

RESUMEN

Los virus de plantas provocan importantes pérdidas en el sector agrícola. Comprender su biología es esencial para desarrollar estrategias que permitan hacer frente a estos patógenos. En este sentido, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de las infecciones virales puede contribuir al desarrollo de herramientas biotecnológicas que permitan estudiar y mejorar el rendimiento de los cultivos agrícolas.

Dentro del ciclo viral de los virus de plantas, el transporte hacia las partes distales de la planta a través del tejido vascular, o movimiento sistémico, es un proceso crítico para la distribución de los virus dentro de una planta y su posterior propagación a otros huéspedes. Sin embargo, los aspectos clave de este proceso siguen sin esclarecerse. La proteína de cubierta (CP) desempeña un papel importante en el movimiento a larga distancia del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), pero su función exacta se desconoce. Para profundizar en el conocimiento del movimiento sistémico de AMV, se realizó un experimento de evolución compensatoria utilizando una construcción derivada del RNA3 de AMV que era defectuosa para el transporte sistémico, aunque permitía un transporte limitado célula a célula. En este experimento, ciertos linajes virales recuperaron la capacidad de moverse sistémicamente tras varios pases. El análisis de la progenie viral reveló distintas mutaciones localizadas en la región no traducible del extremo 5' (5'UTR). Los RNAs virales que contenían los extremos 5'UTR evolucionados mostraron una menor afinidad por la CP de AMV y una menor acumulación de partículas virales. Además, los 5'UTR evolucionados facilitaron el movimiento sistémico de una versión del RNA 3 de AMV que expresaba una CP mutada, incapaz de formar partículas virales, sugiriendo que la formación de viriones no es esencial para el transporte sistémico. Por último, el aumento del transporte sistémico se observó también en diferentes variantes del RNA 3 de AMV en las que el gen de la MP se había intercambiado por diferentes MPs de la familia 30K, a pesar de tener una capacidad de encapsidación limitada, reforzando aún más esta hipótesis.

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) es una poderosa herramienta para el estudio funcional de genes en plantas de importancia agrícola. En esta tesis se desarrolló un enfoque novedoso para generar nuevos vectores

VIGS mediante la modificación de las MPs de la familia 30K. Esta familia incluye 20 géneros virales y más de 500 especies, infectando casi todos los cultivos de importancia agronómica. La estrategia consistió en modificar las MPs incorporando secuencias heterólogas de genes diana en sus regiones codificantes. El método se probó con tres virus representativos de la familia 30K: AMV, el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico del tabaco (TMV). Los ensayos, realizados en *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*, permitieron establecer una correlación entre el tamaño del inserto y la eficacia del silenciamiento: los insertos de 45-54 pb consiguieron silenciar el gen de la fitoeno desaturasa (*PDS*) en un 75-90 %, provocando un claro fenotipo de blanqueamiento, mientras que los insertos más pequeños (21-39 pb) mostraron un silenciamiento del ≈ 45 % sin síntomas visibles. Los fragmentos inferiores a 21 pb no indujeron ningún tipo de silenciamiento. Además, se observó que la eficacia del silenciamiento estaba inversamente relacionada con la eficiencia de la encapsidación del virus, destacando la importancia de este proceso en el diseño de vectores VIGS.

La interacción de los factores del hospedador con las proteínas víricas es otro de los aspectos críticos del proceso infeccioso. En este estudio se empleó una estrategia novedosa para identificar factores del hospedador que interactúan con MPs de la familia 30K. Utilizando *Nicotiana tabacum* y la MP de AMV como modelo, se añadieron distintas etiquetas en la secuencia codificante de la MP sin afectar a su funcionalidad. Esta estrategia permitió la identificación de 121 potenciales interactores mediante inmunoprecipitación durante un proceso de infección natural. De estos, se seleccionaron cinco para validar su capacidad de interactuar con la MP de AMV mediante complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC, por sus siglas en inglés): una histona 2B (H2B), una actina, una proteína 14-3-3A, un factor de iniciación eucariota 4A (eIF4A) y una peroxidasa (POX). Los resultados obtenidos sugieren que algunos de estos factores podrían formar parte de complejos multiproteicos asociados a la MP de AMV, mientras que otros interactúan también con MPs de otros virus de la familia 30K, indicando la existencia de interactores comunes en la familia de proteínas de movimiento 30K.

La H2B fue seleccionada para realizar un análisis más profundo debido a su papel emergente en las interacciones planta-patógeno. El estudio reveló que las H2B

interactúa con MPs de diversos géneros virales, incluyendo la familia 30K y las MPs del doble bloque genético. El mapeo de las regiones involucradas en la interacción identificó las regiones N-terminales de ambas proteínas como las responsables de la interacción. El silenciamiento del gen *H2B.1* en *N. benthamiana* provocó una reducción significativa de los títulos virales y un aumento de las hormonas relacionadas con la defensa, incluyendo el ácido salicílico (SA) y el ácido abscísico (ABA). La interrupción de la interacción MP-H2B mediante ensayos de competencia, también redujo los títulos virales, poniendo de relieve su importancia para el desarrollo de la infección. Además, las infecciones virales alteraron la localización nuclear de H2B y los patrones de expresión de variantes específicas de la familia H2B, sugiriendo que ciertas variantes podrían desempeñar roles específicos en la respuesta de las plantas frente a virus.

En conjunto, esta tesis aporta conocimientos relevantes sobre el movimiento sistémico viral, las interacciones entre MPs de la familia 30K y factores del huésped (con especial atención a las H2B), además de presentar una nueva estrategia para el desarrollo de vectores VIGS mediante la modificación de las MPs de la familia 30K. Estos hallazgos podrían tener distintas implicaciones tanto en investigación básica como en investigación aplicada en el sector agrícola, lo que, en última instancia, podría contribuir a la obtención de plantas resistentes a virus.