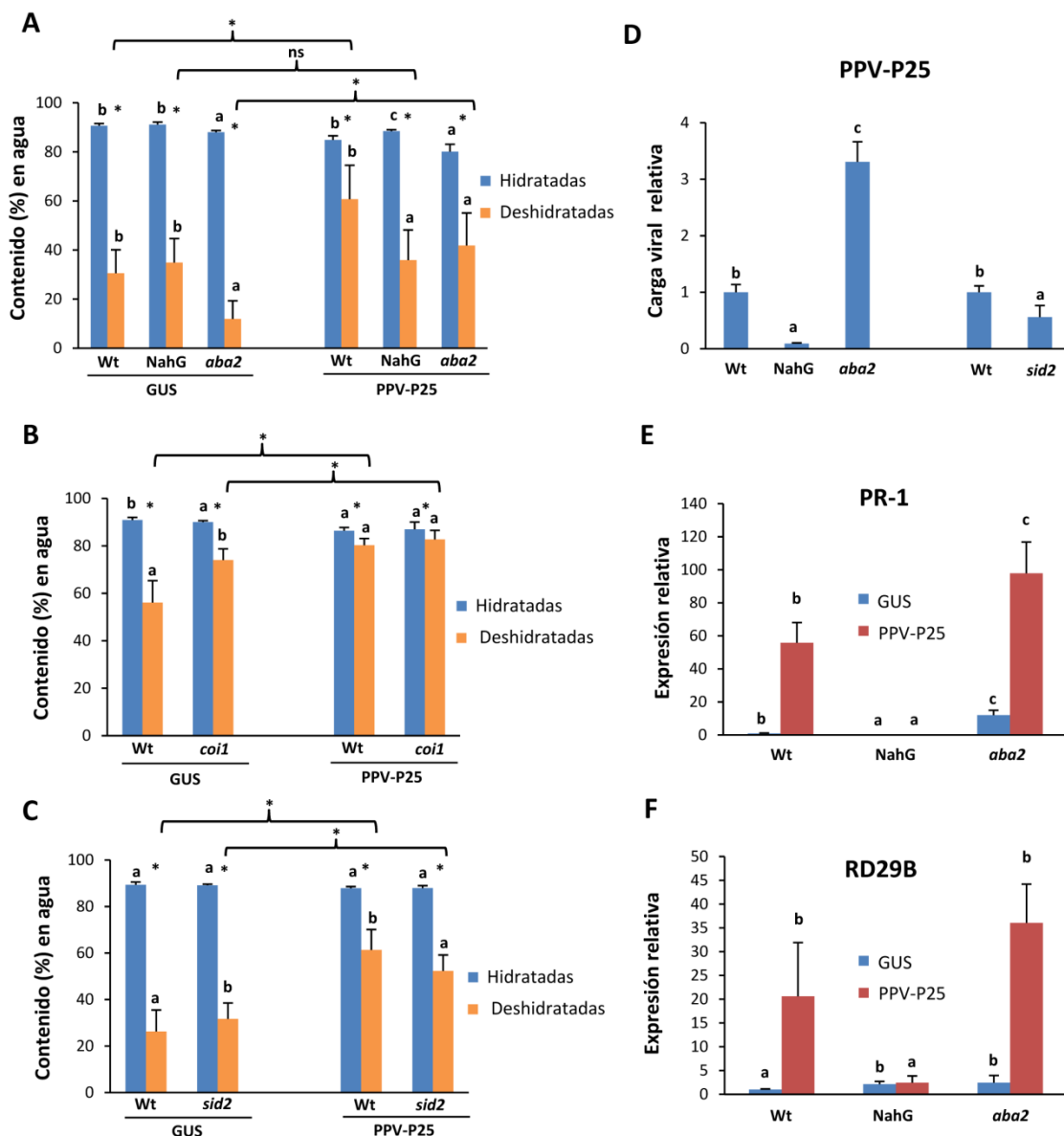
**FIGURA 39. Análisis de correlación entre niveles de hormonas.** El análisis para encontrar correlación lineal entre los niveles de pares de hormonas se efectuó sobre el conjunto del total de datos para todas las muestras analizadas. **A.** Correlación negativa entre

los niveles de ABA y de SA en muestras procedentes de plantas de *A. thaliana* no infectadas o infectadas con virus, crecidas bajo diferentes regímenes hídricos. **B.** Análisis de correlación realizado sobre el conjunto de datos hormonales, y obtención de los coeficientes de correlación de Pearson y niveles de significación para cada par de hormonas. **C.** Análisis de correlación parcial, en el que para el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson y los niveles de significación se ha eliminado el efecto de interferencia de la tercera hormona (JA). Para B y C, resultados obtenidos mediante análisis de datos con el programa estadístico SPSS v.20 (IBM Corp.) Con: N, tamaño muestral; df, grados de libertad; Sig., significación; FW, peso fresco (de *fresh weight*).

plantas. La interacción antagonica entre las rutas de estas dos fitohormonas, SA y ABA, ha sido descrita previamente en infecciones víricas (Sade *et al.*, 2014). De forma coherente con este comportamiento antagonico, cuando se realizaron análisis de correlación entre los niveles de acumulación de las distintas hormonas en todo el conjunto de muestras, se observó una correlación negativa entre los niveles de ABA y los de SA (coeficiente de correlación de Pearson -0,802;  $P < 0,01$ ), correlación que no se observó para ningún otro par de hormonas (**FIG. 39**). Todos estos datos apuntan hacia una regulación hormonal diferenciada en las plantas infectadas con PPV-P25, previa a la privación de agua. Este estatus hormonal diferenciado resulta claramente visible en la representación tridimensional de los niveles de las tres hormonas para cada muestra (**FIG. 38D**), donde la muestra W correspondiente a la infección por PPV-P25 (WC) se localizó próxima a las muestras de plantas sometidas a estrés por sequía, claramente separadas del resto de muestras W.

#### **6.1.7. La tolerancia a la sequía inducida por la infección viral se ve modificada en plantas alteradas en rutas hormonales**

Para dilucidar si la acumulación hormonal alterada presenta algún papel en la tolerancia al estrés hídrico inducida por las infecciones víricas, se emplearon líneas mutantes de *A. thaliana* deficientes en la biosíntesis de ABA (*ABA deficient2* [*aba2-1*]) y en la percepción de JA (*coronatine insensitive 1* [*coi1*]), junto con líneas transgénicas que expresan la enzima salicilato hidroxilasa, capaz de degradar SA evitando su acumulación



**FIGURA 40. Tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección con PPV-P25 en plantas de *A. thaliana* afectadas en la señalización hormonal. A.** Contenido (%) en agua en plantas wt, NahG y *aba2-1* no infectadas o infectadas con PPV-P25, a 14 dpr. **B.** Contenido (%) en agua en plantas wt y *coi1-1* no infectadas o infectadas con PPV-P25, a 14 dpr. **C.** Contenido (%) en agua en plantas wt y *sid2-2* no infectadas o infectadas con PPV-P25, a los 14 dpr. Los gráficos representan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de, al menos, 14 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento hídrico (plantas hidratadas o plantas sometidas a estrés por sequía) se analizaron independientemente mediante el test de rangos múltiples de Scheffé (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas y deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, o entre tratamientos de interés, se efectuaron con el test t de Student (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ; ns, diferencias no significativas). **D.** Niveles de acumulación de PPV-P25; **E.** Niveles de expresión de PR-1; **F.** Niveles de

expresión de RD29B. En D, E y F, los niveles de acumulación/expresión se analizaron por qRT-PCR (PCR cuantitativa) en plantas de *A. thaliana* wt o afectadas en la señalización hormonal, a los 16 dpa. En cada uno de los experimentos mostrados, a la acumulación de virus o a la expresión del gen problema en la muestra wt se le asignó el valor de 1, y el resto de muestras se calcularon en relación a esta. Como gen endógeno (control interno) para la normalización se amplificó *TUB5*. Los gráficos representan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de muestras obtenidas a partir de 13-20 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre las medias correspondientes a cada tratamiento vírico (plantas infectadas con PPV-P25 o no infectadas) se analizaron independientemente mediante el test U de Mann-Whitney, con  $\alpha$  corregido por Bonferroni a 0,017 para comparaciones múltiples (distintas letras indican diferencias significativas,  $P < 0,017$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas infectadas o no infectadas de un mismo fondo genético, o entre otros pares de medias de interés, se efectuaron con el test U de Mann Withney (los asteriscos indican diferencias significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinoculados con GUS).

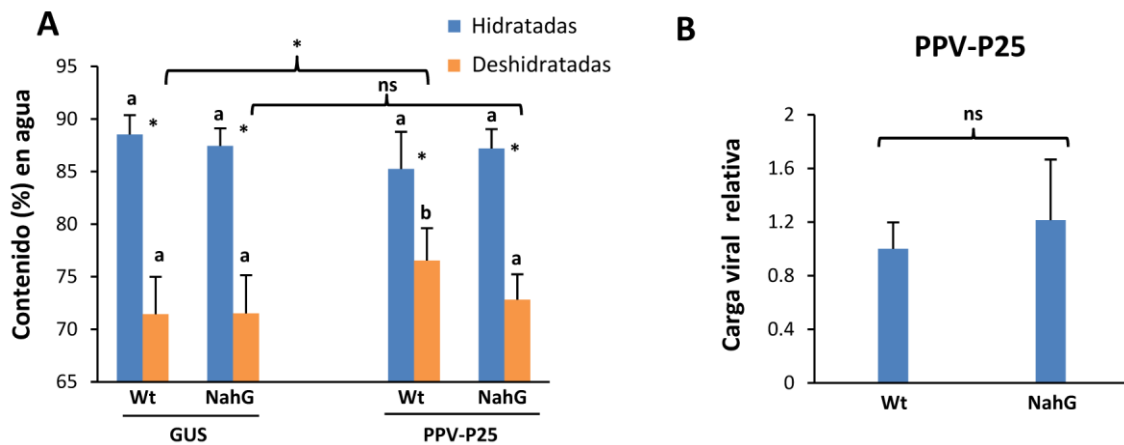
(NahG), y plantas Col-0 como controles silvestres (wt, de *wild type*). En todas ellas se determinó la tolerancia a la sequía inducida por la infección con PPV-P25. Las plantas infectadas con PPV-P25 o los controles no infectados se sometieron al riego habitual o a privación de agua, para iniciar el estrés por sequía. A los 30 dpa (14 dpr), se comparó el contenido en agua de las plantas infectadas con el de las no infectadas (**FIG. 40**). Bajo condiciones de estrés por sequía, el contenido en agua de las plantas NahG no infectadas fue similar al de las plantas wt (**FIG. 40A**). Como cabría esperar, el contenido en agua promedio de las plantas no infectadas fue menor en *aba 2-1* comparado con wt (**FIG. 40A**), mientras que fue mayor en *coi1-1* comparado con wt (**FIG. 40B**) (Harb *et al.*, 2010). Destacable fue el hecho de que la infección viral no indujo tolerancia a la deshidratación en las líneas NahG, deficientes en la acumulación de SA. El contenido en agua de las plantas NahG infectadas alcanzó niveles similares a los observados en las NahG controles no infectadas, mientras que el contenido en agua en las plantas *aba2-1* y *coi1-1* infectadas fue mayor que el de sus respectivos controles no infectados. Es más, el mutante *aba2-1* infectado con PPV-P25 mostró un contenidos en agua 3,5 veces superior al de su control no infectado, mientras que en la wt esta proporción fue de solo 2 veces; pese a ello, la respuesta en *aba2-1* fue menos intensa que en wt en términos de contenido (%) en agua. En una serie de experimentos independientes, se analizó el

contenido en agua del mutante afectado en la biosíntesis de SA *salicylic acid induction deficient2* (*sid2-2*), infectado con PPV-P25. Como se puede observar en la **FIG. 40C**, bajo condiciones de estrés hídrico, el contenido en agua en las plantas infectadas fue menor para el mutante *sid2-2* que para las wt. La acumulación de PPV-P25 fue significativamente más baja en las plantas NahG y *sid2-2* que en las wt (11,1 y 1,8 veces menor que en wt, respectivamente), mientras que el virus se acumuló hasta 3,3 veces más en *aba2-1* que en wt (**FIG. 40D**). Wang y colaboradores han descrito previamente reducciones en la carga viral en plantas de *A. thaliana* deficientes en SA, en relación a los controles silvestres y en etapas tardías de la infección, lo que es coherente con las observaciones del presente trabajo (Wang *et al.*, 2011).

En experimentos realizados con plantas NahG de *N. benthamiana*, infectadas con PPV-P25 y sometidas a estrés por sequía, se observó una reducción significativa del contenido en agua en comparación con los controles wt infectados con este virus (**FIG. 41**). Del mismo modo que en *A. thaliana*, el contenido en agua de las plantas de *N. benthamiana* NahG infectadas con el virus se redujo a los niveles observados en los controles NahG no infectados. En este caso no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de PPV-P25 entre las plantas deficientes en SA y los controles wt, confirmando investigaciones previas que muestran como en *N. benthamiana* la defensa mediada por SA frente a PPV, si es que existe, es de poca importancia (Ying *et al.*, 2010).

Finalmente, para confirmar la relación entre la señalización por SA y la tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección, se analizó la expresión de genes de respuesta a esta fitohormona y de respuesta al estrés por sequía, en plantas de *A. thaliana* wt o alteradas en señalización hormonal, infectadas o no con PPV-P25, justo antes de iniciar el estrés por sequía (15 dpa); estos genes fueron: *PR-1* (de *Pathogenesis-related 1*; At2g14610) y *RD29B* (de *Responsive to desiccation 29B*; At5g52300). Los análisis por qRT-PCR mostraron que la expresión del gen de respuesta a SA *PR-1* era mayor en el mutante *aba2-1*, tanto en plantas no infectadas como bajo infección con PPV-P25, en comparación con los controles wt, lo que sugiere que la señalización por SA potenciada en este mutante

*aba2-1* podría ser responsable del incremento en la tolerancia a la sequía observados en esta línea mutante bajo la infección viral (FIG. 40E). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de RD29B entre las plantas *aba2-1* y wt en infecciones con PPV-P25 (FIG. 40F). En conjunto todos estos resultados sugieren que el incremento de tolerancia a la sequía inducido por la infección viral se correlacionó positivamente con la activación de la señalización por SA, la cual está modulada negativamente por la señalización por ABA. La contribución de la ruta del JA a la tolerancia al estrés hídrico inducida por la infección, si es que tuvo lugar, fue negligible.



**FIGURA 41. Sensibilidad al estrés por sequía en plantas infectadas de *N. benthamiana* deficientes en la acumulación de SA (NahG).** **A.** Contenido (%) en agua en plantas wt o NahG no infectadas o infectadas con PPV-P25, hidratadas o a 15 dpr (25 dpa). Los gráficos muestran valores promedio  $\pm$  desviación estándar de un mínimo de 12 plantas que recibieron el mismo tratamiento. Las diferencias entre medias del mismo tratamiento hídrico (plantas hidratadas o sometidas a sequía) se analizaron independientemente mediante el test U de Mann-Whitney (distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). Las comparaciones entre pares de medias, realizadas entre plantas hidratadas o deshidratadas de un mismo tratamiento vírico, o entre otros pares de medias de interés, se efectuaron con el test U de Mann-Whitney (el asterisco indica diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ; ns, diferencias no significativas). **B.** Análisis comparativo de la carga viral (PPV-P25) entre wt y NahG a los 15 dpa. Al valor de acumulación en las wt se le asignó el valor de 1, y se tomaron como referencia para el cálculo el resto. Como gen endógeno (control interno) para la normalización se amplificó el rRNA 18S. El par de medias se analizó con el test U de Mann-Whitney (ausencia de diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0,05$ ). GUS hace referencia a los controles no infectados con virus (pero agroinfiltrados con GUS).

## 6.2. DISCUSIÓN

En línea con lo descrito en trabajos previos, en los que se utilizaron distintas combinaciones planta-virus (Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013), en el presente trabajo se determinó como la infección de *A. thaliana* y de *N. benthamiana* con una serie de virus de RNA o formas recombinantes de los mismos, en infecciones sencillas o mixtas, fueron capaces de inducir incrementos de la tolerancia al estrés por déficit hídrico, aunque en un grado variable. En este trabajo de tesis se analizaron diversos parámetros, entre los que se encuentran el efecto de la infección sobre el crecimiento vegetativo (producción de biomasa), las respuestas de estrés (análisis de emisión de fluorescencia), la eficacia biológica (*fitness*) y la relación entre el contenido (%) en agua en plantas sometidas a estrés hídrico frente al de plantas hidratadas. Las infecciones de ambos hospedadores, *N. benthamiana* y *A. thaliana*, con PPV-P25, y la infección de *N. benthamiana* con la combinación PVX-PPV, confirmaron unos fenotipos de tolerancia a la sequía superiores a los que indujeron las infecciones sencillas con PPV o PVX. El resultado de estos análisis sugiere una asociación positiva entre la virulencia y la tolerancia a la deshidratación en el conjunto de infecciones estudiadas.

En trabajos previos, el análisis del perfil transcriptómico de plantas de *N. benthamiana* coinfectadas con PVX y PVY (de *Potato virus Y*, otro potyvirus), reveló una alteración transcripcional de los genes relacionados con la función del cloroplasto (reprimida), síntesis y degradación de proteínas (inducidas), metabolismo de carbohidratos (inducido), y respuesta al estrés y estímulos bióticos (inducida) (García-Marcos *et al.*, 2009). El sinergismo asociado a la infección mixta PVX-PVY dio lugar a un incremento en el número de genes expresados diferencialmente y en la magnitud del cambio, en comparación con las infecciones sencillas. De acuerdo con esto, la infección PVX-potyvirus indujo un intenso estrés oxidativo en las hojas de *N. benthamiana*, a juzgar por la elevada acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que se observó, lo que correlacionó con una mayor virulencia respecto a las infecciones sencillas (García-Marcos *et al.*, 2009). Sin embargo, en la coinfección de *A. thaliana* con PPV y PVX no se observó este incremento de virulencia, en relación a la observada con la infección

sencilla por PPV (en el presente estudio), seguramente debido a la baja acumulación de PVX en este hospedador, en el que establece infecciones “subliminales” (Andika *et al.*, 2015). Ya se mostró anteriormente, en el capítulo 4, como la proteína P25 de PVX es el principal determinante viral implicado en la aparición de la necrosis asociada al sinergismo PVX-potyvirus en *N. benthamiana*. Como determinante de virulencia, en el presente estudio, la expresión de P25 a partir de un vector PPV también dio lugar a un incremento de la virulencia de PPV en *A. thaliana*. Además, también se determinó que las plantas de *A. thaliana* infectadas con PPV-P25 presentaban un estatus metabólico y hormonal alterado, más acentuado que las alteraciones observadas en las infecciones con PPV. Estudios recientes muestran una conexión entre las compensaciones beneficiosas asociadas a una interacción planta-virus compatible y la presencia de proteínas virales que actúan como determinantes de virulencia. Por ejemplo, en trabajos previos se ha descrito la implicación de la proteína 2b de CMV en la tolerancia al estrés por sequía en *A. thaliana* (Westwood *et al.*, 2013) y en la atracción de insectos polinizadores en tomate (Groen *et al.*, 2016). De modo equivalente, la proteína P25 de PVX podría estar induciendo en las plantas infectadas un cierto grado de aclimatación metabólica al estrés abiótico, resultado de sus propiedades como factor de virulencia. Esta virulencia debida a P25 podría activar las respuestas de aclimatación antes y después de que la planta sea expuesta al estrés por sequía. En este sentido, se ha descrito que plantas transgénicas de *N. benthamiana* que expresan la proteína P25 muestran una resistencia incrementada a un estrés biótico como es la infección por *Pseudomonas syringae* pv tomate DC 3000 (Jada *et al.*, 2013). En conjunto, los resultados aquí reunidos muestran como las infecciones más virulentas, esto es las correspondientes a PPV-P25 o a la combinación PVX-PPV, tienen un mayor impacto en las respuestas de tolerancia al estrés por sequía en los hospedadores analizados.

Numerosos estudios han sugerido previamente una conexión entre el establecimiento de respuestas defensivas o ligadas a enfermedad y la tolerancia al estrés por sequía. Por ejemplo, la expresión constitutiva del gen *ADR1*, gen R de *A. thaliana*, no solo potencia la resistencia a

patógenos biotrofos, sino que también incrementa la tolerancia a la deshidratación (Chini *et al.*, 2004). De modo equivalente, las plantas de *N. benthamiana* transgénicas que expresan la proteína efectora CRN161 de *Phytophthora sojae* muestran una resistencia incrementada a dos oomicetos patógenos y una mejor tolerancia al estrés por sequía y por salinidad (Rajput *et al.*, 2015). El motivo de esta tolerancia incrementada a los estreses abióticos en estas plantas podría residir en la red de rutas de señalización interconectadas responsable de las respuestas a diversos estreses ambientales, existiendo probablemente una intercomunicación entre las rutas de señalización para estreses bióticos y abióticos (Fujita *et al.*, 2006). Los resultados del presente trabajo sugieren que la amplia reprogramación del metabolismo de la planta inducida por la infección viral podría conferir algún tipo de ventaja competitiva, es decir, una aclimatación metabólica, al hospedador infectado frente al estrés ambiental. Este cambio metabólico podría resultar beneficioso para la eficacia biológica global de la planta, siempre que los individuos infectados puedan producir descendencia a tasas más elevadas que los no infectados bajo condiciones de crecimiento con estrés.

Los trabajos previos realizados sobre tolerancia al estrés por sequía inducida por los virus no analizaron la eficacia biológica o reproductiva (*fitness*) de las plantas hospedadoras (Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013). En el presente trabajo, se ha sometido a estudio la hipótesis consistente en que las infecciones víricas podrían incrementar la eficacia biológica de *A. thaliana* y *N. benthamiana* bajo condiciones variables de estrés por sequía. En *A. thaliana*, la infección viral redujo ostensiblemente la producción de semillas en plantas sometidas a riego habitual. Asimismo, un incremento gradual en la exposición a la sequía redujo drásticamente la producción de semillas, aunque este efecto fue de menor grado en las plantas infectadas que en las no infectadas. De esta manera, las plantas de *A. thaliana* infectadas con PPV o con la combinación PVX-PPV produjeron una cantidad de semillas equivalente a la de las plantas no infectadas cuando crecieron bajo condiciones de estrés por sequía moderada o extendida. Más importante fue el hecho de que el número de plantas productoras de semillas fuera dos veces superior en el caso de plantas infectadas que en plantas no infectadas,

cuando crecieron bajo condiciones de estrés por sequía extendida. Esto plantea la posibilidad sugerida en estudios previos (Roossinck, 2011; Westwood *et al.*, 2013) de que bajo condiciones naturales, especialmente en áreas donde los episodios de sequía son comunes, las infecciones sencillas o mixtas de virus podrían proporcionar un importante beneficio al hospedador en términos de eficacia reproductiva. Sin embargo, los efectos negativos derivados de la infección con PPV-P25 en la eficacia biológica del hospedador superaron los efectos beneficiosos asociados a la aclimatación metabólica al estrés por sequía inducida por el virus. De modo equivalente, la tolerancia al estrés por sequía inducida por los virus en *N. benthamiana* no compensó la reducción en la producción de semillas en plantas infectadas y crecidas bajo las condiciones de sequía usadas en el estudio. Por tanto, los efectos beneficiosos para el hospedador derivados de las infecciones víricas en situaciones de estrés por sequía, y posiblemente bajo otros tipos de estreses abióticos, podrían estar condicionados por los niveles de virulencia.

Un estudio reciente ha mostrado como la infección de *N. tabacum* y *A. thaliana* con TMV y con TVCV (de *Turnip vein-clearing tobamovirus*), respectivamente, tuvo efectos sobre el desarrollo estomático, conduciendo a una reducción en la densidad e índice estomáticos (Murray *et al.*, 2016). Estudios previos han puesto de manifiesto que son precisamente la densidad estomática y el tamaño del estoma los principales condicionantes de la conductancia estomática (Franks *et al.*, 2009). En consecuencia, en *N. tabacum* la infección con TMV ocasionó una reducción significativa de la tasa de transpiración. En el presente trabajo, la infección con otros virus de RNA ocasionó un incremento de la densidad estomática, pero no del índice estomático, en hojas de *A. thaliana* y *N. benthamiana*. Sin embargo, mientras que la tasa de transpiración se incrementó en las plantas de *A. thaliana* infectadas, lo cual podría atribuirse precisamente a esa mayor densidad estomática, en *N. benthamiana* las infecciones víricas ocasionaron una reducción de la tasa de transpiración. Esta reducción de la tasa de transpiración en las plantas de *N. benthamiana* infectadas fue evidente incluso en condiciones de riego habitual, y fue proporcional al grado de tolerancia a la sequía exhibido por las plantas bajo los distintos tipos de infección. Estos

resultados sugieren que los virus de plantas pueden regular la tolerancia del hospedador a la sequía a través de diferentes mecanismos, que no son mutuamente excluyentes, y que además son dependientes de hospedador. El cierre de estomas, a través del cual se reduce la pérdida de agua por transpiración, constituye un importante mecanismo para la supervivencia de la planta en condiciones de estrés por sequía (Acharya y Assmann, 2009). Por tanto, el efecto positivo que presentan las infecciones en la tolerancia a la sequía en *N. benthamiana* probablemente sea debido a la reducción de la apertura estomática. Otros mecanismos, como el ajuste osmótico (ver más abajo) responsable de la aclimatación metabólica al estrés, podrían también jugar algún papel en la tolerancia al estrés por sequía inducida por las infecciones en este hospedador.

La tolerancia a la sequía inducida por los virus en *A. thaliana*, sin embargo, no derivó de una reducción en la tasa de transpiración, como pusieron de manifiesto los estudios de pérdida de agua realizados en rosetas infectadas, y el análisis de la temperatura de las hojas. No obstante, las infecciones víricas no impidieron el cierre de estomas cuando las plantas se sometieron a estrés por sequía, aunque la respuesta en las plantas infectadas fue menos intensa que en las no infectadas. Estos resultados están de acuerdo con lo observado por Weswood y colaboradores (2013), donde las plantas de *A. thaliana* infectadas con el cucumovirus CMV mostraron mayores tasas de transpiración, pese a presentar una tolerancia incrementada al estrés por sequía. Del mismo modo, en el presente trabajo tampoco se observaron cambios en la arquitectura radicular, destinados a maximizar la captación de agua del sustrato, que pudieran explicar esta tolerancia incrementada al estrés hídrico en las plantas de *A. thaliana* infectadas. Por tanto, otros mecanismos deben de estar implicados en los efectos de los virus sobre la tolerancia a la sequía en *A. thaliana*.

Cuando el agua perdida no se compensa con la captada, las plantas afrontan el déficit hídrico acumulando solutos (osmoprotectores) tolerando de este modo la reducción del contenido en agua. Los osmoprotectores protegen a la planta del estrés a través de un ajuste osmótico que permite mantener la turgencia, y están implicados en procesos de desactivación de especies dañinas como ROS y en la

estabilización de la estructura de membranas y de proteínas (Verslues *et al.*, 2006). En el presente estudio, se realizó un análisis del perfil metabólico y hormonal de plantas de *A. thaliana* no infectadas o infectadas con los diferentes virus, bajo distintos regímenes hídricos, análisis que mostró una gama de cambios metabólicos y hormonales que correlacionaron positivamente con un mayor impacto de la infección en la tolerancia de la planta al estrés por sequía. Cuando estos datos se sometieron a agrupamiento jerárquico y a análisis de PCAs, se determinó que el tipo de régimen hídrico al que fueron sometidas las plantas fue el factor más influyente en la configuración del perfil metabólico. Estudios previos en los que se había analizado combinaciones de estreses también encontraron que las respuestas al estrés por sequía de la planta eran dominantes sobre las de infección por virus (Prasch y Sonnewald, 2013). Entre los metabolitos acumulados en condiciones de déficit hídrico se encontraron el Trp, galactinol, Fru, Pro, rafinosa, Ile y Phe, los cuales también han sido descritos previamente como metabolitos inducidos bajo estrés por sequía (Seki *et al.*, 2007; Vasquez-Robinet *et al.*, 2008; Bowne *et al.*, 2012; Prasch y Sonnewald, 2013). Cuando se realizaron comparaciones de la respuesta metabólica entre las plantas infectadas y los controles sanos, dentro de cada régimen hídrico, se observó que las infecciones víricas alteraron más del 40% de los metabolitos primarios analizados. Las diferencias entre los distintos tratamientos víricos fue particularmente evidente antes de exponer las plantas al estrés adicional por sequía, observándose como la infección con PPV-P25 duplicaba el número de metabolitos inducidos en relación al resto de infecciones. Entre los principales metabolitos que contribuyeron a las diferencias entre plantas infectadas y no infectadas bajo condiciones de riego habitual se encontraron a aminoácidos como la Ser, Thr, Lys y Glu; y derivados de azúcares como el ácido treónico, fucosa, Fru y rafinosa, cuyos niveles se incrementaron por las infecciones víricas. La acumulación de elevadas concentraciones de aminoácidos individuales, y de aminoácidos totales, tras la infección, ha sido descrita previamente para diferentes interacciones planta-virus (Llave, 2016). Pese a ello, más allá de la Pro, todavía no está clara la contribución del resto de aminoácidos a la tolerancia a estreses en plantas infectadas. Para los fructanos y la rafinosa se han propuesto funciones osmoprotectoras en

numerosas especies, contribuyendo a la estabilización de membranas y proteínas y protegiéndolas del daño oxidativo ocasionado en diferentes situaciones de estrés, incluida la sequía (Taji *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2008; Van den Ende, 2013). Además, para la Put también se determinaron incrementos en su acumulación en plantas infectadas con PPV-P25, lo que podría haber contribuido a la mejor tolerancia de estas plantas bajo estrés por sequía. La Put actúa como mediador del ajuste osmótico, estabiliza estructuras subcelulares y participa en la desactivación de ROS (Seki *et al.*, 2007). El incremento en la biosíntesis de Put inducido por TRV en *A. thaliana* se ha relacionado con una mayor tolerancia a la congelación, otro estrés abiótico que implica alteraciones del estatus hídrico de la planta (Fernández-Calvino *et al.*, 2014). La acumulación de osmoprotectores como la Pro y la Put se ha descrito en otras interacciones planta-virus en las que también se observó una mayor tolerancia al estrés hídrico inducida por la infección (Xu *et al.*, 2008). Por tanto, puede que en las plantas de *A. thaliana* infectadas la acumulación de osmoprotectores confiera un estado de aclimatación metabólica que permita a la planta afrontar con éxito el estrés derivado de la falta de agua, pese a presentar unas mayores tasas de transpiración. A cambio, el ajuste osmótico, para el que se requiere la acumulación de solutos compatibles, puede suponer un importante gasto energético para la planta (Bohnert y Shen, 1999), lo que podría tener efectos negativos en la eficacia biológica, tal y como se observó para las infecciones con PPV-P25 en este hospedador.

Numerosos estreses bióticos y abióticos ocasionan incrementos en la acumulación de SA (Janda *et al.*, 2007). Aparte de la implicación del ABA en la señalización por estrés hídrico (Fujita *et al.*, 2011), numerosos estudios también sugieren la participación del SA en la tolerancia al estrés por sequía, de forma independiente de ABA. Así, la expresión constitutiva del gen *ADR1* (un factor de resistencia) en *A. thaliana* induce una mayor acumulación de SA y tolerancia a la deshidratación, mientras que la expresión del gen *NabG* en estas mismas plantas (dobles mutantes *NabG/ADR1*) conduce a una reducción significativa del fenotipo de tolerancia (Chini *et al.*, 2004). De forma equivalente, los mutantes de *A. thaliana* *acd6* y *cpr5*, los cuales acumulan altos niveles de SA, mostraron

una mayor tolerancia a la deshidratación que los controles wt (Miura *et al.*, 2013; Okuma *et al.*, 2014). Es más, cuando las plantas se tratan con concentraciones apropiadas de SA se observan igualmente incrementos en la tolerancia al estrés salino o por sequía (Senaratna *et al.*, 2000). En el presente estudio, las plantas de *A. thaliana* infectadas con PPV-P25 acumularon mayores niveles de SA que las infectadas con PPV o con la combinación PVX-PPV, lo que sugiere la existencia de una correlación entre la acumulación de SA y la tolerancia al estrés por sequía en estas plantas infectadas. Del mismo modo, durante el sinergismo PVX-potyvirus en *N. benthamiana* también se observan incrementos en la acumulación de SA (Pacheco *et al.*, 2012). Xu y colaboradores mostraron como el SA se acumula también a altas concentraciones en arroz (*Oryza sativa*) y en remolacha (*Beta vulgaris*), en infecciones con BMV (de *Brome mosaic bromovirus*) y CMV, respectivamente, aunque no pudieron establecer una relación clara entre esta acumulación y una mayor tolerancia al estrés hídrico (Xu *et al.*, 2008). En el presente trabajo, los resultados obtenidos en el análisis de líneas transgénicas deficientes en la acumulación de SA o de mutantes afectados en su biosíntesis apoyan la implicación de esta hormona en la tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección. Consistente con esto fue la pérdida de la tolerancia a la sequía inducida por la infección con PPV-P25 en plantas de *A. thaliana* y *N. benthamiana* transgénicas NahG, en las que no se acumula SA. Es más, en mutantes *sid2-2* afectados en la biosíntesis de SA, también se observó una disminución significativa de la tolerancia a la sequía inducida por PPV-P25. Por otra parte, las plantas infectadas con PPV-P25 correspondientes a los mutantes *coi1-1* (afectados en la percepción del JA) no mostraron comportamientos significativamente diferentes a los de las wt. Por tanto, es improbable que el JA desempeñe una función relevante en la tolerancia al estrés por sequía inducida por la infección.

Westwood y colaboradores mostraron como la infección de *A. thaliana* con CMV, capaz de incrementar la tolerancia al estrés por sequía en este hospedador, sin embargo no afectó a los niveles de acumulación de ABA, pese a que la infección sí que ocasionó interferencias en la expresión de genes de respuesta a ABA (Westwood *et al.*, 2013). Estudios previos han puesto de manifiesto como la activación de la señalización

por SA, una respuesta defensiva inducida por la infección con CMV, puede suprimir la expresión de genes de respuesta a ABA (Yasuda *et al.*, 2008; Lewsey *et al.*, 2010). De modo semejante, en el presente trabajo los niveles de ABA no se incrementaron en plantas infectadas con PPV-P25, y un gen de respuesta a sequía como es *RD29B* se indujo bajo infección, de una forma independiente de ABA. En el presente estudio también se ha puesto de manifiesto como el fenotipo de hipersusceptibilidad a la sequía que muestra el mutante *aba2-1* pudo suprimirse en parte bajo la infección con PPV-P25. Estos resultados demuestran la existencia de mecanismos de tolerancia a la sequía independientes de ABA, que pueden activarse bajo las infecciones víricas. El gen PR-1, marcador de la activación de la señalización por SA, se indujo a mayores niveles en los mutantes *aba2-1* que en las plantas wt, antes y después de la infección con PPV-P25. Varios trabajos previos han mostrado como determinados puntos de la ruta de señalización por SA se pueden potenciar en ausencia de ABA (Yasuda *et al.*, 2008; Muñoz-Espinoza *et al.*, 2015). Como era de esperar, el contenido en agua de los mutantes *aba2-1* no infectados cayó abruptamente durante el estrés por sequía, en comparación con las plantas wt. En plantas infectadas, el incremento del contenido en agua en el mutante *aba2-1* relativo al mutante no infectado fue ca. 75% mayor que en las plantas wt, lo que estuvo asociado a una acumulación doble de PR-1. Pese a ello, la tolerancia global a la sequía de *aba2-1* se redujo en comparación con las plantas wt, debido a que este mutante tiene impedida la activación de las respuestas de tolerancia a la sequía dependientes de ABA.

¿Cómo podría la acumulación de SA inducida por los virus conferir fenotipos de tolerancia a la sequía en sus hospedadores? En estudios previos, se ha puesto de manifiesto que la acumulación de SA juega un papel importante en el cierre estomático a través de la producción de ROS (Khokon *et al.*, 2011; Miura *et al.*, 2013). Una posibilidad es que el cierre estomático inducido por la acumulación de ROS durante la infección ocasione una disminución de la transpiración, evitando de esta manera uno de las principales formas de pérdida de agua en las hojas durante el estrés por sequía. Este escenario es compatible con el intenso estrés oxidativo observado en *N. benthamiana* durante la

interacción sinérgica PVX-potyvirus (García-Marcos *et al.*, 2009). Además, el SA está implicado en la regulación de varios procesos metabólicos y modula la producción de numerosos osmolitos (Pro, azúcares solubles, aminos, etc.) y metabolitos secundarios, manteniendo el estatus nutricional y protegiendo de este modo a la planta del estrés abiótico (Khan *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha documentado la participación del SA en el incremento del metabolismo de la Pro durante estreses abióticos (Misra y Saxena, 2009). Es más, la aplicación exógena de SA es capaz de incrementar el contenido de Put en maíz (Németh *et al.*, 2002). El SA también modula de forma significativa la captación y el metabolismo de nutrientes minerales y por tanto promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas durante el estrés abiótico (Gunes *et al.*, 2007). De modo equivalente, las plantas de *A. thaliana* del presente estudio acumularon un elevado número de metabolitos con conocidas propiedades osmoprotectoras implicadas en la tolerancia a estreses.

En conclusión, en el presente trabajo queda establecido como las infecciones virales afectan positivamente a la tolerancia de las plantas al estrés por sequía, induciendo en ellas incrementos de la hormona SA, la cual puede ser responsable de estas respuestas de tolerancia, de forma independiente del ABA. En las plantas en las que la acumulación de SA se anuló (plantas NahG), se produjo una pérdida de la tolerancia a la sequía inducida por los virus, observándose en ellas una susceptibilidad a la sequía equivalente a la de las plantas wt.



## 7. DISCUSIÓN GENERAL

---





### 7.1. Comportamiento de PVX en el sinergismo

Las infecciones múltiples de virus en hospedadores vegetales compatibles son un fenómeno habitual en la naturaleza, y en el caso de las interacciones sinérgicas suelen ir acompañadas de un agravamiento de los síntomas, siendo la necrosis sistémica (SN, de *Systemic necrosis*) la manifestación más extrema de este tipo de interacción, ocasionando generalmente la muerte de la planta en pocos días (Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2004; García-Marcos *et al.*, 2009). A diferencia del análisis detallado que se ha realizado de la necrosis en la respuesta hipersensible (HR, de *Hypersensitive response*) inducida en interacciones planta-virus incompatibles, la necrosis producida durante interacciones planta-virus compatibles se ha caracterizado pobremente en la mayoría de los casos. Una excepción a esto último es la SN que acompaña al sinergismo modelo PVX-potyvirus, en hospedadores modelo como son *N. benthamiana* y *N. tabacum*. La regulación hormonal, las características asociadas a esta necrosis en cuanto a marcadores celulares y alteraciones metabólicas se refiere, así como la participación de algunos factores víricos en su inducción se han analizado en trabajos previos (Pruss *et al.*, 1997; García-Marcos *et al.*, 2009, 2013; Pacheco *et al.*, 2012). Aun así, el factor o factores víricos últimos responsables de esta SN y la naturaleza de la misma han permanecido, en esencia, desconocidos.

En la interacción sinérgica PVX-potyvirus en *N. tabacum*, PVX incrementa de forma notable su nivel de acumulación, y a esta interacción le sigue la aparición de SN, lo que constituye un comportamiento sinérgico clásico, tanto en acumulación del patógeno como en efectos patológicos (González-Jara *et al.*, 2004). Este par vírico, por el contrario, no da lugar a incrementos importantes de la acumulación de PVX en el hospedador *N. benthamiana*, pese a ir acompañado también de la aparición de SN (González-Jara *et al.*, 2004; García-Marcos *et al.*, 2009), lo que permite cuestionar el incremento de la acumulación de PVX como la razón fundamental sobre la que se asienta la mayor virulencia observada en esta interacción vírica. El empleo de quimeras de PVX que expresan el factor HC (de HCPro, *Helper component proteinase*) de potyvirus (quimeras PVX-HC), capaces de inducir SN, demuestran que es este factor el único componente potyviral necesario

para reproducir el sinergismo en patología observado en la infección mixta (Vance *et al.*, 1995; Pruss *et al.*, 1997; González-Jara *et al.*, 2005). El factor HC es un supresor del silenciamiento génico por RNA (VSR, de *Viral suppressor of RNA silencing*); su sustitución en estas quimeras por otro VSR no potyviral, como el VSR P19 de tombusvirus (quimeras PVX-P19), también permite recrear la respuesta de SN (Scholthof *et al.*, 1995). Estas observaciones sugieren que en PVX deben existir uno o más factores de virulencia que, en presencia de un VSR potente, de naturaleza potyviral (como sucede en la interacción PVX-potyvirus) o de cualquier otra naturaleza, son capaces de inducir respuestas de muerte celular.

Para desvelar la naturaleza de estos factores de PVX, en este trabajo de tesis se pretendió reproducir a nivel local la respuesta de necrosis inducida de forma sistémica por estas quimeras de PVX. Para ello se expresó transitoriamente (agroinfiltración) y de forma simultánea PVX junto con VSRs procedentes de distintos virus, del género *Potyvirus* o de otros, observándose necrosis en el parche agroinfiltrado, lo que sugiere que distintos VSRs son capaces de actuar en *trans* potenciando la virulencia de algún factor derivado de PVX. En los parches agroinfiltrados se observó una mayor acumulación o estabilización de los RNAs subgenómicos de PVX, o sgRNAs, sin que se determinasen variaciones importantes en los niveles del RNA genómico del virus, o gRNA. Un análisis equivalente, pero realizado con virus completos y a nivel sistémico, en infecciones mixtas de PVX con PPV (*de Plum pox potyvirus*) ofreció resultados equivalentes, dando lugar a la aparición de SN e incrementos en la acumulación de los sgRNAs de PVX. Estas observaciones permiten definir la interacción PVX-potyvirus en *N. benthamiana* como sinergismo en un sentido amplio, en el que el agravamiento de síntomas va acompañado de la acumulación de los RNAs de PVX, aunque no del gRNA. Además, estos resultados apuntaban hacia la posibilidad de que alguno de los factores víricos codificados en estos sgRNAs pudiera ser el responsable de inducir la respuesta de SN. Para analizar esta posibilidad, se comenzó estudiando la proteína P25 de PVX, un factor de patogenicidad viral que presenta funciones relevantes en replicación y movimiento del virus, además de

constituir el VSR de PVX (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Senshu *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2014).

## 7.2. Papel de P25 en la SN

Para analizar la implicación de P25 en la inducción de necrosis, se realizaron experimentos de coexpresión en parche de esta proteína junto con varios VSRs, derivados de distintos virus, del género *Potyvirus* o de otros géneros, en plantas de *N. benthamiana* y *N. tabacum*. En estos ensayos, los parches agroinfiltrados en los que P25 estaba presente mostraron necrosis. En cambio, los parches en los que se había llevado a cabo la agroinfiltración de una proteína control, o la agroinfiltración de dos VSRs distintos a P25, permanecieron sin necrosis hasta el final del experimento. Este resultado revela a P25 como un factor de PVX con capacidad para inducir necrosis en presencia de VSRs heterólogos, y apunta a la posibilidad de que su capacidad para inducir necrosis dependa de su nivel de acumulación. Esto último se confirmó agroinfiltrando diluciones de la agrobacteria transformada con el factor P25 junto con cantidades constantes de la agrobacteria transformada con el factor HC de PPV (PPV HC), de modo que la necrosis observada en el parche agroinfiltrado fue menor para diluciones mayores de P25.

Una vez identificado P25 como factor de PVX con capacidad para inducir necrosis de forma local, se comprobó su capacidad para inducir necrosis de forma sistémica. Para ello, se hizo uso de un virus PPV habilitado como vector (Pasin *et al.*, 2014), en el que se insertó la ORF codificante de P25, para dar lugar a la quimera PPV-P25. La expresión sistémica de P25, en presencia del resto de proteínas del potyvirus, entre las que se encuentra PPV HC, ocasionó un agravamiento de los síntomas en relación a la infección sencilla con PPV, tal y como ocurre con la infección mixta PVX-PPV. Así, la quimera PPV-P25 originó en *N. benthamiana* la aparición de focos de necrosis en las hojas emergentes de la planta, así como una fuerte reducción del crecimiento. Mientras tanto, las plantas agroinfiltradas con un vector PPV control no mostraron síntomas más allá de los característicos de este potyvirus, consistentes en mosaico y retraso leve del crecimiento. Este experimento demuestra que

la proteína P25 de PVX, en el contexto de la interacción sinérgica PVX-PPV, esto es en presencia de la HC de potyvirus y a nivel sistémico, también es capaz de inducir necrosis. Y ello, pese a no contar con la presencia del resto de proteínas del potexvirus.

Llegados a este punto, quedaba la posibilidad de que PVX codificase otro factor o factores con capacidad para inducir necrosis en un contexto de sinergismo. De hecho, la proteína TGB3 (de *Triple gene block 3*) de PVX ha sido caracterizada como una proteína inductora de la respuesta a proteína mal plegada (UPR, de *Unfolding protein response*), cuando se expresa de forma transitoria en *N. benthamiana* (Ye *et al.*, 2011, 2013). Para descartar esta posibilidad se obtuvo un clon de PVX mutado en la ORF de P25, el cual expresa una versión truncada de esta proteína, sin el extremo C-terminal, que resulta no funcional (Bayne *et al.*, 2005). Este mutante deletado en P25 (PVX $\Delta$ P25) fue incapaz de inducir necrosis de forma local cuando se agroinfiltró junto con otros VSRs, entre ellos PPV HC. Esta pérdida de necrosis no se debió a una menor acumulación del virus deletado, pues en presencia de PPV HC los distintos RNAs de PVX y de PVX $\Delta$ P25 se acumularon a niveles equivalentes. De este modo, en esta tesis se ha identificado a P25 como el único factor de PVX responsable de la inducción de SN asociada a los sinergismos PVX-potyvirus.

En PVX, la expresión de las proteínas del TGB se encuentra finamente regulada, manteniéndose a bajos niveles (Verchot *et al.*, 1998; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007); esta regulación, sin embargo, seguramente se vea alterada en las infecciones mixtas con potyvirus. La estabilización de los sgRNAs de PVX debida a la acción de un potente VSR, como es el HC de potyvirus, podría producir, a su vez, una sobreacumulación de proteínas como P25, en el contexto de la infección mixta PVX-potyvirus. De este modo, la SN asociada a este sinergismo se produciría solo cuando P25 se acumulase por encima de un cierto nivel umbral gracias a la acción en *trans* de HC sobre el sgRNA1 de PVX, a partir del cual se expresa precisamente P25 (TGB1 sgRNA1). Este esquema podría extenderse a otros casos de sinergismo diferentes a PVX-potyvirus que han sido pobremente estudiados. En ellos, otros factores de virulencia no identificados podrían estar implicados en el agravamiento de los

síntomas durante la interacción viral, en la que el virus codificante de un fuerte VSR sería responsable de exacerbar la acumulación del otro virus y/o los productos génicos codificados por el mismo, entre ellos el propio factor de virulencia.

La necrosis inducida por P25 fue ligada a incrementos de la actividad lipoxigenasa en el tejido agroinfiltrado, y se redujo en tratamientos con la hormona ácido salicílico (SA). Experimentos adicionales en plantas transgénicas NahG, que no acumulan SA debido a la expresión de la enzima bacteriana salicilato hidroxilasa, también sugirieron la posibilidad de que el SA no estuviera ejerciendo este efecto de forma directa, sino a través del comportamiento antagónico con la hormona ácido jasmónico (JA). Observaciones equivalentes se han realizado en otros trabajos para la necrosis inducida por la quimera PVX-HC o los sinergismos PVX-potyvirus (García-Marcos *et al.*, 2009, 2013; Pacheco *et al.*, 2012).

### **7.3. Hipótesis sobre la naturaleza de la necrosis inducida por P25**

La necrosis inducida por P25 parece estar ligada a su actividad supresora del silenciamiento génico, tal como se determinó a través del análisis de mutantes de esta proteína. De este modo, en presencia de PPV HC, sólo el mutante capaz de suprimir el silenciamiento, A104V, fue capaz de inducir necrosis, y no así los mutantes T117A o K124E, carentes de esta actividad supresora. Estos mutantes y sus funciones alteradas se encuentran caracterizados en la literatura (Bayne *et al.*, 2005).

Con el objetivo de determinar la naturaleza de la SN inducida por P25 se estudió la posible implicación de factores celulares asociados frecuentemente a la HR, como son SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) y RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*). Estos dos factores forman parte de complejos chaperona junto con HSP90 (de *Heat shock protein 90*), que se asocian a factores de resistencia R de la planta, resultando fundamentales para su función (Shirasu, 2009). Cuando se silenciaron SGT1 y RAR1 en *N. benthamiana*, y se agroinfiltraron los

factores P25 y PPV HC en estas plantas, se observó una reducción en la necrosis inducida en relación a la observada para estos mismos parches en plantas no silenciadas. Estos resultados sugieren la participación de mecanismos comunes a la HR en la necrosis inducida por estos factores, y apunta a la existencia de un factor R implicado en el reconocimiento de P25. Esta observación está en consonancia con la visión de la SN como una respuesta defensiva ineficaz y tardía, en la que un reconocimiento parcial o alterado de un factor de avirulencia Avr por un factor de resistencia R conllevaría una restricción ineficaz del patógeno, y una dispersión sistémica del mismo. Así, en un contexto de interacción viral sinérgica, HC induciría la acumulación de P25 por encima de cierto umbral, alcanzado ya en etapas avanzadas del ciclo de infección, lo que posibilitaría el reconocimiento de esta proteína por un hipotético factor R, desembocando en una respuesta de necrosis o SN.

En el modelo de acción que se ha expuesto, en el que la necrosis inducida por P25 se debe a un reconocimiento Avr-R, se podría integrar la dependencia observada en esta tesis entre la necrosis inducida por P25 y la actividad supresora del silenciamiento. P25 ejerce su acción supresora actuando a distintos niveles dentro de la ruta de silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs (sRNAs, de *small RNAs*). Así, para PVX P25 se ha descrito su acción sobre distintas proteínas ARGONAUTA (AGO) (Chiu *et al.*, 2010; Brosseau y Moffett, 2015); para otra P25, en este caso PLAMV P25 (P25 de *Plantago asiatica mosaic potexvirus*), se ha descrito su acción a nivel de la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6), y de *Supresor of gene silencig 3* (SGS3) (Okano *et al.*, 2014). Uno de los modelos de reconocimiento Avr-R manejados en la actualidad, como es el contenido en la “hipótesis del guardián” (de *Guard hypothesis*), contempla un reconocimiento indirecto del factor Avr, más que una interacción directa Avr-R (Jones y Dangl, 2006; Moffett, 2016). Así, la activación del factor R estaría más bien determinada por la acción del factor Avr sobre una diana celular, o *guard*, cuya monitorización se encuentra bajo el control del factor R, o *guard*. La desestabilización de la interacción R-*guard* por el factor Avr determinaría la aparición de los cambios conformacionales que conllevan la activación de este R (Jones y Dangl, 2006). Algunas de las dianas

celulares sobre las que P25 ejerce su actividad supresora del silenciamiento, como AGOs, RDR6 o SGS3, bien podrían actuar a modo de *guardees* bajo el control de un hipotético factor R. De este modo, las formas mutadas de P25 sin actividad supresora, no darían lugar a la desestabilización de sus dianas ni a la activación de este supuesto R. Alternativamente, puede que las mutaciones T117A y K124E, que ocasionan la pérdida de la actividad supresora, afecten gravemente la conformación de la proteína. Esto daría lugar a una pérdida de la capacidad de reconocimiento por parte del factor R, bien de forma directa, o bien de forma indirecta debido a la ausencia de efectos sobre las dianas celulares de P25. No obstante, esta posibilidad parece improbable, pues en una proteína de tan pequeño tamaño en la que residen múltiples funciones la pérdida de la conformación daría lugar, seguramente, a una pérdida del resto de sus actividades, y estos mutantes todavía retienen algunas de sus funciones, o son capaces de complementarse funcionalmente entre sí (Bayne *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2012).

Sin embargo, las interpretaciones propuestas no excluyen otras posibles, como por ejemplo que P25 pudiera estar ejerciendo estos efectos a través de la profunda remodelación que lleva a cabo en el citoesqueleto de actina y en el retículo endoplasmático (ER) durante la formación de los complejos de replicación, o cuerpos X, característicos de PVX (Tilsner *et al.*, 2012; Linnik *et al.*, 2013). De este modo, el estrés ocasionado por P25 en el ER en presencia de la proteína HC de potyvirus, la cual incrementa la acumulación de P25 en la célula, sería más elevado y activaría las respuestas de UPR y de necrosis. Algo equivalente sucedería con P25 en las infecciones de PVX-PPV, con una sobreacumulación de este factor y la activación de UPR y necrosis en las infecciones mixtas, que no tiene lugar en las infecciones sencillas con PVX. Este comportamiento ya se ha observado previamente para otra proteína de PVX, como es TGB3.

En *N. benthamiana*, la sobreexpresión de la proteína TGB3 activa la respuesta UPR, lo que se pone de manifiesto a través del incremento en la expresión de chaperonas residentes en el ER. Este incremento, además, es proporcional al grado de acumulación de TGB3, y finaliza

con la aparición de necrosis (Ye *et al.*, 2011, 2013). La contribución de esta proteína a la necrosis asociada al sinergismo PVX-potyvirus debe tener poca importancia, como se ha puesto de manifiesto en la presente tesis a través de la utilización del mutante PVX $\Delta$ P25, el cual no induce necrosis en presencia de PPV HC. Ye y colaboradores mostraron que la necrosis resultante de la sobreexpresión de TGB3 disminuye cuando se coexpresa con la chaperona BiP (de *ER luminal binding protein*) (Ye *et al.*, 2011), la cual juega un papel fundamental en la respuesta UPR (Reis y Fontes, 2012; Zhang y Wang, 2012; Verchot, 2014); este hecho es coherente con la inducción de muerte celular por estrés en el ER. Sin embargo, la necrosis inducida por P25 no se redujo en presencia de BiP, al menos no con la suficiente intensidad como para ser detectado en un análisis cualitativo, lo que hace más improbable una asociación entre estrés en el ER por P25 y la necrosis observada en el sinergismo. Un hecho adicional que vendría a confirmar esto es que el mutante A104V, el cual indujo necrosis en presencia de PPV HC, es sin embargo incapaz de formar las estructuras características de replicación y movimiento asociadas a la remodelación del ER (Yan *et al.*, 2012). La observación inversa también se cumplió, esto es que un mutante como T117A capaz de remodelar el ER (Yan *et al.*, 2012), sin embargo no produjo necrosis en presencia de PPV HC.

En plantas, SGT1 y RAR1 también se encuentran asociados a componentes de, al menos, dos etapas en la ruta de degradación proteica ubiquitina-proteasoma. SGT1 y RAR1 interactúan con componentes de la ruta con actividad ubiquitina-ligasa, bien de forma directa o bien a través de HSP90 (Shirasu, 2009). Además de esto, SGT1/RAR1 también muestran asociación funcional con el complejo regulador CSN (de *COP9 signalosome*, y COP9 de *Constitutive photomorphogenesis 9*) (Shirasu, 2009), el cual inactiva a los complejos SCF (de *Skp, Cullin, F-box containing complex*) (Schwechheimer, 2004), también con actividad E3 ubiquitina-ligasa. Estos complejos SCF resultan fundamentales para la degradación de proteínas e intervienen directamente en la señalización de numerosas fitohormonas (Kelley y Estelle, 2012; Chen y Hellmann, 2013). La conexión existente entre la ruta de degradación proteica y la ruta de activación de la respuesta mediada por factores R es profunda (Shirasu,

2009); así, alteraciones en el funcionamiento de CSN impiden la correcta activación de respuestas defensivas mediadas por algunos factores de resistencia, entre los que se encuentra el factor N (Liu *et al.*, 2002*b*). Estos papeles desempeñados por SGT1/RAR1 son compatibles con los dos escenarios propuestos para la activación de la muerte celular por P25. Así, el silenciamiento de SGT1/RAR1 podría alterar el funcionamiento de los CSNs con los que están asociados, lo que o bien podría implicar una pérdida de la actividad de un factor R hipotético implicado en la percepción de P25, o bien podría evitar la inactivación de complejos SCF, que de esta forma aliviarían la acumulación de proteína desplegada inducida por P25 a través de la ruta ubiquitina-proteasoma 26S. En cualquier caso, ambos escenarios serían coherentes con la reducción observada en la necrosis inducida por P25 en plantas silenciadas en RAR1 o SGT1.

Estudios posteriores deberían indagar en el mecanismo por el que P25 es capaz de inducir necrosis. Para ello, sería útil la búsqueda del hipotético gen R mediante estudios de homología con otros genes de resistencia, como *Nb*. La importancia de este último radica en que es el responsable de la respuesta de tipo HR inducida por P25 en otra solanácea como es la patata, *Solanum tuberosum* (Malcuit *et al.*, 1999). Lamentablemente, aunque se ha caracterizado su comportamiento (Sánchez *et al.*, 2010) y localización genética (Marano *et al.*, 2002), todavía no se conoce su secuencia. También sería interesante encontrar variedades de *N. benthamiana* o de *N. tabacum* en las cuales P25 no indujese necrosis. Con ellas, mediante el cruce entre variedades con distinta respuesta a P25, seguido del análisis de la herencia de la respuesta de necrosis a este factor, se podría arrojar algo de luz sobre la naturaleza de la misma. Se determinaría, por ejemplo, si se trata de un rasgo heredable, como un factor de resistencia, y se podría caracterizar de este modo su modelo de herencia. También podrían resultar útiles estudios de inmunoprecipitación de P25 seguidos del análisis de las proteínas del hospedador que coprecipitasen. El análisis funcional de estas proteínas del hospedador, realizado por ejemplo a través de VIGS, permitiría deducir una probable implicación de las mismas en la inducción de necrosis.

#### 7.4. El sinergismo ante el cambio climático

Desde finales del s.XX, y comienzos del s.XXI, se ha documentado un aumento en la temperatura media global del planeta, asociado a incrementos en la concentración de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) y de otros gases de efecto invernadero en la atmósfera (IPCC, 2013). Aunque el cambio climático resultante de estas alteraciones ya ha dejado sentir algunos de sus efectos, las previsiones basadas en diversos modelos manejados por el IPCC contemplan para el año 2100 una mayor frecuencia en los fenómenos meteorológicos extremos, todo ello debido a un sistema climático más inestable, derivado del previsible incremento de la [CO<sub>2</sub>] en la atmósfera hasta las 1000 ppm, y del aumento de hasta 3-4°C en la temperatura media global del planeta (IPCC, 2013). Los cambios en las condiciones ambientales determinan cambios en el comportamiento, la fisiología y la morfología de las plantas, así como de los insectos asociados a las mismas, los cuales en muchos casos actúan como vectores transmisores de enfermedades víricas. La importancia de las enfermedades víricas podría así verse incrementada en el futuro, debido un debilitamiento o modificación en las respuestas defensivas del huésped, a cambios en la capacidad atractiva del mismo para los vectores potenciales y a, en general, una mayor impredecibilidad en la aparición y el curso de los brotes epidémicos. El cambio climático conllevará modificaciones de la distribución espacial y temporal de las plantas cultivadas, de muchas plantas silvestres y de los insectos vectores asociados a las mismas, lo que hará frecuente el contacto entre poblaciones de especies vegetales y de insectos vectores que anteriormente habían estado aisladas (Canto *et al.*, 2009; Jones, 2016). Estos factores podrían sentar las bases para la aparición de nuevas enfermedades víricas, así como una mayor probabilidad en la ocurrencia de infecciones mixtas, las cuales derivarían en interacciones víricas también de consecuencias impredecibles, en el contexto de unas condiciones ambientales alteradas.

Ante esta situación, es relevante caracterizar el comportamiento de interacciones planta-virus modelo bajo factores ambientales asociadas al cambio climático. A excepción del estudio contenido en el presente trabajo de tesis, hasta ahora no se había realizado ningún análisis sobre el

efecto de las altas temperaturas o la alta [CO<sub>2</sub>] en el resultado de una interacción sinérgica entre virus (Jones, 2016). Para abordar este tema, se tomó como modelo a la interacción sinérgica PVX-PPV, y a la quimera obtenida a través de la inserción del factor HC de PPV en PVX (PVX-HC), en el hospedador modelo *N. benthamiana*, estudiándose el comportamiento de las infecciones mixtas en relación a las infecciones sencillas. Se analizó, por separado, el efecto de la alta temperatura y el de una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, ensayando temperaturas de 30-32°C en relación a los 25°C habituales, y [CO<sub>2</sub>] de 970 ppm en relación a las 401 ppm actuales. Se prestó especial atención al efecto de las nuevas condiciones ambientales sobre el agravamiento de síntomas que sigue a la interacción sinérgica entre ambos virus, así como al efecto de estos parámetros en la necrosis inducida por el factor P25 en presencia de PPV HC. También se analizó la actividad supresora del silenciamiento génico de P25 bajo estos parámetros ambientales. La actividad supresora del silenciamiento es relevante en la capacidad del virus para establecerse en el hospedador, y como se ha puesto de manifiesto en el presente estudio, en P25 parece existir relación entre la presencia de esta actividad y la capacidad de la proteína para inducir necrosis.

### 7.5. Sinergismo y CO<sub>2</sub>

En una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, la exacerbación de síntomas que conduce a la aparición de SN en la interacción PVX-PPV, así como la SN inducida por la quimera PVX-HC, se mantuvo a niveles equivalentes a los que mostraron las plantas infectadas mantenidas a la [CO<sub>2</sub>] ambiental. Sin embargo, las infecciones sencillas con PVX o con PPV mostraron reducciones en la virulencia, como se puso de manifiesto a través del análisis en la liberación de electrolitos. Este gas también ocasionó una disminución en la carga viral de PVX en la infección sencilla, mientras que la quimera PVX-HC mostró un incremento leve. Para estos dos virus, PVX y PVX-HC, sin embargo, previamente no se habían descrito cambios en la virulencia de la infección en elevada [CO<sub>2</sub>] (Del Toro *et al.*, 2015), pero este parámetro se determinó a través del análisis visual de síntomas, y no a través del análisis de electrolitos, de

mayor sensibilidad e indicativo del daño ocasionado en la integridad de la membrana celular. También se determinaron reducciones en la necrosis inducida por la combinación de la proteína P25 con PPV HC, reducción que no fue acompañada de modificaciones en la actividad supresora del silenciamiento génico para la proteína P25, estimada a través de sus efectos sobre la acumulación de una proteína GFP reportera.

En algunos trabajos anteriores, se ha observado un incremento en la acumulación de la hormona SA en atmósferas ricas en CO<sub>2</sub>, lo cual se ha correlacionado con incrementos en la resistencia a infecciones víricas y reducciones en las cargas virales, lo que redundaría a su vez en una menor gravedad de los síntomas (Huang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Jones, 2016). En el presente trabajo, la menor acumulación viral observada en la infección sencilla con PVX puede ser debida a un probable incremento en los niveles de SA en *N. benthamiana*; de hecho, altos niveles de SA y resistencia a PVX se han observado previamente en este huésped (Lee *et al.*, 2011). Esta reducción en el nivel de PVX, que conlleva a su vez una reducción en el nivel del sgRNA1 codificante de P25, es seguramente el principal motivo de la reducción observada en la virulencia, medida como liberación de electrolitos. La menor necrosis inducida en los parches agroinfiltrados con la combinación de proteínas P25/PPV HC podría estar igualmente relacionada con el incremento del SA endógeno en estas plantas por la acción de las altas concentraciones de CO<sub>2</sub>. Más arriba se comentó el resultado obtenido en el presente trabajo de tesis consistente en una reducción de la necrosis inducida por P25/PPV HC cuando las plantas se trataron con SA. Esta menor capacidad de P25 para inducir necrosis en atmósferas enriquecidas en CO<sub>2</sub> también podría contribuir a la reducción de la virulencia observada en infecciones sencillas de PVX.

Sin embargo, más complejo es el comportamiento de la quimera PVX-HC y de la infección mixta PVX-PPV, las cuales mantuvieron los niveles de virulencia habituales en alta [CO<sub>2</sub>]. PVX-HC experimentó incrementos en los niveles de gRNA y de sgRNA1 en relación al que se acumuló en condiciones ambientales, lo que podría suponer también una mayor acumulación de P25 en elevada [CO<sub>2</sub>]. Sin embargo, la menor

capacidad de P25 para inducir necrosis en alta [CO<sub>2</sub>] podría ser la responsable de que el grado de virulencia de la quimera PVX-HC se mantenga equivalente al que se registra bajo las condiciones ambientales control. Para la interacción sinérgica PVX-PPV, no se determinó la acumulación relativa de cada uno de los virus. Una explicación a la ausencia de efectos de la [CO<sub>2</sub>] elevada en la virulencia de las interacciones sinérgicas estriba en el hecho de que el factor HC de potyvirus interfiere con las respuestas defensivas dependientes de SA (Alamillo *et al.*, 2006). El SA es una hormona central en la defensa antiviral, e interviene en la activación de rutas defensivas dependientes e independientes del silenciamiento génico. La señalización por esta fitohormona es modulada no solo por HC, sino también por otros VSRs como 2b de CMV (de *Cucumber mosaic cucumovirus*) o P6 de CaMV (de *Cauliflower mosaic caulimorus*) (Alazem y Lin, 2015).

En cuanto a la actividad supresora de P25, puesto que no se modificó de forma significativa bajo una atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, es improbable que constituya un factor relevante a la hora de explicar el comportamiento observado. En cualquier caso, estos experimentos ponen de manifiesto un comportamiento diferencial entre infecciones mixtas y sencillas bajo las nuevas condiciones ambientales. Puesto que en un futuro es previsible un incremento en la frecuencia de las interacciones sinérgicas, muchas de las cuales podrían derivar en síntomas de SN, es probable que estas respuestas de necrosis se conviertan en algo más habitual. Mayor relevancia podría tener este hecho si se confirmase la hipótesis según la cual la mayor resistencia observada a las infecciones por algunos virus, como PVX, es debida a incrementos de SA en las plantas expuestas a alta [CO<sub>2</sub>], pues como se ha comentado esta ruta podría verse comprometida por otros factores víricos, como la HC de potyvirus, durante la interacción sinérgica.

## 7.6. Sinergismo y temperatura

Las altas temperaturas constituyen un factor de estrés abiótico frecuente en las plantas. En los últimos años se viene registrando un

incremento en el número y en la intensidad de las olas de calor, atribuidas cada vez más frecuentemente al cambio climático (IPCC, 2013). En la presente tesis, se ha analizado el impacto de las temperaturas elevadas en el sinergismo modelo PVX-PPV. Bajo temperaturas elevadas, de 30°C, la infección sencilla por PPV y la mixta por PVX-PPV mostraron reducciones significativas en el nivel de virulencia en relación a las plantas infectadas mantenidas a temperaturas habituales. Sin embargo, este efecto de reducción no se observó para las infecciones por PVX, las cuales mantuvieron el nivel de virulencia. En cuanto a los niveles de acumulación viral, PVX y PPV mostraron reducciones drásticas, tanto en las infecciones sencillas como en las infecciones mixtas. Como era de esperar, estas reducciones en la carga viral de PVX fueron acompañadas de reducciones en la acumulación de sgRNA1, y por tanto es previsible una reducción en la síntesis de la proteína P25 bajo estas condiciones. En contraste con esta menor virulencia de las infecciones con virus completos, la agroinfiltración de la combinación necrogénica de proteínas P25/PPV HC, en plantas sometidas a una temperatura de 32°C, mostró mayor grado de necrosis que los controles a temperatura estándar (25°C), lo que se manifestó a través de un incremento en la liberación de electrolitos y en una aparición más temprana de esta necrosis. Esta mayor necrosis, sin embargo, no fue acompañada de modificaciones en la actividad supresora del silenciamiento de la proteína P25, estimada a través de sus efectos sobre la acumulación de una proteína GFP reportera.

Estas observaciones sugieren que la reducción en la virulencia determinada para la infección sencilla con PPV y la mixta PVX-PPV se debe a la disminución en la acumulación viral inducida por el incremento de temperatura. En el caso de PVX, en el que la reducción de la carga viral seguramente conlleve una disminución en la acumulación de la proteína P25, no se observaron diferencias en la virulencia, lo que podría deberse al incremento en la capacidad necrogénica de esta proteína constatado para altas temperaturas. Este incremento en la necrosis inducida por P25 sería suficiente, por tanto, para equiparar los niveles de virulencia de las infecciones sencillas de PVX a altas temperaturas con los que se registran a temperaturas habituales, y compensar así la caída de

carga viral que se observa en este caso. Con el par sinérgico PVX-PPV, la virulencia es tan elevada a las temperaturas habituales que el incremento en la capacidad necrogénica de P25 no compensa la caída de la carga viral de PVX que se produce a altas temperaturas, alcanzando PVX niveles equivalentes a los que muestra en la infección sencilla, y observándose, también, una virulencia equivalente.

El incremento en la actividad de la ruta de silenciamiento mediado por sRNAs a altas temperaturas se ha relacionado en algunos estudios con disminuciones en el grado de acumulación de virus y con la atenuación de síntomas (Szittyá *et al.*, 2003; Chellappan *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2005). Aunque esta mayor actividad de la ruta de silenciamiento a alta temperatura pueda estar teniendo lugar en los presentes experimentos, P25 sigue siendo capaz de suprimir el silenciamiento génico de la proteína GFP de forma eficaz, pues no se observaron diferencias a este respecto entre las plantas mantenidas a altas temperaturas y los controles a temperatura estándar. Este hecho hace improbable que la reducción en la acumulación de PVX inducida por las altas temperaturas sea debida al silenciamiento. Una observación equivalente ya fue realizada para el factor HC de PVY y los niveles de acumulación de este virus a 30°C (Del Toro *et al.*, 2015). En cambio, las altas temperaturas podrían haber alterado parámetros tales como la eficacia replicativa del virus o su capacidad de movimiento tanto a nivel celular como a nivel sistémico. Tal como se comentó en la Introducción, las plantas sometidas a estrés térmico incrementan el contenido de especies ROS, y se han observado incrementos puntuales en la concentración de fitohormonas tales como el SA y el JA en algunas especies (Bita y Gerats, 2013; Hayat *et al.*, 2013; Sharma y Laxmi, 2016); estos factores podrían estar jugando un papel relevante en la modulación de la carga viral.

La razón por la que P25, en presencia de PPV HC, ocasionó mayor necrosis a altas temperaturas es desconocida. La respuesta HR inducida a través del reconocimiento Avr-R suele atenuarse a temperaturas superiores a las habituales para una interacción planta-patógeno específica (Wang *et al.*, 2009). Si bien es cierto que se conoce algún ejemplo en el que esta respuesta HR se produce solo a

temperaturas superiores a las habituales (Carter *et al.*, 2009), no deja de ser una observación poco frecuente, aunque algunas hipótesis se pueden esbozar para explicar este fenómeno. Si la necrosis inducida por P25 se desarrollase a través de mecanismos que se ajustan a la “hipótesis del guardián”, los cambios observados en el grado de necrosis podrían deberse a la alteración que ocasiona la temperatura en la actividad y/o acumulación de los componentes de la ruta de silenciamiento con los que P25 interactúa (Qu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015). Las variaciones registradas en estos factores, o *guardees*, sobre los que P25 ejerce su actividad supresora, podrían a su vez modificar la activación de un hipotético factor R.

El estrés por calor también va asociado a un incremento en la expresión de proteínas, como HSPs y componentes de la ruta de degradación proteolítica ubiquitina-proteasoma, para replegar proteínas que se hubieran desnaturalizado o eliminar aquellas que no pudieran replegarse (Lyzenga y Stone, 2012; Bitá y Gerats, 2013). El estrés conjunto ocasionado en el ER por i) la remodelación inducida por P25, ii) la acumulación de proteína desplegada y iii) el incremento de la síntesis proteica durante la adquisición de tolerancia a dicho estrés, podrían activar las respuestas de UPR y finalizar en muerte celular, como consecuencia de un estrés no resuelto.

La regulación hormonal alterada también podría jugar algún papel, pues en algunas plantas se ha observado una acumulación transitoria de varias oxilipinas, JA incluido, durante el estrés térmico, que en caso de ocurrir en este patosistema podrían incrementar la necrosis inducida por P25. De hecho, como se comentó en el capítulo 4, la actividad lipoxigenasa registrada a 32°C en parches agroinfiltrados con P25/PPV HC fue superior que la observada a 25°C. Hasta qué punto la mayor necrosis registrada podría ser debida a una mayor actividad lipoxigenasa inducida por altas temperaturas, o a una mayor activación de esta ruta hormonal debida a un incremento en la actividad elicitora de P25 como Avr, continúa siendo desconocido.

Aunque el incremento de temperatura atenuó la virulencia de la infección sinérgica PVX-PPV, el hecho de que la capacidad necrogénica

de P25 no solo no se viese afectada negativamente por este factor ambiental, sino que incluso fuese mayor a elevada temperatura, constituye una observación relevante. Los virus de RNA muestran una gran capacidad de adaptación a las nuevas condiciones ambientales, debido a la variabilidad y simplicidad inherentes a su naturaleza genética (Jones, 2016), lo que podría hacer factible la aparición de nuevas formas víricas aptas para su replicación a elevadas temperaturas. De este modo, una vez adaptados a las nuevas condiciones climáticas, la mayor capacidad necrogénica de P25 podría aumentar la virulencia asociada a los sinergismos PVX-potyvirus, y puede que comportamientos equivalentes se observasen en otras interacciones sinérgicas. Aunque un incremento más o menos homogéneo de la  $[CO_2]$  es esperable en todo el planeta, el aumento de temperatura dependerá de muchas más variables como la latitud, la altitud y la cercanía a los océanos o sistemas montañosos (IPCC, 2013). De este modo, la combinación específica de alta  $[CO_2]$ -alta temperatura sólo tendrá lugar en regiones concretas del planeta. Sin embargo, sería útil el estudio del sinergismo entre virus bajo el efecto combinado de estas dos variables, lo que proporcionaría una visión global del problema y permitiría concluir qué factor podría resultar dominante, condicionando de este modo el resultado de la interacción. Nuevas respuestas, resultante de la acción combinada de los tres estreses virus-temperatura- $[CO_2]$ , también podrían tener lugar, sin que resulten por ahora predecibles.

### **7.7. Infecciones víricas y respuestas al estrés por sequía**

Las predicciones de cambio climático contemplan una modificación en el patrón de lluvias habitual de numerosas regiones del planeta; algunos de estos cambios, de hecho, ya han comenzado a producirse (IPCC, 2013). Aunque incrementos en la pluviosidad también son esperables en zonas de Asia o África, la mayor parte de las latitudes medias podrían verse sometidas a frecuentes episodios de sequía extrema, y en los casos en los que la pluviosidad pudiera incrementarse, las precipitaciones se concentrarían en cortos intervalos de tiempo, seguido por largos períodos de sequía (IPCC, 2013). De este modo, el

estrés por falta de agua seguramente será uno de las principales amenazas a las que tendrá que hacer frente la agricultura del s.XXI, y afectará no solo a las especies domésticas, sino también a las plantas silvestres.

Los virus ocasionan importantes cambios en el metabolismo primario de la planta, e inducen la síntesis de una amplia gama de metabolitos secundarios (García-Marcos *et al.*, 2009; Fernández-Calvino *et al.*, 2014). También alteran los balances hormonales habituales (García-Marcos *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2012), y activan diversas respuestas entre las que se encuentra la UPR y la degradación proteica a través de la ruta ubiquitina-proteasoma (Verchot, 2014), cuyos objetivos son eliminar proteína mal plegada y aliviar el estrés derivado del incremento en la síntesis proteica necesario para hacer frente a este estrés biótico. Muchos de estos cambios podrían ser inducidos por el propio virus como estrategias clave para la infección. Así, la activación de una UPR suave conllevaría un incremento de la acumulación de proteínas chaperonas que podrían asistir el plegamiento de las propias proteínas del virus (Ye *et al.*, 2011, 2013; Verchot, 2014). Al mismo tiempo, la ruta ubiquitina-proteasoma podría ser empleada por el virus con el objetivo de degradar factores del huésped implicados en respuestas defensivas (Chiu *et al.*, 2010; Dielen *et al.*, 2010; Cheng y Wang, 2017). Otro conjunto de respuestas derivarían de la activación de mecanismos defensivos genéricos por parte del huésped, como son la producción de metabolitos secundarios específicos, proteínas defensivas como las PR (de *pathogenesis related*), la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y NO $\cdot$ ) o la acumulación de fitohormonas defensivas tales como el SA y el JA (Spoel y Dong, 2012). Algunas de estas respuestas no son exclusivas del estrés biótico, sino que obedecen a una serie de mecanismos genéricos de defensa frente a estreses, que se ponen en marcha con el objetivo de garantizar la homeostasis celular en condiciones adversas. Es concebible, por tanto, que la activación de estas respuestas por un estrés previo, como podría ser el derivado de una infección vírica, pudiera aportar una ventaja al huésped ante otro estrés sobrevenido, como podría ser un estrés abiótico, al proporcionar una aclimatación metabólica previa. Esta posibilidad, en la que los virus emergerían como factores promotores de la viabilidad del huésped más

que como causantes de un perjuicio en el mismo, solo se ha comenzado a explorar recientemente (Ramegowda y Senthil-Kumar, 2015; Roossinck, 2015).

Como se ha comentado más arriba, uno de los estreses abióticos más relevantes, en la actualidad y también de cara al futuro, es el derivado de la falta de agua. Xu y colaboradores, en un estudio empleando distintas combinaciones de virus de RNA y hospedadores vegetales, mostraron como este estrés biótico efectivamente era capaz de incrementar la tolerancia a la sequía, lo cual se relacionó con la acumulación de metabolitos tales como la prolina, la putrescina o la trehalosa inducidos por la infección (Xu *et al.*, 2008). Estos metabolitos no se acumulan solo bajo estrés biótico, sino también ante otros tipos de estreses abióticos, como son el osmótico, la congelación, y también la sequía. En todos ellos, podrían tener funciones relevantes en la desactivación de radicales libres, sobre el mantenimiento de la integridad de estructuras celulares y sobre la modulación del potencial hídrico, actuando como moléculas protectoras (Alet *et al.*, 2011; Fernández-Calvino *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2015).

Sin embargo, Xu y colaboradores no analizaron detalladamente el efecto de la infección vírica sobre otros parámetros morfológicos y fisiológicos que son básicos en la regulación del estatus hídrico de la planta, como son la transpiración y el comportamiento estomático o la arquitectura radicular. Tampoco se dio respuesta a un dato clave como es la regulación hormonal de la tolerancia a la deshidratación en las plantas infectadas, la cual seguramente esté alterada, dado que sí se registró una mayor acumulación de SA inducido por la presencia del virus. Se sabe que entre la hormona ácido abscísico (ABA), hormona por excelencia implicada en la modulación de las respuestas a estreses abióticos, y el SA, existe, de hecho, un comportamiento antagónico (Fujita *et al.*, 2006; Bari y Jones, 2009), y los niveles elevados de SA en plantas infectadas podrían alterar la respuesta a la señalización por ABA inducida bajo deshidratación. Aunque las plantas infectadas presenten, efectivamente, una tolerancia incrementada al estrés por sequía, medida en este y otros trabajos como el contenido (%) en agua de la planta (Verslues *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013), puede que esto no implique,

necesariamente, un incremento de la eficacia biológica (o *fitness*) respecto a las plantas no infectadas y deshidratadas.

### 7.8. Infecciones víricas, virulencia y tolerancia a la sequía

En el presente trabajo de tesis, se llevó a cabo el análisis de la tolerancia a la deshidratación inducida por los virus participantes en la interacción sinérgica estudiada más arriba, tanto en infecciones sencillas como mixtas, sobre *N. benthamiana*, y también sobre el hospedador modelo por excelencia en biología vegetal, *Arabidopsis thaliana*. De este modo, se analizó la respuesta al estrés por sequía en *N. benthamiana* infectada con PVX, PPV, PPV-P25 y con la infección mixta PVX-PPV. Aunque *A. thaliana* ecotipo Col-0 se ha descrito como un no-huésped para PVX (Jaubert *et al.*, 2011), en otro trabajo reciente este virus sí se acumuló a niveles mínimos, estableciendo infecciones en este hospedador que se han descrito como “subliminales” (Andika *et al.*, 2015). Por ello, en el presente trabajo, en *A. thaliana* se estudiaron las infecciones sencillas con PPV y PPV-P25, pero no con PVX dada la incapacidad de detectar su acumulación en las condiciones experimentales que fueron empleadas; en cambio, sí se analizó la infección mixta PVX-PPV, dado que la presencia del potyvirus incrementó la acumulación del potexvirus hasta niveles detectables.

En otros estudios anteriores, se ha observado también como PVX, en presencia de otro virus, es capaz de incrementar su acumulación sistémica en *A. thaliana* hasta hacerse detectable. Así, Jaubert y colaboradores observaron como PVX en presencia de PepRSV (de *Pepper ringspot tobnavirus*) acumula a niveles detectables en *A. thaliana*, mientras que en sus estudios PVX resultó indetectable en ausencia de otro virus coinfectante. Esta interacción, descrita también como sinérgica, conduce igualmente a un agravamiento de los síntomas, con intensificación de la necrosis inducida en relación a la que se observa en infecciones sencillas con PepRSV (Jaubert *et al.*, 2011). En el presente trabajo de tesis, la infección simultánea de PVX con PPV posibilitó que el primero acumulase hasta niveles detectables bajo las condiciones analizadas, lo que también podría ser descrito como una interacción

sinérgica entre ambos virus, pese a que en este caso a esta interacción no le siguió un empeoramiento de los síntomas, en relación a lo que se observó en infecciones sencillas con PPV. La infección de *A. thaliana* por PVX parece estar fuertemente limitada por acción del silenciamiento génico (Jaubert *et al.*, 2011; Andika *et al.*, 2015); de este modo, el incremento de la acumulación de PVX en coinfecciones con PepRSV se ha achacado a la actividad supresora de la proteína VSR 12K codificada por este virus, (Jaubert *et al.*, 2011). De igual modo, pudiera pensarse que HC de PPV fuera el responsable de la acumulación incrementada de PVX en la infección mixta a través de la supresión del silenciamiento. Sin embargo, la quimera PVX-HC analizada tampoco fue capaz de infectar a niveles detectables *A. thaliana*; Jaubert y colaboradores tampoco fueron capaces de detectar acumulación alguna de la quimera PVX-12K (Jaubert *et al.*, 2011). Todos estos datos sugieren que otros procesos, aparte de la supresión del silenciamiento génico, deben de estar siendo alterados por la coinfección del potyvirus, favoreciendo la acumulación de PVX, en las infecciones mixtas PVX-PPV en *A. thaliana*.

La infecciones mixtas PVX-PPV o con la quimera PPV-P25, como era esperable, originaron en *N. benthamiana* síntomas más graves que los correspondientes a las infecciones sencillas de PVX o PPV, siendo la infección de mayor virulencia la correspondiente a PPV-P25. En *A. thaliana*, no se observaron diferencias notables entre la infección sencilla con PPV o con la mixta PVX-PPV, seguramente porque en este hospedador PVX, aun en presencia de PPV, acumula a bajo nivel. En este hospedador, la mayor virulencia correspondió también a la quimera PPV-P25. La expresión de P25 a partir de la quimera PPV-P25 derivó en un incremento notable de la virulencia en relación a las infecciones sencillas con PPV, observándose una acusada reducción en el peso fresco de la planta, una fuerte disminución en la producción de semillas y un aumento de la necrosis en las hojas de la roseta, lo que revela a P25 como un factor de virulencia asociado a necrosis también en *A. thaliana*.

La mayor gravedad de los síntomas provocados por la quimera PPV-P25 en comparación con el par sinérgico PVX-PPV podría ser debida a numerosos factores. La expresión de P25 a partir del vector potyviral, como constituyente de la poliproteína potyviral inicial,

conduciría a una acumulación de esta P25 equivalente a la del resto de proteínas del virus, una vez la poliproteína es procesada. Esto seguramente represente unos niveles de acumulación de P25 muy superiores a los que se producen en infecciones con PVX en presencia de PPV, debido al control de la expresión del sgRNA1 de PVX. Este sgRNA1, tal y como se ha descrito previamente (Verchot *et al.*, 1998), se acumula a niveles muy bajos en relación al gRNA, o incluso a otro sgRNA como es el de la CP, en la infección sencilla con PVX. En presencia del potyvirus, aunque los niveles del sgRNA1 se estabilizan, lo que potencialmente podría ocasionar una mayor acumulación de P25, puede que esta aún sea baja en comparación con la que tiene lugar en infecciones con PPV-P25. Alternativamente, diferencias en la cinética de infección de PVX y de PPV en la infección mixta, podrían hacer que los picos de acumulación del P25 de PVX y de HC de PPV no solapen perfectamente en la célula, de forma que aunque se incremente la acumulación de P25 esta no sea máxima. Con la quimera PPV-P25 la cinética de infección sería la de un solo virus, y por tanto la acción supresora de HC sobre el silenciamiento de PPV-P25, y la consiguiente acumulación de todos los factores virales, tendría lugar de forma sincronizada en espacio y tiempo.

Las plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* con las infecciones mencionadas más arriba se sometieron a distintos períodos de sequía, y se analizaron diversos parámetros. Así, se determinó la tolerancia a la deshidratación, a través del cálculo del contenido en agua, y se examinó la eficacia biológica o *fitness*, a través del recuento del número de plantas productoras de semillas y de la cantidad de semillas producida por las mismas. El efecto metabólico de estos estreses se estimó a través del análisis de imágenes de fluorescencia de las plantas, y en *A. thaliana*, además, a través de la determinación del contenido en hormonas clave y metabolitos específicos. También se analizó mediante termografía el impacto de la infección sobre la transpiración, en plantas hidratadas y sometidas a deshidratación; la validez de esta técnica fue corroborada, cuando fue posible, mediante mediciones directas a través de un conductímetro aplicado sobre la hoja. En relación a la transpiración, también se estudiaron parámetros morfológicos tales como el número de

estomas y la relación estoma/células totales, o índice estomático, en la superficie abaxial de la hoja. También se llevó a cabo un análisis sobre el efecto de las infecciones en la arquitectura de la raíces en *A. thaliana*. Para determinar el estado hormonal de las plantas y su relación con la tolerancia a la sequía, se analizó el contenido en agua de mutantes de *A. thaliana* afectados en la síntesis o la percepción de ABA, SA o JA, en plantas no infectadas o infectadas con PPV-P25, sometidas a riego o a estrés por sequía.

En consonancia con lo que se ha observado en otros trabajos, todas las infecciones analizadas en la presente tesis fueron acompañadas de incrementos en la tolerancia a la deshidratación, pues en todos los casos el contenido en agua fue mayor en las plantas infectadas deshidratadas que en los controles deshidratados no infectados. Fueron las plantas infectadas con PVX-PPV, en *N. benthamiana*, o con la quimera PPV-P25, en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, las que precisamente mostraron mayor tolerancia a la deshidratación, lo que sugiere, al menos dentro del conjunto de infecciones estudiadas, una asociación entre mayor virulencia y tolerancia a la sequía.

### **7.9. Infecciones víricas y eficacia biológica en el estrés por sequía**

Como se ha mencionado más arriba, pudiera ser que una mayor tolerancia a sequía de las plantas infectadas no redundase en un incremento de su eficacia biológica respecto a plantas no infectadas, por lo que este parámetro fue analizado en detalle. En *A. thaliana*, las infecciones con PPV o con PVX-PPV dieron lugar a incrementos en el número de plantas productoras de semillas respecto a plantas no infectadas en una situación de sequía extendida, aunque la producción de semillas por planta fue esencialmente la misma. En cambio, la infección con la quimera PPV-P25, la de mayor virulencia, no aportó ninguna ventaja a este respecto en relación al control no infectado, pese a que estas plantas mostraron el mayor grado de tolerancia a sequía. En el caso de *N. benthamiana*, las infecciones menos virulentas, PVX o PPV, pese a incrementar levemente la tolerancia a la deshidratación, no afectaron de

modo significativo a la eficacia biológica del hospedador; en las infecciones más virulentas, PPV-P25 o PVX-PPV, la mayor tolerancia fue acompañada, sin embargo, de una reducción drástica en el número de plantas productoras de semillas, en relación a las infecciones sencillas o al control no infectado. De este modo, tanto en *N. benthamiana* como *A. thaliana*, el elevado perjuicio morfológico y fisiológico ocasionado en las plantas por las infecciones de mayor virulencia, no compensa el posible beneficio que pudiera derivarse de una mayor aclimatación metabólica a la deshidratación y de la mayor acumulación de agua en la planta. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que no debe inferirse para todos los patosistemas una conexión directa entre tolerancia a la sequía y eficacia biológica en el contexto de este estrés combinado, sin considerar la contribución negativa de la virulencia.

#### **7.10. Infecciones víricas y transpiración en el estrés por sequía**

Para ambos huéspedes, las infecciones analizadas condujeron a un incremento en la densidad estomática, pero no así en el índice estomático. Esta última observación se podría conciliar con el hecho de que las infecciones provocaron reducciones en el tamaño de las células pero no alteraron la proporción entre los distintos tipos celulares, lo que conduciría a la mayor densidad estomática observada. La conductancia estomática depende principalmente del tamaño de los estomas y de la densidad estomática, habiéndose observado una fuerte correlación negativa entre ambos parámetros. Un menor tamaño de los estomas combinado con una mayor densidad estomática supone a su vez unos mayores valores de conductancia, tal y como ha sido descrito por Franks y colaboradores (Franks *et al.*, 2009). Esta densidad estomática, por tanto, no parece un factor que contribuya positivamente a las tolerancias observadas, en el sentido de disminuir las pérdidas de agua por transpiración.

Una mayor densidad estomática no excluye, sin embargo, una regulación diferencial de la apertura y cierre de los estomas en las plantas infectadas. Así, en *N. benthamiana*, se observó una disminución de la

transpiración para las infecciones con PPV-P25 y la infección mixta PVX-PPV, tanto en los controles hidratados como durante el período de deshidratación, lo que puede constituir una explicación a la mayor tolerancia a la deshidratación que mostraron estas plantas. En el caso de *A. thaliana*, sin embargo, se observó un incremento en la transpiración en todas las plantas infectadas, más acentuado aún en las infectadas con la quimera PPV-P25, diferencias que se mantuvieron cuando las plantas se sometieron a deshidratación. Esta observación está en consonancia con lo descrito para este hospedador cuando se infectó con otro virus de RNA no relacionado, como es el cucumovirus CMV (Westwood et al., 2013). Esta transpiración incrementada podría deberse a la mayor densidad estomática, y hace improbable una contribución positiva de este factor a la tolerancia a la sequía observada en las infecciones de *A. thaliana*. Los resultados sugieren que la tolerancia a la deshidratación inducida por las infecciones podría regularse a través de mecanismos esencialmente diferentes en *A. thaliana* y en *N. benthamiana* en lo que concierne a la regulación de la pérdida de agua por transpiración, lo que no excluye la existencia de mecanismos comunes, como podrían ser la aclimatación metabólica y la modificación de los balances hormonales.

En *A. thaliana*, también se analizó si estas infecciones podrían ocasionar cambios apreciables en la arquitectura radicular, en el sentido de incrementar su superficie, lo que facilitaría la adquisición de agua del sustrato y justificaría los incrementos de tolerancia a la sequía observados. No se encontraron diferencias relevantes en ninguno de los parámetros estudiados, lo que no excluye la posibilidad de que tuviera lugar algún cambio fisiológico.

### **7.11. Infecciones víricas y aclimatación al estrés por sequía**

En plantas, la acumulación de determinados metabolitos es una estrategia común para hacer frente al estrés por deshidratación. Al disminuir el potencial hídrico del suelo, también debe reducirse el de la planta de forma que el primero siga siendo mayor que el segundo, garantizando así el flujo de agua (Verslues *et al.*, 2006). La disminución del potencial hídrico en la planta se consigue, entre otros mecanismos, a

través de la acumulación de solutos compatibles, los cuales no interfieren con el metabolismo general aun a concentraciones elevadas (Verslues *et al.*, 2006). Para determinar si esta acumulación estaba teniendo lugar en *A. thaliana* infectada con los distintos virus, o bajo la infección mixta, y si esto podría explicar el incremento en la tolerancia a la sequía observado, se analizaron los perfiles metabólicos de plantas no infectadas e infectadas, sometidas a distintos regímenes hídricos, y se compararon entre sí. Estos distintos regímenes hídricos consistieron en plantas hidratadas, plantas sometidas a un período de deshidratación suave o a uno intenso, y plantas rehidratadas tras el período de deshidratación intenso.

En este análisis, el tipo de régimen hídrico fue el principal factor que influyó sobre el perfil de acumulación de metabolitos. Varios metabolitos frecuentemente asociados a la respuesta al estrés por sequía, como el triptófano, la prolina, la fructosa, la rafinosa, la isoleucina o la fenilalanina, se acumularon en todos los regímenes hídricos que implicaban privación de agua, en relación a las plantas hidratadas (Bartels y Sunkar, 2005; Seki *et al.*, 2007). Todas las infecciones analizadas condujeron a una alteración del perfil metabólico de la planta previa a la exposición a la sequía, con metabolitos incrementados o disminuidos en relación a las sanas, lo que sugiere un estatus metabólico general alterado por la infección viral. Este efecto fue más marcado en plantas infectadas con PPV-P25. Además, el análisis de los datos metabólicos mediante agrupamiento jerárquico (HCL, de *hierarchical clustering*) también mostró como las plantas infectadas con la quimera PPV-P25, antes de la deshidratación, ya presentaban un perfil metabólico particular, claramente diferenciado del resto de infecciones virales. Entre los metabolitos cuyos niveles se incrementaron está la putrescina, cuyo papel en la defensa frente a estreses abióticos ha quedado confirmado en numerosos estudios previos (Seki *et al.*, 2007; Alcázar *et al.*, 2010; Alet *et al.*, 2011; Fernández-Calvino *et al.*, 2014). Es posible que este estatus metabólico alterado por la infección, de forma previa a la exposición al estrés por sequía, y que conlleva la acumulación de metabolitos protectores, aclimate a la planta al posterior estrés por sequía. De este modo, pese a los mayores niveles de transpiración, la acumulación de

metabolitos bajo esta infección podría explicar la tolerancia incrementada a la deshidratación que presentaron estas plantas de *A. thaliana*. La mayor acumulación de metabolitos podría ocasionar a su vez un coste adicional en términos de eficacia reproductiva, ocasionando la disminución en la producción de semillas observada en relación a las otras infecciones menos virulentas.

Otro aspecto clave de la tolerancia a la sequía es la regulación dependiente del ABA. Esta hormona, tal y como se detalló en la Introducción, es responsable de la puesta en marcha de muchos de los mecanismos de defensa frente a estreses (Fujita *et al.*, 2006; Verslues *et al.*, 2006; Seki *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, el ABA regula la apertura y cierre de estomas (Daszkowska-Golec y Szarejko, 2013), está implicado en la señalización que deriva en la acumulación de prolina durante el estrés por sequía (Hayat *et al.*, 2012) y modula el metabolismo de poliaminas como la putrescina (Alcázar *et al.*, 2006). Sin embargo, otras hormonas también parecen jugar un papel clave en la tolerancia a este estrés de forma independiente del ABA. Entre ellas, el SA es aquella en la que mejor se ha caracterizado una acción promotora de la tolerancia a la sequía. El SA interviene también en el cierre de estomas por mecanismos independientes al ABA, y activa la expresión de enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos antioxidantes y de enzimas responsables de la desactivación directa de radicales libres (Miura *et al.*, 2013; Okuma *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2015). El SA también se ha relacionado con la acumulación de prolina y de putrescina en algunas plantas (Németh *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2015).

Por todo ello, aparte del estatus metabólico también se analizó el contenido hormonal en *A. thaliana*, en plantas no infectadas o infectadas bajo los regímenes hídricos mencionados más arriba, y se compararon entre sí. Como era de esperar, en los controles no infectados se dio un incremento en el contenido de ABA bajo deshidratación intensa, en relación a los niveles de las plantas control bajo hidratación. Sin embargo, este incremento no se dio en las plantas infectadas. Las plantas infectadas con la quimera PPV-P25 e hidratadas presentaron, a su vez, los mayores niveles de acumulación de SA, niveles que también se mantuvieron más elevados que en el resto en deshidratación y en

rehidratación. Esta tendencia a la acumulación de SA y ausencia de cambios en la acumulación de ABA en plantas infectadas, más acentuado en la infección más virulenta con PPV-P25, sugiere que el comportamiento antagónico descrito para ABA-SA podría estar teniendo lugar en las condiciones del presente estudio. Cuando se analizó el contenido en SA y en ABA para el conjunto de todos los tratamientos hídricos e infecciones, se pudo determinar la existencia de una correlación negativa y significativa entre los niveles de ambas hormonas.

El papel del SA en la tolerancia a este estrés se analizó más a fondo a través del empleo de plantas transgénicas NahG de *A. thaliana* o de *N. benthamiana*, afectadas en la acumulación de SA debido a la expresión de la enzima bacteriana salicilato hidroxilasa. El incremento de la tolerancia a la sequía inducido por la quimera PPV-P25 en plantas silvestres, no tuvo lugar en estas transgénicas NahG, situándose el contenido en agua de las plantas deshidratadas NahG, infectadas o sanas, a niveles equivalentes. En plantas de *A. thaliana* afectadas en la biosíntesis de ABA, *aba2-1*, hipersusceptibles a la deshidratación, la infección con PPV-P25 ocasionó, sin embargo, un incremento de la tolerancia a la deshidratación en relación al control *aba2-1* no infectado muy superior al que se observa en las plantas silvestres. Esto último podría estar ocasionado por la ausencia de ese efecto antagónico ABA-SA, lo que potenciaría la señalización por SA en estas plantas, como sugiere el incremento en la acumulación de PR-1 (de *Pathogenesis-related 1*, un gen de respuesta a SA) en estas mismas plantas *aba2-1* sanas o infectadas. Un análisis equivalente a los anteriores llevado a cabo con plantas de *A. thaliana coi 1-1*, afectadas en la percepción del JA, mostró la contribución irrelevante de esta hormona a la tolerancia a sequía inducida por la infección con PPV-P25 en estas plantas.

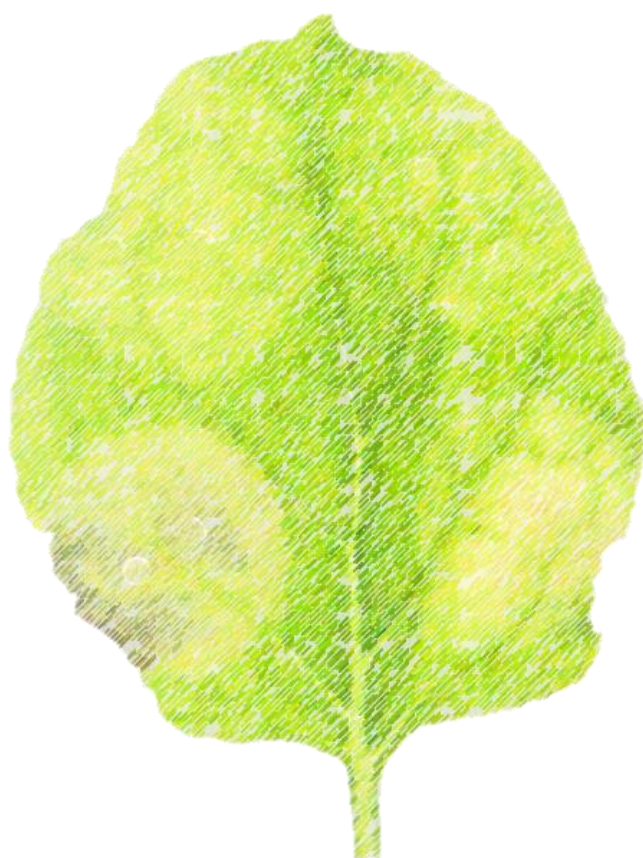
Todos estos hechos sugieren que es el SA, acumulado como consecuencia de la infección, el que desencadena los mecanismos protectores que incrementan la tolerancia al estrés por sequía en las plantas analizadas. Este efecto de aclimatación metabólica que produce la infección, y que incrementa la tolerancia a la sequía, está ligado en los casos observados a la virulencia de la infección. La comparación entre las infecciones con la quimera PPV-P25, en relación a la infección con el

virus PPV, pone de manifiesto el papel fundamental de P25 en el incremento de la virulencia. Por tanto, este factor es el responsable, en última instancia, de la reprogramación metabólica específica que conlleva la adquisición de una mayor tolerancia a la sequía en las infecciones sinérgicas PVX-PPV o con la quimera PPV-P25 en *N. benthamiana*, y de la infección con PPV-P25 en *A. thaliana*. En el futuro, sería interesante determinar hasta qué punto la virulencia determina la puesta en marcha de mecanismos defensivos útiles en la tolerancia a la deshidratación, y si es posible desligar en algún grado la primera de la segunda. Esto se podría lograr a través del análisis de formas mutadas de P25, o de formas víricas atenuadas, capaces de incrementar la tolerancia a la sequía en ausencia del perjuicio derivado de una mayor virulencia.



## 8. CONCLUSIONES

---





## CONCLUSIONES

1. La proteína P25 de PVX (TGB1) es el principal determinante de patogenicidad responsable de la necrosis sistémica (SN) asociada al sinergismo PVX-potyvirus, en los hospedadores *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*.

2. P25 induce necrosis de forma dependiente de dosis. La proteína HC (HCPro, de *Helper component proteinase*) de potyvirus actúa en los sinergismos PVX-potyvirus estabilizando los niveles del RNA subgenómico 1. Esto podría ocasionar, en última instancia, una mayor acumulación de P25 y ser el motivo de la aparición de SN.

3. La necrosis inducida por P25 se desarrolla a través de mecanismos que implican a factores comunes con la respuesta hipersensible, como SGT1 (de *Suppressor of the G2 allele of SKP1*) y RAR1 (de *Required for MLA12 resistance 1*). Además, esta necrosis parece estar asociada a la actividad supresora del silenciamiento génico de P25. Todo ello es compatible con la existencia de un hipotético factor R, el cual reconocería P25 de forma ineficaz.

4. Parámetros asociados al cambio climático, tales como el incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> ([CO<sub>2</sub>]) o las altas temperaturas (T), tienen un efecto diferencial sobre la virulencia de las infecciones sencillas frente a las infecciones mixtas, en los virus responsables del sinergismo PVX-PPV (de *Plum pox potyvirus*), en *N. benthamiana*.

5. La alta [CO<sub>2</sub>] o la elevada T no modifican la actividad supresora del silenciamiento génico de P25, aunque sí tienen efectos dispares sobre la capacidad necrogénica de este factor y sobre la carga viral. De este modo, estos estreses ambientales deben de estar modulando otros procesos distintos al silenciamiento génico, condicionando el resultado de las infecciones en *N. benthamiana*.

6. En *Arabidopsis thaliana* y *N. benthamiana* la quimera PPV-P25 presenta mayor virulencia que PPV. P25 actúa, por tanto, como factor de virulencia en distintos huéspedes.

7. Las infecciones más virulentas, PPV-P25 en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, y la combinación PVX-PPV en *N. benthamiana*, confieren mayor tolerancia a la sequía que las infecciones sencillas con PVX o PPV. Esta mayor tolerancia, sin embargo, no siempre va acompañada de una mayor eficacia biológica del hospedador. De este modo, los efectos beneficiosos derivados de una tolerancia incrementada a la deshidratación se pueden ver contrarrestados por el perjuicio en la eficacia biológica que una infección más virulenta ocasiona sobre el hospedador. Las infecciones de virulencia moderada, sin embargo, son capaces de producir incrementos de la eficacia biológica de la planta bajo condiciones de estrés por sequía, aunque este fenotipo condicional varía de forma dependiente de hospedador.

8. Los mecanismos por los que las infecciones más virulentas inducen mayores niveles de tolerancia a la deshidratación difieren entre especies. Así, en *N. benthamiana*, la reducción de la tasa de transpiración ocasionada por los virus probablemente es responsable de un incremento en la tolerancia. Por otra parte, las infecciones incrementan la tasa de transpiración en *A. thaliana*, seguramente debido a la mayor densidad estomática, por lo que este factor no podría explicar la tolerancia a la sequía de este hospedador.

9. En *A. thaliana*, las infecciones examinadas otorgan a estas plantas un estado metabólico y hormonal alterado, caracterizado por la elevada acumulación de sustancias osmoprotectoras y antioxidantes, y por un incremento en la acumulación de ácido salicílico (SA). Sin embargo, las infecciones no van acompañadas de cambios en los niveles de ácido abscísico (ABA) durante el proceso de deshidratación, que sí ocurren en las plantas no infectadas sometidas al estrés por sequía. Esta aclimatación metabólica y hormonal inducida por la infección, que es más intensa en la infección más virulenta (PPV-P25), puede justificar la tolerancia incrementada a la deshidratación constatada en estas plantas.

10. El SA es la hormona implicada en la activación de los mecanismos protectores responsables de la tolerancia incrementada al estrés por sequía en los dos hospedadores examinados, *A. thaliana* y *N. benthamiana*.

## CONCLUSIONS

1. The P25 (TGB1) protein of PVX is the main determinant of pathogenicity responsible for systemic necrosis (SN) in PVX-potyvirus-associated synergisms, in the experimental hosts *Nicotiana benthamiana* and *N. tabacum*.

2. Necrosis induced by P25 is dose-dependent. Potyviral HC (HCPro, *Helper component proteinase*) protein acts on PVX-potyvirus synergisms by stabilizing the level of subgenomic RNA 1. This stabilization may lead to higher accumulation of P25, which in turn may cause SN.

3. P25-induced necrosis and hypersensitive response are executed through shared mechanisms, involving factors like SGT1 and RAR1. Moreover, necrotic symptoms seem to be associated with the silencing suppressor activity of P25. These results are compatible with a putative R factor recognizing P25 inefficiently.

4. Parameters associated with climate change, such as increased CO<sub>2</sub> concentrations ([CO<sub>2</sub>]) or elevated temperatures (T), affect the virulence of single and mixed infections in a different way, as exemplified by the viruses responsible for the PVX-PPV (Plum pox potyvirus) synergistic interaction in *N. benthamiana*.

5. High [CO<sub>2</sub>] or elevated T do not have any effects on the silencing suppressor activity of P25, but they affect necrogenic properties of this factor and viral titre in a different manner. Therefore, these abiotic stresses may be modulating processes other than gene silencing, which determine the outcome of the infection in *N. benthamiana*.

6. The chimeric virus PPV-P25 shows higher virulence than PPV in both *Arabidopsis thaliana* and *N. benthamiana*. So P25 acts as a virulence factor in different hosts.

7. The most virulent infections, i.e. PPV-P25 in both *A. thaliana* and *N. benthamiana*, and the combination PVX-PPV in *N. benthamiana*, confer an enhanced drought-tolerant phenotype compared to single

infections with PPV or PVX. Nevertheless, a higher tolerance to drought is not always accompanied by an increase in fitness. So, the potential benefits deriving from an increased tolerance to dehydration would be counteracted by fitness costs caused by the most virulent infections in the host. Nevertheless, infections showing moderate virulence are able to increase host fitness under drought conditions, although this conditional phenotype varies in a host-dependent manner.

**8.** The mechanisms by which the most virulent infections induce higher tolerance to dehydration stress seem to differ between species. A reduced transpiration rate caused by virus infection is likely responsible for increased tolerance in *N. benthamiana*. In the other hand, transpiration rate is increased in *A. thaliana*, probably caused by higher stomatal density and, thus, cannot explain virus-induced drought tolerance in this host.

**9.** In *A. thaliana*, viral infections confer an altered metabolic and hormonal status to plants, which is characterized by the accumulation of antioxidant, osmoprotective compounds, and by increased levels of salicylic acid (SA). However, infections are not accompanied by changes in abscisic acid levels during the dehydration process, as occurs in non-infected, stressed plants. This metabolic and hormonal acclimation induced by infections, more prominent with the most virulent infection (PPV-P25), could explain the increased tolerance to dehydration observed in these plants.

**10.** SA is the hormone involved in activating the tolerance mechanisms responsible for the increased tolerance to drought stress induce by virus infection in both *A. thaliana* and *N. benthamiana* plants.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---





## A

- Acharya BR, Assmann SM.** 2009. Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biology* **69**, 451-462.
- Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster GD, Martelli GP, Milne RG, Zavriev SK, Fauquet CM.** 2004. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* **149**, 1045-1060.
- Adams MJ, Antoniw JF, Beudoin F.** 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 471-487.
- Adams M, Zerbini F, French R, Rabenstein F, Stenger D, Valkonen J.** 2011. Family *Potyviridae*. Virus taxonomy. 9th report of the international committee for taxonomy of viruses. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press, 1069-1089.
- Ainsworth EA, Rogers A.** 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO<sub>2</sub>]: Mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* **30**, 258-270.
- Alam CM, Singh AK, Sharfuddin C, Ali S.** 2014. Incidence, complexity and diversity of simple sequence repeats across potyvirus genomes. *Gene* **537**, 189-196.
- Alamillo JM, Saénz P, García JA.** 2006. Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant Journal* **48**, 217-227.
- Alazem M, Lin NS.** 2015. Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology* **16**, 529-540.
- Alcaide-Loridan C, Jupin I.** 2012. Ubiquitin and Plant Viruses, Let's Play Together! *Plant Physiology* **160**, 72-82.
- Alcázar R, Cuevas JC, Patron M, Altabella T, Tiburcio AF.** 2006. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **128**, 448-455.
- Alcázar R, Planas J, Saxena T, Zarza X, Bortolotti C, Cuevas J, Bitrián M, Tiburcio AF, Altabella T.** 2010. Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 547-552.
- Alet AI, Sanchez DH, Cuevas JC, et al.** 2011. Putrescine accumulation in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines enhances tolerance to dehydration and freezing stress. *Plant signaling & behavior* **6**, 278-86.
- Alvarado V, Scholthof HB.** 2009. Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20**, 1032-1040.
- Alvarado VY, Scholthof HB.** 2012. AGO2: A New Argonaute compromising plant virus accumulation. *Frontiers in Plant Science* **2**, 1-6.

**Amthor JS.** 1995. Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO<sub>2</sub>] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biology* **1**, 243-274.

**Andika IB, Maruyama K, Sun L, Kondo H, Tamada T, Suzuki N.** 2015. Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against *Potato virus X* in leaves and roots. *Plant Journal* **81**, 781-793.

**Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, Freialdenhoven A, Shirasu K, Schulze-Lefert P.** 2002. The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.

## B

**Barajas D, Tenllado F, Díaz-Ruíz JR.** 2006. Characterization of the recombinant forms arising from a *Potato virus X* chimeric virus infection under RNA silencing pressure. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 904-13.

**Bari R, Jones JDG.** 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**, 473-488.

**Bartels D, Sunkar R.** 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**, 23-58.

**Batten JS, Yoshinari S, Hemenway C.** 2003. *Potato virus X*: A model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology* **4**, 125-131.

**Baulcombe DC, Chapman S, Santa Cruz S.** 1995. Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *The Plant Journal* **7**, 1045-1053.

**Bayne EH, Rakitina D V., Morozov SY, Baulcombe DC.** 2005. Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal* **44**, 471-482.

**Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC.** 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell* **11**, 781-92.

**Bernstein E, Caudy A, Hammond SM, Hannon GJ.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.

**Bhattacharjee S, Zamora A, Azhar MT, Sacco MA, Lambert LH, Moffett P.** 2009. Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant Journal* **58**, 940-951.

**Bigeard J, Colcombet J, Hirt H.** 2015. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**, 521-539.

**Bitá CE, Gerats T.** 2013. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science* **4**, 273.

**Blanc S, Michalakakis Y.** 2016. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Current Opinion in Insect Science* **16**, 36-43.

**Blée E.** 2002. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**, 315-321.

**Bohnert HJ, Shen B.** 1999. Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* **78**, 237-260.

**Bologna NG, Voinnet O.** 2014. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annual review of plant biology* **65**, 473-503.

**Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Bacic A, Roessner U.** 2012. Drought responses of leaf tissues from wheat cultivars of differing drought tolerance at the metabolite level. *Molecular Plant* **5**, 418-429.

**Brodersen P, Voinnet O.** 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics* **22**, 268-280.

**Brosseau C, Moffett P.** 2015. Functional and genetic analysis identify a role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in antiviral RNA Silencing. *The Plant cell* **27**, 1742-54.

**Brosseau C, Oirdi M El, Adurogbangba A, Ma X, Moffett P.** 2016. Antiviral defense involves AGO4 in an Arabidopsis–Potexvirus Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **29**, 878-888.

## C

**Calil IP, Fontes EPB.** 2016. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, mcw200.

**Calvo M, Martínez-Turiño S, García JA.** 2014. Resistance to *Plum pox virus* strain C in *Arabidopsis thaliana* and *Chenopodium foetidum* involves Genome-Linked viral protein and other viral determinants and might depend on compatibility with host translation initiation factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 1291-301.

**Camborde L, Planchais S, Tournier V, Jakubiec A, Drugeon G, Lacassagne E, Pflieger S, Chenon M, Jupin I.** 2010. The ubiquitin-proteasome system regulates the accumulation of *Turnip yellow mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase during viral infection. *The Plant cell* **22**, 3142-52.

**Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G.** 2006. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin* **36**, 202-204.

**Canto T, Aranda MA, Fereres A.** 2009. Climate change effects on physiology and population processes of hosts and vectors that influence the spread of hemipteran-borne plant viruses. *Global Change Biology* **15**, 1884-1894.

**Canto T, Cillo F, Palukaitis P.** 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.

**Canto T, Lóopez-Moya JJ, Serra-Yoldi MT, Díaz-Ruiz SR, López-Abella D.** 1995. Different Helper Component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of *Potato Virus Y*. *Phytopathology* **85**, 1519-1524.

**Carter AH, Chen XM, Garland-Campbell K, Kidwell KK.** 2009. Identifying QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) in the spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar «Louise». *Theoretical and Applied Genetics* **119**, 1119-1128.

- Carvalho HH, Silva P a., Mendes GC, Brustolini OJB, Pimenta MR, Gouveia BC, Valente M a. S, Ramos HJO, Soares-Ramos JRL, Fontes EPB.** 2014. The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiology* **164**, 654-670.
- Chapman S, Kavanagh T, Baulcombe D.** 1992. *Potato virus X* as a vector for gene expression in plants. *The Plant journal* **2**, 549-557.
- Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja V V., Carrington JC.** 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* **18**, 1179-1186.
- Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, Fauquet CM.** 2005. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiology* **138**, 1828-1841.
- Chen L, Hellmann H.** 2013. Plant E3 ligases: Flexible enzymes in a sessile world. *Molecular Plant* **6**, 1388-1404.
- Chen H-Y, Yang J, Lin C, Yuan YA.** 2008. Structural basis for RNA-silencing suppression by *Tomato aspermy virus* protein 2b. *EMBO reports* **9**, 754-60.
- Cheng X, Wang A.** 2017. The *Potyvirus* silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *Journal of Virology* **91**, 1-16.
- Chini A, Grant JJ, Seki M, Shinozaki K, Loake GJ.** 2004. Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *Plant Journal* **38**, 810-822.
- Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH.** 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.
- Choi CW, Qu F, Ren T, Ye X, Morris TJ.** 2004. RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the Arabidopsis protein TIP. *Journal of General Virology* **85**, 3415-3420.
- Chu M, Desvoyes B, Turina M, Noad R, Scholthof HB.** 2000. Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* **266**, 79-87.
- Chung BY-W, Miller WA, Atkins JF, Firth AE.** 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5897-5902.
- Clarke SM, Cristescu SM, Miersch O, Harren FJM, Wasternack C, Mur LAJ.** 2009. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **182**, 175-187.
- Collmer CW, Marston MF, Taylor JC, Jahn M.** 2000. The I gene of bean: a dosage-dependent allele conferring extreme resistance, hypersensitive resistance, or spreading vascular necrosis in response to the potyvirus *Bean common mosaic virus*. *Molecular plant-microbe interactions* **13**, 1266-1270.

**Csorba T, Kontra L, Burgyán J.** 2015. Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* **479-480**, 85-103.

**Cui X, Wei T, Chowda-Reddy R V., Sun G, Wang A.** 2010. The *Tobacco etch virus* P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* **397**, 56-63.

## D

**Danielson DC, Pezacki JP.** 2013. Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein. *FEBS Letters* **587**, 1198-1205.

**Daszkowska-Golec A, Szarejko I.** 2013. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 1-16.

**Dat JF, Foyer CH, Scott IM.** 1998. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant physiology* **118**, 1455-1461.

**Dawson WO.** 1976. Synthesis of TMV RNA at restrictive high temperatures. *Virology* **73**, 319-326.

**Dawson WO, White JL, Grantham GL.** 1978. Effect of heat treatment upon *Compea Chlorotic mottle virus* ribonucleic acid replication. *Phytopathology* **68**, 1042-1048.

**Delgado D, Ballesteros I, Torres-Contreras J, Mena M, Fenoll C.** 2012. Dynamic analysis of epidermal cell divisions identifies specific roles for COP10 in Arabidopsis stomatal lineage development. *Planta* **236**, 447-461.

**Deng P, Wu Z, Wang A.** 2015. The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virology journal* **12**, 141.

**Devoto A, Ellis C, Magusin A, Chang HS, Chilcott C, Zhu T, Turner JG.** 2005. Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**, 497-513.

**Dielen AS, Badaoui S, Candresse T, German-Retana S.** 2010. The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: A never-ending hide-and-see game. *Molecular Plant Pathology* **11**, 293-308.

**Dielen AS, Sasaki FT, Walter J, et al.** 2011. The 20S proteasome  $\alpha_5$  subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the *Lettuce mosaic potyvirus* HcPro protein. *Molecular Plant Pathology* **12**, 137-150.

**Dinesh-Kumar SP, Tham WH, Baker BJ.** 2000. Structure-function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14789-14794.

**Ding SW, Voinnet O.** 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.

**Donaire L, Barajas D, Martínez-García B, Martínez-Priego L, Pagán I, Llave C.** 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *Journal of virology* **82**, 5167-5177.

**Donaire L, Wang Y, Gonzalez-Ibeas D, Mayer KF, Aranda MA, Llave C.** 2009. Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology* **392**, 203-214.

**van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, et al.** 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* **18**, 1241-6.

**Duan C-G, Fang Y-Y, Zhou B-J, Zhao J-H, Hou W-N, Zhu H, Ding S-W, Guo H-S.** 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.

## E

**Eiamtanasate S, Juricek M, Yap YK.** 2007. C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes* **35**, 611-617.

**Elena SF, Agudelo-Romero P, Carrasco P, Codoñer FM, Martín S, Torres-Barceló C, Sanjuán R.** 2008. Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity* **100**, 478-83.

**Elena SF, Fraile A, García-Arenal F.** 2014. Evolution and emergence of plant viruses. Chapter Three. *Advances in Virus Research* **88**, 161-191.

**Van den Ende W.** 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in plant science* **4**, 1-11.

**Erickson F Les, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C, Baker B.** 1999. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant Journal* **18**, 67-75.

## F

**Fagoaga C, López C, De Mendoza AH, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L.** 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* **60**, 153-165.

**Fernández-Calvino L, Osorio S, Hernández ML, et al.** 2014. Virus-induced alterations in primary metabolism modulate susceptibility to *Tobacco rattle virus* in Arabidopsis. *Plant physiology* **166**, 1821-38.

**Fernández V, Guzmán-Delgado P, Graça J, Santos S, Gil L.** 2016. Cuticle structure in relation to chemical composition: re-assessing the prevailing model. *Front Plant Sci* **7**, 1-14.

**Feys BJB, Benedetti CE, Penfold CN, Turner JG.** 1994. Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male-sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.

**Flor HH.** 1956. Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation. *Science* **124**, 888-889.

- Franks PJ, Drake PL, Beerling DJ.** 2009. Plasticity in maximum stomatal conductance constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell and Environment* **32**, 1737-1748.
- Fu ZQ, Dong X.** 2013. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology* **64**, 839-63.
- Fu X, Ye L, Kang L, Ge F.** 2010. Elevated CO<sub>2</sub> shifts the focus of tobacco plant defences from *Cucumber mosaic virus* to the green peach aphid. *Plant, Cell and Environment* **33**, 2056-2064.
- Fujisaki K, Iwahashi F, Kaido M, Okuno T, Mise K.** 2009. Genetic analysis of a host determination mechanism of bromoviruses in *Arabidopsis thaliana*. *Virus Research* **140**, 103-111.
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 436-442.
- Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.** 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* **124**, 509-525.
- Fukudome A, Fukuhara T.** 2016. Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research*.
- G**
- García-Cano E, Resende RO, Fernández-Muñoz R, Moriones E.** 2006. Synergistic interaction between *Tomato chlorosis virus* and *Tomato spotted wilt virus* results in breakdown of resistance in Tomato. *Phytopathology* **96**, 1263-9.
- García-Marcos A, Pacheco R, Manzano A, Aguilar E, Tenllado F.** 2013. Oxylin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair *Potato virus X-Potato virus Y* and *Tomato spotted wilt virus*. *Journal of Virology* **87**, 5769-83.
- García-Marcos A, Pacheco R, Martiáñez J, González-Jara P, Díaz-Ruiz JR, Tenllado F.** 2009. Transcriptional changes and oxidative stress associated with the synergistic interaction between *Potato virus X* and *Potato virus Y* and their relationship with symptom expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1431-1444.
- García-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, Fahlgren N, Gilbert KB, Takeda A, Giampetruzzi A, García Ruíz MT, McGinn MG, Lowery N, Martínez Badalejo MT, Carrington JC.** 2015. Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS pathogen*, 1-27.
- García-Ruiz H, Takeda A, Chapman EJ, Sullivan CM, Fahlgren N, Brempelis KJ, Carrington JC.** 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**, 481-96.
- García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T.** 2014. *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology* **15**, 226-241.

- Ghoshal B, Sanfaçon H.** 2014. Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology* **456-457**, 188-197.
- Goldstein B.** 1924. Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **51**, 261-273.
- González-Jara P, Atencio FA, Martínez-García B, Barajas D, Tenllado F, Díaz-Ruíz JR.** 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, Tenllado F, Martínez-García B, Atencio FA, Barajas D, Vargas M, Díaz-Ruíz J, Díaz-Ruíz JR.** 2004. Host-dependent differences during synergistic infection by *Potyvirus*s with *Potato virus X*. *Molecular Plant Pathology* **5**, 29-35.
- González I, Martínez L, Rakitina D V, Lewsey MG, Atencio F a, Llave C, Kalinina NO, Carr JP, Palukaitis P, Canto T.** 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, Rakitina D, Semashko M, Taliansky M, Praveen S, Palukaitis P, Carr JP, Kalinina N, Canto T.** 2012. RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of *Cucumber mosaic virus* 2b protein than nuclear localization. *RNA* **18**, 771-782.
- Goodman RN.** 1968. Hypersensitive Reaction in tobacco –A reflection of changes in host cell permeability. *Phytopathology* **58**, 872.
- Gopal A, Egecioglu DE, Yoffe AM, Ben-Shaul A, Rao ALN, Knobler CM, Gelbart WM.** 2014. Viral RNAs are unusually compact. *PLoS ONE* **9**, e105875.
- Goytia E, Fernández-Calvino L, Martínez-García B, López-Abella D, López-Moya JJ.** 2006. Production of *Plum pox virus* HC-Pro functionally active for aphid transmission in a transient-expression system. *Journal of General Virology* **87**, 3413-3423.
- Granum E, Pérez-Bueno ML, Calderón CE, Ramos C, de Vicente A, Cazorla FM, Barón M.** 2015. Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging. *European Journal of Plant Pathology* **142**, 625-632.
- Greenberg JT, Yao N.** 2004. The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 201-211.
- Groen SC, Jiang S, Murphy AM, et al.** 2016. Virus infection of plants alters pollinator preference: a payback for susceptible hosts? *PLoS Pathogens* **12**, 1-28.
- Grube R, Radwanski ER, Jahn MK.** 2000. Comparative analysis of disease resistance within the *Solanaceae*. *Genetics* **155**, 873-887.
- Gunes A, Inal A, Alpaslan M, Eraslan F, Bagci EG, Cicek N.** 2007. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology* **164**, 728-736.

**Gutiérrez D, Morcuende R, Del Pozo A, Martínez-Carrasco R, Pérez P.** 2013. Involvement of nitrogen and cytokinins in photosynthetic acclimation to elevated CO<sub>2</sub> of spring wheat. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1337-1343.

## H

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

**Hamilton AJ.** 1999. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science (New York, NY)* **286**, 950-952.

**Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant cell* **8**, 1773-1791.

**Hammond-Kosack KE, Jones JDG.** 1997. Plant Disease Resistance Genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 575-607.

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

**Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A.** 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant physiology* **154**, 1254-71.

**Harper SJ.** 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology* **4**, 1-18.

**Harrington R, Clark SJ, Welham SJ, Verrier PJ, Denholm CH, Hullé M, Maurice D, Rounsevell MD, Cocu N.** 2007. Environmental change and the phenology of European aphids. *Global Change Biology* **13**, 1550-1564.

**Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S.** 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2122-2127.

**Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I.** 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 855-858.

**Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Hara-Nishimura I.** 2015. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in plant science* **6**, 234.

**Hayat S, Ahmad A, Alyemeni MN.** 2013. Salicylic acid. *Plant growth and development*. Dordrecht Heidelberg New York London: Springer.

**Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A.** 2012. Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior* **7**, 1456-66.

**Heath MC.** 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315-319.

**Hématy K, Cherk C, Somerville S.** 2009. Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 406-413.

**Herranz MC, Niehl A, Rosales M, Fiore N, Zamorano A, Granell A, Pallas V.** 2013. A remarkable synergistic effect at the transcriptomic level in peach fruits doubly infected by prunus necrotic ringspot virus and peach latent mosaic viroid. *Virology journal* **10**, 1-15.

**Herrera-Vásquez A, Salinas P, Holuigue L.** 2015. Salicylic acid and reactive oxygen species in the transcriptional control of defense genes expression. *Frontiers in Plant Science* **6**, 171.

**Higuchi R, Krummel B, Saiki RK.** 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* **16**, 7351-67.

**Huang L, Ren Q, Sun Y, Ye L, Cao H, Ge F.** 2012. Lower incidence and severity of tomato virus in elevated CO<sub>2</sub> is accompanied by modulated plant induced defence in tomato. *Plant Biology* **14**, 905-913.

**Hull R.** 2002. *Matthews' plant virology*. San Diego, California, USA: Academic Press.

## I

**IPCC.** 2013. *Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press.

**Ishibashi K, Naito S, Meshi T, Ishikawa M.** 2009. An inhibitory interaction between viral and cellular proteins underlies the resistance of tomato to nonadapted tobamoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 8778-8783.

## J

**Jada B, Soitamo AJ, Lehto K.** 2013. Organ-specific alterations in tobacco transcriptome caused by the PVX-derived P25 silencing suppressor transgene. *BMC plant biology* **13**, 8.

**Jamous RM, Boonrod K, Fuellgrabe MW, Ali-Shtayeh MS, Krczal G, Wassenegger M.** 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.

**Janda T, Horváth E, Szalai G, Páldi E.** 2007. Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. In *Salicylic Acid: A Plant Hormone*. New York: Springer, 91-150.

**Jaubert M, Bhattacharjee S, Mello AFS, Perry KL, Moffett P.** 2011. ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against *Potato virus X* in Arabidopsis. *Plant physiology* **156**, 1556-64.

**Johnson J.** 1922. The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology* **12**, 438-440.

**Jones RAC.** 2016. Chapter Tree-Future Scenarios for Plant Virus Pathogens as Climate Change Progresses. *Advances in Virus Research* **95**, 87-147.

**Jones JDG, Dangl L.** 2006. The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.

## K

- Kalinina NO, Rakitina DV, Solovyev AG, Schiemann J, Morozov SY.** 2002. RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the Triple Gene Block. *Virology* **296**, 321-329.
- Kang J-H, Wang L, Giri A, Baldwin IT.** 2006. Silencing threonine deaminase and JAR4 in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defenses against *Manduca sexta*. *The Plant cell* **18**, 3303-3320.
- Karyeija RF, Kreuze JF, Gibson RW, Valkonen JPT.** 2000. Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* **269**, 26-36.
- Kazan K, Manners JM.** 2008. Jasmonate signaling: toward an integrated view. *Plant physiology* **146**, 1459-1468.
- Kelley DR, Estelle M.** 2012. Ubiquitin-Mediated control of plant hormone signaling. *Plant Physiology* **160**, 47-55.
- Khan MIR, Fatma M, Per TS, Anjum N a, Khan N a.** 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in plant science* **6**, 462.
- Khokon MAR, Okuma E, Hossain MA, Munemasa S, Uraji M, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y.** 2011. Involvement of extracellular oxidative burst in salicylic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **34**, 434-443.
- Kim B, Masuta C, Matsuura H, Takahashi H, Inukai T.** 2008. Veinal necrosis induced by *Turnip mosaic virus* infection in Arabidopsis is a form of defense response accompanying HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 260-268.
- Komatsu K, Hashimoto M, Maejima K, et al.** 2011. A necrosis-inducing elicitor domain encoded by both symptomatic and asymptomatic *Plantago asiatica mosaic virus* isolates, whose expression is modulated by virus replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 408-420.
- Komatsu K, Hashimoto M, Ozeki J, Yamaji Y, Maejima K, Senshu H, Himeno M, Okano Y, Kagiwada S, Namba S.** 2010. Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 283-293.
- Kramer P, Boyer J.** 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press.
- Kumakura N, Takeda A, Fujioka Y, Motose H, Takano R, Watanabe Y.** 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Letters* **583**, 1261-1266.
- Kumar N, Barua S, Riyesh T, et al.** 2016. Complexities in isolation and purification of multiple viruses from mixed viral infections: Viral interference, persistence and exclusion. *PLoS ONE* **11**, 1-24.
- Künstler A, Bacsó R, Gullner G, Hafez YM, Király L.** 2016. Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **93**, 75-84.

## L

- Lacomme C, Chapman S.** 2005. Use of *Potato Virus X* (PVX)-based vectors for gene expression and Virus-induced gene silencing (VIGS). *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Laliberté J-F, Sanfaçon H, Sanfaçon E.** 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 69-91.
- Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E, Larkindale J., Hall J.D., Knight M.R., E. V.** 2005a. Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* **138**, 882-897.
- Larkindale J, Mishkind M, Vierling E.** 2005b. Plant responses to high temperature. *Plant abiotic stress*. Blackwell Publishing Ltd, 100-144.
- Lawton K, Weymann K, Friedrich L, Vernooij B, Uknes S, Ryals J.** 1995. Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular plant-microbe interactions* **8**, 863-70.
- Lee W-S, Fu S-F, Verchot-Lubicz J, Carr JP.** 2011. Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid-induced resistance to *Potato virus X*. *BMC plant biology* **11**, 41.
- Lee J, Nam J, Park HC, et al.** 2007. Salicylic acid-mediated innate immunity in Arabidopsis is regulated by SIZ1 SUMO E3 ligase. *Plant Journal* **49**, 79-90.
- De León IP, Sanz A, Hamberg M, Castresana C.** 2002. Involvement of the Arabidopsis alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *The Plant Journal* **29**, 61-72.
- Levitt J.** 1972. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic Press.
- Levy M, Edelbaum O, Sela I.** 2004. *Tobacco mosaic virus* regulates the expression of its own resistance gene N 1. *Plant physiology* **135**, 2392-2397.
- Lewsey MG, Murphy AM, Maclean D, et al.** 2010. Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Molecular plant-microbe interactions* **23**, 835-45.
- Li YI, Cheng YM, Huang YL, Tsai CH, Hsu YH, Meng M.** 1998. Identification and characterization of the *Escherichia coli*-expressed RNA-dependent RNA polymerase of *Bamboo mosaic virus*. *Journal of virology* **72**, 10093-10099.
- Li W, Cui X, Meng Z, Huang X, Xie Q, Wu H, Jin H, Zhang D, Liang W.** 2012. Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and ARGONAUTE1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiology* **158**, 1279-1292.
- Li HW, Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ji LH, Wong SM, Ding SW.** 1999. Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO Journal* **18**, 2683-2691.
- Li R, Tee C-S, Jiang Y-L, Jiang X-Y, Venkatesh PN, Sarojam R, Ye J.** 2015. A terpenoid phytoalexin plays a role in basal defense of *Nicotiana benthamiana* against *Potato virus X*. *Scientific Reports* **5**, 9682.

- Linnik O, Liesche J, Tilsner J, Oparka KJ.** 2013. Unraveling the structure of viral replication complexes at super-resolution. *Frontiers in plant science* **4**, 6.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR.** 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**, 387-396.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP.** 2002a. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Journal* **30**, 415-429.
- Liu Y, Schiff M, Serino G, Deng X-W, Dinesh-Kumar SP.** 2002b. Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *The Plant cell* **14**, 1483-96.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* **25**, 402-408.
- Llave C.** 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in Plant Science* **15**, 701-707.
- Llave C.** 2016. Dynamic cross-talk between host primary metabolism and viruses during infections in plants. *Current Opinion in Virology* **19**, 50-55.
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J.** 2008. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - Mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**, 732-737.
- Luna AP, Morilla G, Voinnet O, Bejarano ER.** 2012. Functional analysis of gene-silencing suppressors from Tomato yellow Leaf Curl Disease Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1294-1306.
- Lyzenga WJ, Stone SL.** 2012. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. *Journal of Experimental Botany* **63**, 599-616.
- M**
- Ma X, Nicole MC, Meteignier LV, Hong N, Wang G, Moffett P.** 2015. Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *Journal of Experimental Botany* **66**, 919-932.
- Madsen E.** 1973. Effect of CO<sub>2</sub>-concentration on the morphological, histological and cytological changes in tomato plants. *Acta Agriculturae Scandinavica* **23**, 241-246.
- Maia IG, Bernardi F.** 1996. Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed *Potato virus Y* Helper Component-proteinase. *Journal of General Virology* **77**, 869-877.
- Malcuit I, Marano MR, Kavanagh TA, De Jong W, Forsyth A, Baulcombe DC.** 1999. The 25-kDa movement protein of PVX elicits Nb-mediated hypersensitive cell death in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 536-543.
- Mallory AC, Parks G, Endres MW, Baulcombe D, Bowman LH, Pruss GJ, Vance VB.** 2002. The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants. *Nature biotechnology* **20**, 622-625.
- Mallory A, Vaucheret H.** 2010. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell* **22**, 3879-89.

- Malpica JM, Sacristán S, Fraile A, García-Arenal F.** 2006. Association and host selectivity in multi-host pathogens (A Buckling, Ed.). *PLoS ONE* **1**, e41.
- Marano MR, Malcuit I, De Jong W, Baulcombe DC.** 2002. High-resolution genetic map of Nb, a gene that confers hypersensitive resistance to *Potato virus X* in *Solanum tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics* **105**, 192-200.
- Matros A, Amme S, Kettig B, Buck-Sorlin GH, Sonnewald U, Mock H-P.** 2006. Growth at elevated CO<sub>2</sub> concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *Potato virus Y*. *Plant, Cell and Environment* **29**, 126-137.
- McElrone AJ, Hamilton JG, Krafnick AJ, Aldea M, Knepp RG, DeLucia EH.** 2010. Combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and natural climatic variation on leaf spot diseases of redbud and sweetgum trees. *Environmental Pollution* **158**, 108-114.
- Meldau S, Baldwin IT, Wu J.** 2011. For security and stability: SGT1 in plant defense and development. *Plant signaling & behavior* **6**, 1479-82.
- Mérai Z, Kerényi Z, Kertész S.** 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant strategy to suppress RNA silencing. **80**, 5747-5756.
- Merlot S, Mustilli A-C, Genty B, North H, Lefebvre V, Sotta B, Vavasseur A, Giraudat J.** 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal* **30**, 601-9.
- Mermigka G, Verret F, Kalantidis K.** 2016. RNA silencing movement in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**, 328-342.
- Mhamdi A, Noctor G.** 2016. High CO<sub>2</sub> primes plant biotic stress defences through redox-linked pathways. *Plant physiology* **172**, 929-942.
- Mi S, Cai T, Hu Y, et al.** 2008. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute complexes is directed by the 5' terminal Nucleotide. *Cell* **133**, 116-127.
- Misra N, Saxena P.** 2009. Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science* **177**, 181-189.
- Miura K, Okamoto H, Okuma E, Shiba H, Kamada H, Hasegawa PM, Murata Y.** 2013. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **73**, 91-104.
- Moffett P.** 2009. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. Elsevier.
- Moffett P.** 2016. Using decoys to detect pathogens: an integrated approach. *Trends in Plant Science* **21**, 369-370.
- Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O.** 2007. Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* **13**, 1268-78.

- Molnár A, Csorba T, Lakatos L, Várallyay E, Lacomme C, Burgyán J.** 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of virology* **79**, 7812-8.
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC.** 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science (New York, N.Y.)* **328**, 872-875.
- Montillet J, Chamnongpol S, Rustérucchi C, Dat J, van de Cotte B, Agnel J-P, Battesti C, Inzé D, van Breusegem F, Triantaphylidès C.** 2005. Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**, 1516-1526.
- Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L.** 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular plant pathology* **9**, 251-68.
- Morozov SY, Solovyev AG.** 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* **84**, 1351-1366.
- Mosblech A, Feussner I, Heilmann I.** 2009. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**, 511-517.
- Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, et al.** 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**, 533-542.
- Muñoz-Espinoza V a., López-Climent MF, Casaretto J a., Gómez-Cadenas A.** 2015. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. *Frontiers in Plant Science* **6**, 1-14.
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C.** 2006. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant physiology* **140**, 249-62.
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E.** 2008. The hypersensitive response; The centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**, 501-520.
- Murphy JF, Bowen KL.** 2006. Synergistic disease in pepper caused by the mixed Infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. *Phytopathology* **96**, 240-247.
- Murphy AM, Gilliland A, York CJ, Hyman B, Carr JP.** 2004. High-level expression of alternative oxidase protein sequences enhances the spread of viral vectors in resistant and susceptible plants. *Journal of General Virology* **85**, 3777-3786.
- Murray RR, Emblow MSM, Hetherington AM, Foster GD.** 2016. Plant virus infections control stomatal development. *Scientific reports* **6**, 34507.

## N

**Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T.** 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering* **104**, 34-41.

**Nausch H, Mikschofsky H, Koslowski R, Meyer U, Broer I, Huckauf J.** 2012. High-Level Transient Expression of ER-Targeted Human Interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* **7**.

**Németh M, Janda T, Horváth E, Páldi E, Szalai G.** 2002. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize. *Plant Science* **162**, 569-574.

**Newman M-A, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G.** 2013. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science* **4**, 139.

**Niehl A, Wyrsh I, Boller T, Heinlein M.** 2016. Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytologist* **211**, 1008-1019.

**Nieto C, Rodríguez-Moreno L, Rodríguez-Hernández AM, Aranda MA, Truniger V.** 2011. *Nicotiana benthamiana* resistance to non-adapted Melon necrotic spot virus results from an incompatible interaction between virus RNA and translation initiation factor 4E. *Plant Journal* **66**, 492-501.

**Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S.** 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, 1251-1263.

## O

**Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, et al.** 2014. In planta recognition of a double-stranded RNA Synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor. *The Plant cell* **26**, 2168-2183.

**Okuma E, Nozawa R, Murata Y, Miura K.** 2014. Accumulation of endogenous salicylic acid confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* **9**, e280851-4.

**Olson AJ.** 1990. Effects of drought stress and infection by *Maize dwarf mosaic virus* on sweet Corn. *Plant Disease* **74**, 147-151.

**Olsper A, Chung BY-W, Atkins JF, Carr JP, Firth AE.** 2015. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. *EMBO reports* **16**, 995-1004.

**Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP.** 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science* **5**, 86.

**Osorio S, Vallarino JG, Szecowka M, Ufaz S, Tzin V, Angelovici R, Galili G, Fernie AR.** 2013. Alteration of the interconversion of pyruvate and malate in the plastid or cytosol of ripening tomato fruit invokes diverse consequences on sugar but similar effects on cellular organic acid, metabolism, and transitory starch accumulation. *Plant Physiology* **161**, 628-643.

**Ozeki J, Takahashi S, Komatsu K, Kagiwada S, Yamashita K, Mori T, Hirata H, Yamaji Y, Ugaki M, Namba S.** 2006. A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. Archives of Virology **151**, 2067-2075.

## P

**Pacheco R.** 2014. Caracterización de la necrosis sistémica inducida por la interacción sinérgica entre el Virus X de la patata y potyvirus en *Nicotiana benthamiana* (TESIS). Departamento de Biotecnología. E.T.S. de Ingenieros Agrónomos-Universidad Politécnica de Madrid. Madrid.

**Pacheco R, García-Marcos A, Manzano A, de Lacoba MG, Camañes G, García-Agustín P, Díaz-Ruíz JR, Tenllado F.** 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.

**Palukaitis P, Carr JP.** 2008. Plant resistance responses to viruses. Journal of Plant Pathology **90**, 153-171.

**Park M-R, Jeong R-D, Kim K-H.** 2014. Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. Frontiers in plant science **5**, 60.

**Park MR, Seo JK, Kim KH.** 2013. *Viral and Nonviral Elements in Potexvirus Replication and Movement and in Antiviral Responses*. Elsevier Inc.

**Pasin F, Simón-Mateo C, García JA.** 2014. The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. PLoS Pathogens **10**.

**Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC.** 2002. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against *Tobacco mosaic virus*. Plant Journal **29**, 569-579.

**Pérez-Bueno ML, Granum E, Pineda M, Flors V, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E, Barón M.** 2016. Temporal and spatial resolution of activated plant defense responses in leaves of *Nicotiana benthamiana* infected with *Dickeya dadantii*. Frontiers in Plant Science **6**, 1-13.

**Pérez-Bueno ML, Pineda M, Díaz-Casado E, Barón M.** 2015. Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. Physiologia Plantarum **153**, 161-174.

**Petutschnig EK, Stolze M, Lipka U, et al.** 2014. A novel Arabidopsis CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. New Phytologist **204**, 955-967.

**Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V.** 2002. P0 of *Beet Western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. Journal of virology **76**, 6815-6824.

**Pineda M, Soukupová J, Matouš K, Nedbal L, Barón M.** 2008. Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. Photosynthetica **46**, 441-451.

**Prasch CM, Sonnewald U.** 2013. Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant physiology* **162**, 1849-66.

**Prior SA, Runion GB, Marble SC, Rogers HH, Gilliam CH, Torbert HA.** 2011. A review of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> effects on plant growth and water relations: implications for horticulture. *HortScience* **46**, 158-162.

**Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Bowman Vance V.** 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.

**Pumplin N, Voinnet O.** 2013. RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 745-60.

## Q

**Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente TE, Morris TJ.** 2005. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology* **79**, 15209-15217.

**Qu F, Ye X, Morris TJ.** 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.

## R

**Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM.** 2008. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *Journal of virology* **82**, 8997-9007.

**Rajamäki M-L, Streng J, Valkonen JP.** 2014. Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Molecular plant-microbe interactions* **970650**, 1-55.

**Rajput NA, Zhang M, Shen D, Liu T, Zhang Q, Ru Y, Sun P, Dou D.** 2015. Overexpression of a phytophthora cytoplasmic CRN effector confers resistance to disease, salinity and drought in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2423-2435.

**Ramegowda V, Senthil-Kumar M.** 2015. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *Journal of Plant Physiology* **176**, 47-54.

**Ramesh SV, Ratnaparkhe MB, Kumawat G, Gupta GK, Husain SM.** 2014. Plant miRNAome and antiviral resistance: A retrospective view and prospective challenges. *Virus Genes* **48**, 1-14.

**Reichel C, Beachy RN.** 2000. Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J. Virol.* **74**, 3330-3337.

**Reis PAB, Fontes EPB.** 2012. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant signaling & behavior* **7**, 628-32.

- Restrepo MA, Freed DD, Carrington J c.** 1990. Nuclear transport of plant potyviral proteins. *The Plant cell* **2**, 987-998.
- Revers F, García JA.** 2015. *Molecular biology of potyviruses*. Elsevier Inc.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA.** 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**, 1-16.
- Rogers K, Chen X.** 2013. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* **25**, 2383-99.
- Rogers HH, Dahlman RC.** 1993. Crop responses to CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Ecology* **104**, 117-131.
- de Ronde D, Pasquier A, Ying S, Butterbach P, Lohuis D, Kormelink R.** 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.
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW.** 2001. Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant Journal* **26**, 421-433.
- Roossinck MJ.** 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 99-108.
- Roossinck MJ.** 2015. Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* **479-480**, 271-277.
- Ruiz-Ferrer V, Boskovic J, Alfonso C, Rivas G, Llorca O, López-Abella D, López-Moya JJ.** 2005. Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *Journal of virology* **79**, 3758-3765.
- Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, et al.** 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36446-36455.
- S**
- Sade D, Sade N, Shriki O, et al.** 2014. Water balance, hormone homeostasis, and sugar signaling are all involved in tomato resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant physiology* **165**, 1684-1697.
- Saidi Y, Finka A, Muriset M, Bromberg Z, Weiss YG, Maathuis FJM, Goloubinoff P.** 2009. The heat shock response in moss plants is regulated by specific Calcium-permeable channels in the plasma membrane. *The Plant Cell* **21**, 2829-2843.
- Samach A, Hareven D, Gutfinger T, Ken-Dror S, Lifschitz E.** 1991. Biosynthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 2678-2682.
- Samuel G.** 1931. Some experiments on inoculating methods with plant viruses, and on local lesions. *Annals of Applied Biology* **18**, 494-507.

- Sánchez G, Gerhardt N, Siciliano F, Vojnov A, Malcuit I, Marano MR.** 2010. Salicylic acid is involved in the Nb-mediated defense responses to *Potato virus X* in *Solanum tuberosum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 394-405.
- Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R.** 2010. Viral mutation rates. *Journal of Virology* **84**, 9733-9748.
- Sastry SK, Zitter TA.** 2014. Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics. In: Springer D, ed. *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*, Vol.2.149-480.
- Scholthof HB.** 2006. The Tombusvirus-encoded p19: from irrelevance to elegance. *Nature reviews Microbiology* **4**, 405-411.
- Scholthof HB, Alvarado VY, Vega-Arreguin JC, Ciomperlik J, Odokonyero D, Brosseau C, Jaubert M, Zamora A, Moffett P.** 2011. Identification of an ARGONAUTE for antiviral RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant physiology* **156**, 1548-1555.
- Scholthof HB, Scholthof KB, Jackson AO.** 1995. Identification of *Tomato bushy stunt virus* host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a *Potato virus X* vector. *The Plant Cell* **7**, 1157-1172.
- Schreinemachers P, Balasubramaniam S, Boopathi NM, Ha CV, Kenyon L, Praneetvatakul S, Sirijinda A, Le NT, Srinivasan R, Wu MH.** 2015. Farmers' perceptions and management of plant viruses in vegetables and legumes in tropical and subtropical Asia. *Crop Protection* **75**, 115-123.
- Schwartz M, Chen J, Janda M, Sullivan M, Den Boon J, Ahlquist P.** 2002. A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids. *Molecular Cell* **9**, 505-514.
- Schwechheimer C.** 2004. The COP9 signalosome (CSN): An evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1695**, 45-54.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K.** 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 296-302.
- Sempere RN, Gomez-Aix C, Ruiz-Ramon F, Gomez P, Hasiów-Jaroszewska B, Sánchez Pina MA, Aranda MA.** 2015. *Pepino mosaic virus* RdRp-POL domain is a HR-like elicitor shared by necrotic and mild isolates. *Phytopathology* **106**, 395-406.
- Senaratna T, Touchell D, Bunn E, Dixon K.** 2000. Acetyl salicylic acid (Asprin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* **30**, 157-161.
- Senshu H, Ozeki J, Komatsu K, Hashimoto M, Hatada K, Aoyama M, Kagiwada S, Yamaji Y, Namba S.** 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.
- Seo JK, Kang SH, Seo BY, Jung JK, Kim KH.** 2010. Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of *Soybean mosaic virus* involved in aphid transmission. *Molecular Plant Pathology* **11**, 265-276.

- Seo Y-S, Rojas MR, Lee J-Y, Lee S-W, Jeon J-S, Ronald P, Lucas WJ, Gilbertson RL.** 2006. A viral resistance gene from common bean functions across plant families and is up-regulated in a non-virus-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11856-61.
- Seyfferth C, Tsuda K.** 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science* **5**, 697.
- Sharma M, Laxmi A.** 2016. Jasmonates: emerging players in controlling temperature stress tolerance. *Frontiers in plant science* **6**, 1129.
- Shaw JG.** 1999. *Tobacco mosaic virus* and the study of early events in virus infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **354**, 603-611.
- Shi XM, Miller H, Verchot J, Carrington JC, Vance VB.** 1997. Mutations in the region encoding the central domain of Helper Component-proteinase (HC-Pro) eliminate Potato virus X/potyviral synergism. *Virology* **231**, 35-42.
- Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham S a, Gaba V, Gal-On A.** 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**, 13135-48.
- Shirasu K.** 2009. The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annual review of plant biology* **60**, 139-164.
- Simmons HE, Dunham JP, Zinn KE, Munkvold GP, Holmes EC, Stephenson AG.** 2013. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, Potyvirus): Vertical transmission, seed infection and cryptic infections. *Virus Research* **176**, 259-264.
- Sochor J, Babula P, Adam V, Krska B, Kizek R.** 2012. Sharka: The past, the present and the future. *Viruses* **4**, 2853-2901.
- Solovyev AG, Kalinina NO, Morozov SY.** 2012. Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block. *Frontiers in plant science* **3**, 276.
- Sorel M, Garcia J a, German-Retana S.** 2014. The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein. *Molecular plant-microbe interactions* **27**, 215-26.
- Spoel SH, Dong X.** 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature reviews. Immunology* **12**, 89-100.
- Srinivasan R, Álvarez JM.** 2007. Effect of mixed viral infections (*Potato virus Y-Potato leafroll virus*) on biology and preference of vectors *Myzus persicae* and *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: *Aphididae*). *Journal of economic entomology* **100**, 646-655.
- Strange RN, Scott PR.** 2005. Plant disease: A threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 83-116.
- Sugawara K, Shiraishi T, Yoshida T, Fujita N, Netsu O, Yamaji Y, Namba S.** 2013. A replicase of Potato virus X acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. *Molecular plant-microbe interactions* **26**, 1106-12.

**Sun Y, Guo H, Ge F, Michael J, Ryalls W.** 2016. Plant – Aphid interactions under elevated CO<sub>2</sub>: some cues from aphid feeding behavior. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1-10.

**Sun Y, Guo H, Zhu-Salzman K, Ge F.** 2013. Elevated CO<sub>2</sub> increases the abundance of the peach aphid on *Arabidopsis* by reducing jasmonic acid defenses. *Plant Science* **210**, 128-140.

**Syller J.** 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* **13**, 204-216.

**Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas Á, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J.** 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal* **22**, 633-640.

## T

**Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K.** 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **29**, 417-426.

**Takács A, Horváth J, Gáborjányi R, Kazinczi G, Mikulás J.** 2014. Hosts and non-hosts in plant virology and the effects of plant viruses on host plants. Elsevier.

**Takahashi H, Kanayama Y, Zheng MS, Kusano T, Hase S, Ikegami M, Shah J.** 2004. Antagonistic interactions between the SA and JA signaling pathways in *Arabidopsis* modulate expression of defense genes and gene-for-gene resistance to cucumber mosaic virus. *Plant and Cell Physiology* **45**, 803-809.

**Tena Fernández F, González I, Doblás P, Rodríguez C, Sahana N, Kaur H, Tenllado F, Praveen S, Canto T.** 2013. The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of Potato virus Y helper-component proteinase (HCPro) in heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Molecular Plant Pathology* **14**, 530-541.

**Teng N, Wang J, Chen T, Wu X, Wang Y, Lin J.** 2006. Elevated CO<sub>2</sub> induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* **172**, 92-103.

**Tenllado F, Díaz-Ruiz JR.** 2001. Double-Stranded RNA-Mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology* **75**, 12288-12297.

**Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK.** 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science* **17**, 260-270.

**Tilsner J, Linnik O, Wright KM, Bell K, Roberts a. G, Lacomme C, Santa Cruz S, Oparka KJ.** 2012. The TGB1 Movement Protein of Potato virus X Reorganizes Actin and Endomembranes into the X-Body, a Viral Replication Factory. *Plant Physiology* **158**, 1359-1370.

**Del Toro FJ, Aguilar E, Hernández-Walias FJ, Tenllado F, Chung BN, Canto T.** 2015. High temperature, high ambient CO<sub>2</sub> affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS ONE* **10**, 1-18.

**Del Toro F, Tenllado F, Chung BN, Canto T.** 2014. A procedure for the transient expression of genes by agroinfiltration above the permissive threshold to study temperature-sensitive processes in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology* **15**, 848-857.

**Torres MA.** 2010. ROS in biotic interactions. *Physiologia plantarum* **138**, 414-29.

**Torres MA, Jones JDG, Dangl JL.** 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology* **141**, 373-378.

**Trebicki P, Nancarrow N, Cole E, Bosque-Pérez NA, Constable FE, Freeman AJ, Rodoni B, Yen AL, Luck JE, Fitzgerald GJ.** 2015. Virus disease in wheat predicted to increase with a changing climate. *Global Change Biology* **21**, 3511-3519.

**Tripp KE, Peet MM, Willits DH, Pharr DM.** 1991. CO<sub>2</sub>-enhanced foliar deformation of tomato - relationship to foliar starch concentration. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **116**, 876-880.

**Turner JG, Ellis C, Devoto A.** 2002. The jasmonate signal pathway. *The Plant cell* **14** Suppl, S153-S164.

## U

**Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al.** 2013. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature genetics* **45**, 1097-102.

**Uhrig JF, Canto T, Marshall D, MacFarlane S a.** 2004. Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the tomato bushy stunt virus P19 pathogenicity protein. *Plant physiology* **135**, 2411-23.

**Urcuqui-Inchima S, Maia IG, Arruda P, Haenni a L, Bernardi F.** 2000. Deletion mapping of the potyviral helper component-proteinase reveals two regions involved in RNA binding. *Virology* **268**, 104-111.

## V

**Valli A, Gallo A, Calvo M, Perez JDJ, Garcia JA.** 2014. A novel role of the potyviral Helper Component proteinase contributes to enhance the yield of viral particles. *Journal of Virology* **88**, 9808-9818.

**Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA.** 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**, 10055-63.

**Vance VB.** 1991. Replication of *Potato Virus X* RNA is altered in coinfections with *Potato Virus Y*. *Virology* **182**, 486-494.

**Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Ming Shi X.** 1995. 5' Proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* **206**, 583-590.

**Várallyay É, Havelda Z.** 2013. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Molecular Plant Pathology* **14**, 567-575.

- Várallyay É, Oláh E, Havelda Z.** 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, Válóczy A, Agyi A, Burgyán J, Havelda Z.** 2010. Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* **29**, 3507-19.
- Vasquez-Robinet C, Mane SP, Ulanov A V., et al.** 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2109-2123.
- Vaucheret H, Fagard M.** 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics* **17**, 29-35.
- Verchot J.** 2014. The ER quality control and ER associated degradation machineries are vital for viral pathogenesis. *Frontiers in plant science* **5**, 66.
- Verchot-Lubicz J, Ye CM, Bamunusinghe D.** 2007. Molecular biology of potexviruses: Recent advances. *Journal of General Virology* **88**, 1643-1655.
- Verchot J, Angell SM, Baulcombe DC.** 1998. In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs. *Journal of virology* **72**, 8316-8320.
- Verchot J, Carrington JC.** 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of virology* **69**, 3668-3674.
- Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L.** 2009. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *International Journal of Developmental Biology* **53**, 245-257.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK.** 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* **45**, 523-539.
- Verslues P. E, Zhu J-K.** 2005. Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society transactions* **33**, 375-379.
- Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA.** 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathogens* **8**.
- Vogler H, Akbergenov R, Shivaprasad P V, Dang V, Fasler M, Kwon M-O, Zhanybekova S, Hohn T, Heinlein M.** 2007. Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by *Tobamovirus* replicase protein. *Journal of Virology* **81**, 10379-10388.
- Voinnet O.** 2008. Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 464-470.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC.** 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* **103**, 157-167.

**Vollenweider P, Günthardt-Goerg MS.** 2005. Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* **137**, 455-465.

## W

**Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR.** 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* **61**, 199-223.

**Wale S, Platt B, Cattlin ND.** 2008. Diseases, pests and disorders of potatoes: a colour handbook. London: Manson Publishing Ltd.

**Waner JL.** 1994. Mixed viral infections: detection and management. *Clinical Microbiology Reviews* **7**, 143-151.

**Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J.** 2009. Analysis of temperature modulation of plant defense against biotrophic microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 498-506.

**Wang K Der, Empleo R, Nguyen TT V, Moffett P, Sacco MA.** 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 Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A.** 2002. Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and Potyviruses in cucurbit Hosts. *Phytopathology* **92**, 51-58.

**Wang D, Maule A.** 1994. A model for seed transmission of a plant virus: genetic and structural analyses of pea embryo invasion by *Pea seed-borne mosaic virus*. *The Plant cell* **6**, 777-787.

**Wang SD, Zhu F, Yuan S, et al.** 2011. The roles of ascorbic acid and glutathione in symptom alleviation to SA-deficient plants infected with RNA viruses. *Planta* **234**, 171-181.

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

**Wei T, Zhang C, Hou X, Sanfaçon H, Wang A.** 2013. The SNARE protein Syp71 is essential for *Turnip mosaic virus* infection by mediating fusion of virus-induced vesicles with chloroplasts. *PLoS Pathogens* **9**.

**Wen RH, Hajimorad MR.** 2010. Mutational analysis of the putative pipo of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1-7.

**Westwood JH, Mccann L, Naish M, Dixon H, Murphy AM, Stancombe MA, Bennett MH, Powell G, Webb AAR, Carr JP.** 2013. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **14**, 158-170.

**Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B.** 1994. The product of the *Tobacco mosaic virus* resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.

**Whitham S, McCormick S, Baker B.** 1996. The N gene of tobacco confers resistance to *Tobacco mosaic virus* in transgenic tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8776-8781.

**Whitham S a, Yang C, Goodin MM.** 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular plant-microbe interactions* **19**, 1207-1215.

**Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM.** 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.

**Wright KM, Duncan GH, Pradel KS, Carr F, Wood S, Oparka KJ, Cruz SS.** 2000. Analysis of the N gene hypersensitive response induced by a fluorescently tagged *Tobacco mosaic virus*. *Plant physiology* **123**, 1375-86.

## X

**Xie Z, Fan B, Chen C, Chen Z.** 2001. An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6516-6521.

**Xu P, Chen F, Mannas JP, Feldman T, Sumner LW, Roossinck MJ.** 2008. Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* **180**, 911-921.

**Xu P, Roossinck MJ.** 2000. *Cucumber mosaic virus D* satellite RNA-induced programmed cell death in tomato. *The Plant cell* **12**, 1079-92.

**Xu Z, Zhou G, Shimizu H.** 2010. Plant responses to drought and rewatering. *Plant signaling & behavior* **5**, 649-54.

## Y

**Yamaji Y, Maejima K, Ozeki J, et al.** 2012. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell* **24**, 778-793.

**Yan F, Lu Y, Lin L, Zheng H, Chen J.** 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**, 1-10.

**Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X.** 2006. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research* **34**, 667-675.

**Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y, et al.** 2008. Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid – Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis. *The Plant cell* **20**, 1678-1692.

**Ye CM, Chen S, Payton M, Dickman MB, Verchot J.** 2013. TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. *Molecular Plant Pathology* **14**, 241-255.

**Ye C, Dickman MB, Whitham SA, Payton M, Verchot J.** 2011. The Unfolded Protein Response is triggered by a plant viral movement protein. *Plant Physiology* **156**, 741-755.

**Ying X-B, Dong L, Zhu H, Duan C-G, Du Q-S, Lv D-Q, Fang Y-Y, Garcia JA, Fang R-X, Guo H-S.** 2010. RNA-dependent RNA polymerase 1 from *Nicotiana tabacum* suppresses RNA silencing and enhances viral infection in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant cell* **22**, 1358-72.

**Yu D, Fan B, MacFarlane S a, Chen Z.** 2003. Analysis of the involvement of an inducible Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase in antiviral defense. *Molecular plant-microbe interactions* **16**, 206-216.

## Z

**Zandalinas SI, Rivero RM, Martínez V, Gómez-Cadenas A, Arbona V.** 2016. Tolerance of citrus plants to the combination of high temperatures and drought is associated to the increase in transpiration modulated by a reduction in abscisic acid levels. *BMC plant biology* **16**, 105.

**Zeng R, Liao Q, Feng J, Li D, Chen J.** 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.

**Zhang J, Dong J, Xu Y, Wu J.** 2012. V2 protein encoded by *Tomato yellow leaf curl China virus* is an RNA silencing suppressor. *Virus Research* **163**, 51-58.

**Zhang XS, Holt J.** 2001. Mathematical models of cross protection in the epidemiology of plant-virus diseases. *Phytopathology* **91**, 924-934.

**Zhang S, Li X, Sun Z, Shao S, Hu L, Ye M, Zhou Y, Xia X, Yu J, Shi K.** 2015. Antagonism between phytohormone signalling underlies the variation in disease susceptibility of tomato plants under elevated CO<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* **66**, 1951-1963.

**Zhang L, Wang A.** 2012. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. *Frontiers in Plant Science* **3**, 293.

**Zhang X, Yuan YR, Pei Y, Lin SS, Tuschl T, Patel DJ, Chua NH.** 2006. *Cucumber mosaic virus*-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes and Development* **20**, 3255-3268.

**Zhong S-H, Liu J-Z, Jin H, et al.** 2013. Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 9171-9176.

**Zhu Y, Qian W, Hua J.** 2010. Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS pathogens* **6**, e1000844.

**Zinn KE, Tunc-Ozdemir M, Harper JF.** 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1959-1968.

**Zorzatto C, Machado JPB, Lopes KVG, et al.** 2015. NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* **0**, 1-19.

**Zvereva AS, Pooggin MM.** 2012. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* **4**, 2578-2597.