

RESUMEN

Los virus de plantas son los agentes causales de un gran número de enfermedades en plantas que ocasionan grandes pérdidas económicas. El virus de las manchas necróticas del melón (MNSV), es un pequeño virus de RNA monocatenario de polaridad positiva, perteneciente al género *Gammacarmovirus*, cuyo genoma codifica cinco proteínas. La proteína de cubierta (CP, del inglés “coat protein”), está formada por tres dominios distintos. El dominio R es el responsable de la unión a distintas moléculas de RNA y se puede dividir en dos subdominios: R₁ y R₂. Este dominio está conectado con el dominio S mediante la región “arm”, que también forma parte del dominio de unión al RNA. La función principal del dominio S es la de protección y transmisión del genoma al formar viriones. Le sigue el dominio P, que es el sitio de interacción con las zoosporas del hongo vector. El descubrimiento de un péptido de transito dual en la región amino-terminal de la CP fue el punto de partida de esta tesis. Al inicio de una infección por MNSV, la CP nuevamente sintetizada es transportada al interior de cloroplastos y mitocondrias mientras que, una parte mucho menor se mantiene en el citoplasma aumentando a medida que avanza la infección. La inhibición de este transporte dual conlleva un aumento de la actividad supresora del silenciamiento del RNA de la CP. Sin embargo, lejos de provocar una mayor infección, la infección sistémica se ve particularmente afectada. Por tanto, la acumulación de la CP en el citoplasma puede provocar un aumento de la replicación viral pero a su vez una sobreexpresión de la p29, una replicasa auxiliar que ocasiona alteraciones morfológicas en las mitocondrias, puede provocar una explosión oxidativa y una necrosis que restringe el movimiento viral. De este modo, el transporte de la CP a los orgánulos podría evitar una replicación viral excesiva mediante la modulación de la actividad supresora para gestionar el equilibrio entre la defensa de la planta y la contradefensa viral favoreciendo una interacción compatible entre ambos.

Desafortunadamente, *Arabidopsis thaliana* no es huésped para el MNSV. Por tanto, para entender mejor el mecanismo molecular que rige el transporte de la CP a estos orgánulos, se identificaron los receptores y los poros de los translocos de las membranas externas de las mitocondrias y los cloroplastos en *Nicotiana benthamiana*, asignándose los siguientes nombres: NbToc75-III, NbToc34, NbToc90, NbToc120,

NbToc159A, NbToc159B, NbTic22-III para componentes del translocón de los cloroplastos, y NbTom40, NbTom20-1, NbTom20-2, NbOm64 para los de mitocondrias. Esta caracterización funcional se realizó principalmente mediante estudios de silenciamiento génico inducido por virus o VIGS y RT-qPCR, que mostró una redundancia funcional mayor que la observada entre los homólogos de Arabidopsis. Además, esta herramienta también se utilizó para evaluar la relevancia de cada componente bajo la infección por MNSV, y junto con los estudios de interacción CP-receptor realizados mediante BiFC y Y2H, nos permitió identificar NbToc159A para cloroplastos y NbOm64 para mitocondrias, como los principales receptores implicados en el transporte de la CP a estos orgánulos. A su vez, el silenciamiento de NbToc34, NbToc75 o NbTom40 resultó en una resistencia generalizada no solo a MNSV sino también al virus del arrugamiento del nabo (TCV) y al virus del moteado del clavel (CarMV), lo que respalda la idea actualmente aceptada y que involucra el estado fisiológico del cloroplasto y la mitocondria en la señalización temprana de la respuesta defensiva.

Finalmente, se realizó una búsqueda de factores del huésped que interaccionasen con la CP mediante la innovadora técnica de marcaje de proximidad con TurboID, una ligasa de biotina, que permite la detección de interacciones tanto directas e indirectas como transitorias y estables. Así, se obtuvo un gran número de proteínas candidatas utilizando la CP de MNSV y su mutante de localización citoplásmica, Δ NtCP. Ocho de las que presentaron un mayor grado de confianza y fueron más relevantes para defensa de las plantas frente a los virus fueron analizadas funcionalmente, de nuevo mediante VIGS. Tres de ellas, NbSIK1, NbSMU2 y NbMAP3K mostraron un efecto perjudicial constante y repetitivo sobre la acumulación del RNA viral. Después de la validación de las interacciones mediante otro método, y el análisis de la localización subcelular de la CP bajo el silenciamiento del interactor correspondiente, se establecieron dos hipótesis principales. En primer lugar, dado que la función principal de NbSMU2 está relacionada con el procesamiento y regulación del RNA mensajero, esta proteína podría ser secuestrada por la CP provocando la expresión de genes provirales. Por otro lado, NbSIK1 y NbMAP3K, actúan como reguladores positivo y negativo de la respuesta PTI a la infección, respectivamente. Además, ambas proteínas interaccionan entre sí y forman parte de la cascada de MAP quinasas, por lo que en nuestra segunda hipótesis, la CP

interaccionaría con este complejo, promoviendo una regulación negativa de la PTI que facilitaría el desarrollo de la infección.

En resumen, el trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido la identificación y el análisis mecanístico y funcional del transporte dual de la CP de MNSV a cloroplastos y mitocondrias. Los resultados obtenidos proporcionan, tanto una descripción extensa de un nuevo mecanismo viral para atenuar las defensas de las plantas, como un estudio prometedor de varios factores del huésped y su implicación en la defensa antiviral.