



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Detección y caracterización del virus meridional del tomate (STV)

TESIS DOCTORAL

LAURA ELVIRA GONZÁLEZ

Dirigida por:

Dr. Luis Galipienso Torregrosa

Marzo 2021

El Doctor D. Luis Galipienso Torregrosa, colaborador adjunto de investigación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “Detección y caracterización del virus meridional del tomate (STV)” realizada por Dña. Laura Elvira González bajo su dirección, constituye su Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, 16 de marzo de 2021.

Luis Galipienso Torregrosa

Índice

Resumen	11
Resum	15
Abstract	19
Abreviaturas	23
Introducción general	
- El cultivo de tomate	30
- Virus de plantas	32
- Evolución de los virus de plantas	35
- Control de las enfermedades producidas por virus	36
- Métodos de detección basados en técnicas moleculares	38
- Interacción virus-hospedador	44
- Mecanismo de defensa de la planta frente a patógenos	
o Respuesta hipersensible	45
o Silenciamiento génico	46
- Interacción entre virus: infecciones múltiples	49
- El virus meridional del tomate	51
Justificación y Objetivos	56
Capítulo 1. Desarrollo de métodos de detección del virus meridional del tomate (STV)	
- Introducción	60
- Resultados	
o 1.1 Detección del STV mediante RT-LAMP	62
o 1.2 Detección y cuantificación del STV mediante RT-qPCR	68
o 1.3 Detección del STV en plantaciones comerciales de tomate, en plántulas distribuidas por viveros y en lotes de semillas de diferentes variedades	72
- Discusión	75
Capítulo 2. Diversidad genética y evolución del virus meridional del tomate (STV)	
- Introducción	81
- Resultados	81

-	Discusión	86
---	-----------------	----

Capítulo 3. Interacción del virus meridional del tomate (STV) con su hospedador, la planta de tomate

-	Introducción	90
-	Resultados	
o	3.1 Estudio de la influencia del STV en la producción de tomate	92
o	3.2 Estudio del efecto de la infección por el STV en la conductividad estomática, fotosíntesis y peso de las plantas de tomate	93
o	3.3 estudio histológico de tejido de tomate infectado con el STV	98
o	3.4 Efecto de la infección por el STV en la acumulación de siRNAs	100
o	3.5 Estudio de la función supresora de silenciamiento génico de la proteína p42 del STV	102
-	Discusión	104

Capítulo 4. Interacción del virus meridional del tomate (STV) con virus agudos del cultivo del tomate

-	Introducción	111
-	Resultados	
o	4.1 Síntomas en plantas de tomate infectadas con el STV, CMV y PepMV en condiciones de infección simple y múltiple	113
o	4.2 Acumulación viral del STV, CMV y PepMV en plantas de tomate en condiciones de infección simple y múltiple	118
o	4.3 Acumulación de siRNAs en plantas de tomate infectadas con el STV, CMV y PepMV en condiciones de infección simple y múltiple	120
-	Discusión	128

Discusión general 135

Conclusiones 143

Materiales y métodos

-	Material vegetal	150
-	Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	151
-	Elaboración de las construcciones para los ensayos de expresión transitoria.....	152

- Agroinfiltración	153
- Purificación de viriones	154
- Análisis de tejidos de tomate mediante microscopia óptica y electrónica	154
- ELISA	155
- Hibridación molecular	155
- Diseño de cebadores y sonda	156
- Retrotranscripción (RT)	157
- PCR convencional	157
- RT-LAMP	158
- RT-qPCR	159
- Elaboración de transcritos y curva patrón para la cuantificación absoluta del virus.....	159
- Análisis estadísticos	160
- Análisis de diversidad genética y de evolución	160
- Análisis de transpiración y fotosíntesis.....	161
- Secuenciación de ácidos nucleicos.....	161
- Separación electroforética de ácidos nucleicos.....	163
Bibliografía	166
Agradecimientos.....	197
Anexos.....	201

Resumen

El virus meridional del tomate (Southern tomato virus, STV) es un virus persistente (género *Amalgavirus*, familia *Amalgaviridae*) que se ha detectado en diversos países, algunos de la Cuenca Mediterránea como España e Italia. Inicialmente, el STV fue asociado a distintos síntomas, principalmente anomalías en la coloración y maduración del fruto de tomate. Sin embargo, la presencia frecuente de virus agudos en las plantas infectadas con el STV y la detección de éste en plantas asintomáticas, ponen en duda su patogenicidad y el impacto que puede tener en el cultivo.

En esta tesis doctoral se han estudiado diversos aspectos de este virus. En primer lugar, se puso a punto la RT-LAMP y la RT-qPCR para la detección específica y sensible del STV. La RT-LAMP permitió reducir costes y simplificar el procedimiento, siendo muy útil para la detección del virus en campo. La RT-qPCR es una técnica muy sensible que nos permitió detectar y cuantificar el STV en distintos tipos de tejidos de tomate, incluyendo semillas individuales. El virus se acumulaba principalmente en las raíces y hojas, y en las semillas se encontraba tanto en cubierta como en embrión, lo que dificulta las tareas de desinfección de las mismas. Se comprobó que las tasas de transmisión por semilla del STV podían alcanzar el 80% y la incidencia en campo del virus era muy elevada en la Comunidad Valenciana y en las Islas Canarias. Los análisis de plántulas de tomate revelaron la presencia del STV en la mayoría de los viveros de la Comunidad Valenciana que se analizaron. La incidencia del STV era mayor en las variedades de tomate comerciales (semillas distribuidas por empresas) que en las locales (generadas por los propios agricultores) tanto en plantas de campo como en las plántulas de viveros y semillas.

Los estudios filogenéticos realizados en este trabajo empleando la región que codifica para la p42 (posible CP) de diferentes aislados del STV mostraron que el virus tenía una baja diversidad genética con una fuerte presión de selección negativa. Además, no había una correlación entre distancia genética del virus y origen geográfico. Esto podía ser debido a una rápida dispersión del virus a través de la comercialización de semillas infectadas y/o a la fuerte presión de selección negativa. En este trabajo se obtuvieron evidencias experimentales de que el STV en condiciones de infección simple no inducía síntomas en la planta, no alteraba la producción, ni afectaba a parámetros fisiológicos importantes como conductividad estomática, fotosíntesis y peso, en condiciones de estrés salino. La observación al microscopio óptico y electrónico no reveló la presencia de partículas virales ni cambios a nivel tisular ni celular asociados a enfermedad. Sin

embargo, el análisis de las poblaciones de siRNAs mostró que el STV era capaz de modificar la expresión de algunos miRNAs con importantes funciones. Se detectaron muy poca cantidad de vsiRNAs derivados del STV, lo cual podría deberse a la supresión del mecanismo de silenciamiento génico de la planta por acción de un supresor (VSR) codificado por el virus. Los ensayos de expresión transitoria en plantas de *Nicotiana benthamiana* 16C para determinar la capacidad supresora de la p42 del STV no revelaron que esta proteína fuera un VSR.

En la última parte de este trabajo estudiamos el efecto que podía tener el STV en infecciones múltiples con otros virus agudos frecuentes como el CMV y el PepMV. Se obtuvieron evidencias experimentales de complejas interacciones entre los virus que implicaban variaciones en la severidad de síntomas, los niveles de acumulación viral y las poblaciones de miRNAs y vsiRNAs. Se observó un sinergismo entre el STV y CMV o PepMV en el grupo de plantas co-infectadas durante las primeras fases de la infección: la presencia del STV provocaba el adelanto de los síntomas inducidos por el CMV, así como el incremento de su severidad y un aumento en la concentración del CMV a los 10 dpi. En el caso de PepMV, la presencia del STV producía un aumento de la severidad de los síntomas a 10 dpi, pero sin cambios en concentración del virus. En el grupo de plantas coinfectadas con el CMV y PepMV se observó un efecto antagónico que disminuía la concentración del CMV, alterándose los síntomas de las plantas con respecto a las infecciones simples. El STV era capaz de romper este efecto antagónico reestableciendo la concentración del CMV y modificando nuevamente los síntomas. Los análisis de siRNAs permitieron identificar un total de 78 miRNAs, de los cuales 47 eran nuevos en tomate, que se expresaban diferencialmente en los grupos de plantas infectadas con los diferentes virus respecto a las plantas sin infectar. Estos miRNAs estaban implicados en la regulación de importantes funciones y tanto su número como su nivel de expresión variaban dependiendo de la combinación de virus. También se identificaron vsiRNAs de origen viral y se vio que su proporción variaba dependiendo del virus y de la combinación con otros virus. La cantidad de vsiRNAs del STV en las plantas infectadas solo con el virus fue muy pequeña, pero se incrementaba notablemente con la presencia de otros virus, principalmente el CMV. Las frecuencias de acumulación de vsiRNAs en los genomas virales no era uniforme en ningún virus, observándose regiones de acumulación con picos. Sin embargo, los patrones de distribución de vsiRNAs para cada virus no parecían estar influenciados por otros virus en los diferentes grupos de plantas.

Resum

El virus meridional de la tomaca (Southern tomato virus, STV) és un virus persistent (gènere *Amalgavirus*, família *Amalgaviridae*) que s'ha detectat en diversos països, alguns de la Conca del Mediterrani com Espanya i Itàlia. Inicialment, STV va ser associat a distints símptomes, principalment anomalies en la coloració i maduració del fruit de tomaca. No obstant això, la presència freqüent de virus aguts en les plantes infectades amb STV i la detecció d'aqueste en plantes asimptomàtiques, posen en dubte el seu patogenicidad i l'impacte que pot tindre en el cultiu.

En aquesta tesi doctoral hem tractat d'aprofundir en el coneixement sobre aquest virus. Per això, en primer lloc, es va realitzar la posada al punt de la RT-LAMP i la RT-qPCR per a la detecció específica i sensible de STV. La RT-LAMP va permetre reduir costos i simplificar el procediment, sent molt útil per a la detecció del virus en camp. La RT-qPCR és una tècnica molt sensible que ens va permetre detectar i quantificar STV en distints tipus de teixits de tomaca, incloent-hi llavors individuals. El virus s'acumulava principalment en arrels i fulles, i en les llavors es trobava tant en la coberta com en l'embrió, la qual cosa dificulta les tasques de desinfecció de les mateixes. Es va comprovar que les taxes de transmissió per llavor de STV podien aconseguir el 80%, i la incidència en camp del virus era molt elevada en les dues zones estudiades, la Comunitat Valenciana i Gran Canària. Els anàlisis de plàntules de tomaca van revelar la presència del STV en la majoria de viviers de la Comunitat Valenciana que es van analitzar. La incidència de STV era major en les varietats de tomaca comercials (llavors distribuïdes per empreses) que en les locals (generades pels mateixos agricultors) tant en plantes de camp com en les plàntules de viviers i llavors.

Els estudis filogenètics realitzats en aquest treball emprant la regió que codifica per a la p42 (possible CP) de diferents aïllats de STV van mostrar que el virus tenia una baixa diversitat genètica amb una forta pressió de selecció negativa. A més, no hi havia una correlació entre distància genètica del virus i origen geogràfic. Açò, possiblement era degut una ràpida dispersió del virus a través de la comercialització de llavors infectades y/o a la forta pressió de selecció negativa. En aquest treball es van obtindre evidències experimentals de què STV en condicions d'infecció simple no induïa símptomes en la planta, no alterava la producció, ni afectava paràmetres fisiològics importants com a conductivitat estomacal, fotosíntesi i pes en condicions d'estrés salí. Les observacions al microscopi òptic i electrònic no van revelar cap presència de partícules virals ni canvis a nivell tisular ni cel·lular associats a malalties. No obstant això, l'anàlisi de les poblacions

de siRNAs va revelar que STV era capaç de modificar l'expressió d'alguns miRNAs amb importants funcions. Es van detectar molt poca quantitat de vsiRNAs derivats del STV, la qual cosa podria deure's a la supressió del mecanisme de silenciament gènic de la planta per acció d'un supressor (VSR) codificat pel virus. Els assajos d'expressió transitòria en plantes de *Nicotiana benthamiana* 16C per a determinar la capacitat supressora de p42 de STV no van revelar que aquesta proteïna fora un VSR.

En l'última part d'aquest treball estudiarem l'efecte que podia tindre STV en infeccions mixtes amb altres virus aguts freqüents com CMV i PepMV. Els resultats obtinguts d'un assaig amb diferents combinacions d'infeccions van mostrar interaccions complexes entre els virus que implicaven variacions en la severitat de símptomes, en els nivells d'acumulació viral i en les poblacions de miRNAs i vsiRNAs. Es va observar un sinergismo entre el STV i CMV o PepMV en el grup de plantes co- infectades durant les primeres fases de la infecció: la presència del STV provocava l'avanç dels símptomes induïts pel CMV, així com l'increment de la seua severitat i un augment en la concentració del CMV als 10 dpi. En el cas de PepMV, la presència del STV produïa un augment de la severitat dels símptomes a 10 dpi, però sense canvis en concentració del virus. En el grup de plantes co-infectades amb CMV i PepMV es va observar un efecte antagònic que dificultava la replicació de CMV, alterant-se els símptomes de la planta respecte a les infeccions simples. STV era capaç de trencar aquest efecte antagònic restaurant la concentració viral de CMV i modificant novament els símptomes. Els anàlisis de siRNAs van permetre identificar un total de 78 miRNAs, 47 corresponien a miRNAs novells detectats per primera vegada en tomaca, que s'expressaven de forma diferent als grups de plantes infectades amb els diversos virus, respecte a les plantes control sense infectar. Aquests miRNAs estaven implicats en la regulació d'importants funcions i tant el seu nombre com el seu nivell d'expressió variaven depenent de la combinació de virus. També es van identificar vsiRNAs d'origen viral i es va observar que la seua proporció variava depenent del virus i de la combinació amb altres virus en els diferents grups de plantes. La quantitat de vsiRNAs de STV en les plantes infectades només amb el virus va ser molt baixa, però s'incrementava notablement amb la presència d'altres virus, principalment CMV. Les freqüències de vsiRNAs en els genomes virals no eren uniformes, observant-se regions d'acumulació amb màxims. No obstant això, els patrons de distribució de vsiRNAs per a cada virus no pareixien estar influenciats per altres virus en els diferents grups de plantes.

Abstract

Southern tomato virus (STV) is a persistent virus (genus *Amalgavirus*, family *Amalgaviridae*) which was detected in several countries, some of them from the Mediterranean Basin such as Italy and Spain. STV was associated with different plant symptoms, mainly affecting the coloration and maturation of tomato fruit. However, STV was frequently detected in mixed infections with acute viruses and in some asymptomatic tomato plants. For these reasons, it is not clear the STV pathogenic role and its real impact on tomato crops.

The main goal of this PhD research work was to go deeper into the knowledge of STV. Firstly, we improved the specific and sensitive detection of the virus by using the RT-LAMP and RT-qPCR. RT-LAMP is very useful for field STV detection since it is a simple and cheap technique, and it is adequate for processing large amounts of samples. The high RT-qPCR sensitivity enabled this technique to detect and quantify STV from different plant tissues even individual seeds. The highest STV concentrations were found in tomato leaves and roots. In the seeds, STV could be detected in both coat and embryo making the task of seed disinfection by using traditional procedures very difficult. The virus transmission by seed reached rates up to 80%, and STV incidence in prospected tomato fields from the Valencia Community and the Canary Islands was very high in comparison with other viruses. The virus was detected in most of the tomato seedlings commercialized at the Valencian Community, and analysis of plant fields, seedlings, and seeds revealed higher STV incidences in the tomato commercial varieties than in local ones (seeds generated by the owners).

Phylogenetic analysis from different STV isolates showed a low genetic diversity with a high negative selection pressure. Moreover, there was no correlation between genetic diversity and geographic region. This could be explained by a quick dispersion of STV by the distribution of infected seeds and/or by the high negative selection pressure. In this research work, it was shown that STV did not induce any apparent plant symptom and did not affect the plant production in single infection conditions. Also, physiological parameters related to stomatic conductivity, photosynthesis, and plant weight were not affected by STV infection in saline stress conditions. Optic and Transmission Electron Microscopy (TEM) did not reveal viral particles or structural changes in STV tomato tissues. However, the population analysis of miRNAs showed that STV was able to modify the expression of some miRNAs which modulated important plant functions. Low vsRNAs were detected in STV tomato infected plants. It could be produced by the action

of a VSR which could suppress the gene silencing pathway (PTGS) in the plants. However, transient expression of putative viral Cp (p42) in *Nicotiana benthamiana* 16C plants did not show the VSR activity of this STV protein.

In the last part of this work, we studied the effect that STV in mixed infections with other acute viruses such as CMV and PepMV which were frequent in tomato crops. The virus mix infection assay in tomato plants showed complex interactions between viruses that implied modification of plant symptoms severity, viral accumulation, and change of miRNAs and vsiRNAs populations. A synergism between STV and CMV or PepMV was observed in co-infection at the first infection stages: Presence of STV led to an advancement of CMV induced leaf symptoms and an increase of its severity at 10 dpi with a significant increase of CMV titer at this time. In the case of PepMV, presence of STV led to an increase of the severity of PepMV induced leaf symptom at 10 dpi but without changes in the PepMV titer. In the CMV and PepMV co-infected plants, it was observed an antagonistic interaction with a strong decrease of CMV titre and a modification of the leaf symptoms with respect to the single infections. Presence of STV broke this antagonism in the triple infected plants, restoring the CMV viral titer and changing the symptoms respect to the CMV and PepMV co-infection

The siRNAs analysis allowed to identify a total of 78 miRNAs, 47 corresponding to novel miRNAs in tomato, that were expressed differentially in the plants infected with the different virus combinations with respect to the control (*Mock*) plants. These miRNAs were involved in the regulation of important functions and their number and their level of expression varied depending on the virus combination. vsiRNAs of the different viruses were also identified and it was observed that rates varied depending on the virus combination. The number of vsiRNAs in STV single infected tomato plants was very small, but it increased with the presence of the other viruses, mainly CMV, in multiple infection conditions. The frequencies of vsiRNAs in the viral genomes were not uniform and different peaks (hotspots) were observed, but these distribution frequency patterns were not influenced by other viruses in mixed infections.

Abreviaturas

AGO, Argonauta

An, fotosíntesis neta

APMV, Acanthamoeba polyphaga mimivirus

AS, Ácido Salicílico

BBLV, Blueberry latent virus (Virus latente del arándano)

BBWV-1, Broad bean wilt virus 1 (Virus del marchitamiento del haba)

BCV, Beet cryptic virus (Virus críptico de la remolacha)

BSMV, Barley stripe mosaic virus (Virus del mosaico bandeado de la cebada)

BTH, ácido benzol (1,2,3) tiodiazol-7-carbotioico

CBSV, Cassava brown streak virus (Virus de la raya parda de la yuca)

CCV, Carrot cryptic virus (Virus críptico de la zanahoria)

CGMMV, Cucumber green mottle mosaic virus (Virus del mosaico moteado verde del pepino)

CH2, aislado chileno de PepMV

CMV, Cucumber mosaic virus (Virus del mosaico del pepino)

Cp, Coat protein (Proteína capsídica o Proteína de la cápside)

CSpV1, Cryptosporidium parvum virus 1 (Virus 1 de *Cryptosporidium parvum*)

Ct, Crossing point (ciclo umbral)

CThTV, Curvularia thermal tolerance virus (Virus de la tolerancia térmica curvularia)

CTV, Citrus tristeza virus (Virus de la tristeza de los cítricos)

CVYV, Cucumber vein yellowing virus (Virus de la vena amarilla del pepino)

DCL, DICER

dN, sustituciones no sinónimas por los sitios no sinónimos

DNA, ácido desoxirribonucleico

dS, sustituciones sinónimas por sitios sinónimos

dsRNA, double strand RNA (RNA de doble cadena)

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo de inmo-adsorción unido a enzima)

EU, aislado europeo de PepMV

FAO, Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura)

FDR, P-valor ajustado

GFP, Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)

GO, Gene Ontology

Gs, conductividad estomática

Ha, Hectáreas

HCPro, Helper Component-Proteinase (componente ayudante de la proteinasa)

HIV, Human immunodeficiency virus (Virus de la inmunodeficiencia humana)

H1N1, Influenza virus A

H₂O₂, peróxido de hidrógeno

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité internacional de taxonomía de virus)

INA, ácido 2,6-dicloroisocotínico

JYMV, Japanese yam mosaic virus (Virus del mosaico del ñame japonés)

KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto)

LAMP, Loop-Mediated Isothermal Amplification (amplificación isoterma mediada por bucles)

LP, aislado peruano de PepMV

miRNA, micro-RNA

NO, óxido nítrico

Nts, nucleótidos

ORF, Open Reading Frame (pauta de lectura abierta)

O₂⁻, ión superóxido

PapMV, Papaya mosaic virus (Virus del mosaico de la papaya)

PCV-1, Pepper cryptic virus 1 (Virus críptico del jalapeño)

PEMV-1, Pea enation mosaic virus 1 (Virus del mosaico del guisante 1)

PEMV-2, Pea enation mosaic virus 2 (Virus del mosaico del guisante 2)

PepMV, Pepino mosaic virus (Virus del mosaico del pepino dulce)

PES, nuevo aislado peruano de PepMV

PhII, fotosistema II

PMoV, Parietaria mottle virus (Virus del moteado de la parietaria)

PoLV, Photos latent virus (Virus latente de la poto)

PRSV, Papaya ringspot virus (Virus de la mancha anular de la papaya)

PRV, Papaya ringspot virus (Virus de la mancha anular de la papaya)

PTGS, Post-Transcriptional Gene Silencing (silenciamiento génico post-transcripcional)

PVS, Potato virus S (Virus S de la patata)

PVX, Potato virus X (Virus X de la patata)

PVY, Potato virus Y (Virus Y de la patata)

PYMPV, Potato yellow mosaic Panama virus (Virus del mosaico amarillo de la papa de Panama)

RCV, Ryegrass cryptic virus (Virus críptico de la hierba del centeno)

RdRp, RNA dependent RNA polymerase (RNA polimerasa RNA dependiente)

RGST, Rice grassy stunt tenuivirus (Virus del enanismo herbáceo del arroz)

RhVA, Rhododendron virus A (Virus del rododendro A)

RISC, RNA-Induced Silencing Complex (complejo de silenciamiento inducido por RNA)

RST, Rice stripe tenuivirus (Virus de la raya del arroz)

RSV, Rice stripe virus (Virus de la franja del arroz)

RT, Retrotranscripción

SAR, Systemic Acquired Resistance (Respuesta sistémica adquirida)

siRNA, small interfering RNA (pequeños RNA interferentes)

SMV, Soybean mosaic virus (Virus del mosaico de la soja)

ssRNA, single strand RNA (RNA de simple cadena)

STV, Southern tomato virus (Virus meridional del tomate)

T, Toneladas

TBSV, Tomato bushy stunt virus (Virus del enanismo arbustivo del tomate)

TCV, Turnip crinkle virus (Virus de la arruga del nabo)

TEM, Microscopio Electrónico de Transmisión

TGB, Triple Gene Block

TGS, Transcriptional Gene Silencing (silenciamiento génico transcripcional)

TLCNDV, Tomato leaf curl New Delhi virus (Virus de Nueva Delhi)

ToCV, Tomato chlorosis virus (Virus de la clorosis del tomate)

ToLVSIV, Tomato leaf curl Sinaloa virus (Virus de la Sinaloa del enrollamiento de la hoja de tomate)

ToMV, Tomato mosaic virus (Virus del mosaico del tomate)

ToTV, Tomato torrado virus (Virus del torrado del tomate)

TMV, Tobacco mosaic virus (Virus del mosaico del tabaco)

TRV, Tobacco rattle virus (Virus del traqueteo del Tabaco)

TSWV, Tomato spotted wilt virus (Virus del bronceado del tomate)

TVV1, *Trichomonas vaginalis* virus 1 (Virus 1 de *Trichomonas vaginalis*)

TYLCV, Tomato yellow leaf curl virus (Virus de la hoja amarilla del tomate)

TYMoV, Tomato yellow mottle virus (Virus del moteado amarillo del tomate)

TYMV, Turnip yellow mosaic virus (Virus del mosaic amarillo del nabo)

US1-CH1, aislado norteamericano de PepMV

US2, aislado recombinante norteamericano de PepMV

UTR, Untranslated Region (región no traducible)

UV, luz ultravioleta

VCVM, *Vicia cryptic virus M* (Virus críptico de vicia M)

VHSV, Viral hemorrhagic septicemia virus (Virus de la septicemia hemorrágica)

vsRNA, viral short interfering RNAs

VSR, Viral Suppressor of RNA silencing (supresor viral de silenciamiento génico)

WCCB-1, White clover cryptic virus (Virus críptico del trébol blanco)

Introducción

El cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea originaria de la zona andina que se extiende desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. Su domesticación tuvo lugar en México hace aproximadamente 2500 años. La planta de tomate se introdujo en Europa en el siglo XVI, inicialmente como cultivo ornamental, pero a partir del siglo XIX se extendió su uso como alimento (Erlendsdóttir et al. 2017). El tomate es actualmente uno de los cultivos más importantes en todo el mundo, alcanzándose en 2018 una producción estimada de 182 millones de toneladas (T) y una superficie de cultivo de unos 5 millones de hectáreas (Ha) (FAOSTAT <http://www.fao.org/home/es/>). En España, el tomate es el principal cultivo hortícola, alcanzándose en el año 2018 una producción de 4768595 T, de las cuales 767368 T fueron destinadas a la exportación. Estas cifras sitúan a nuestro país como el segundo productor y exportador de Europa, solo superado por Italia, y como octavo productor y tercer exportador a nivel mundial (FAOSTAT <http://www.fao.org/home/es/>). Las comunidades autónomas con mayor producción de tomate son Andalucía y Extremadura con 1963051 T (41% del total) y 1929916 T (40% del total) respectivamente, lo que representa un 81% del total de la producción española. La Comunidad Valenciana es la séptima Comunidad Autónoma en producción de tomate, con cerca de 76663 T (Tabla 1). En 2018 se produjeron un total de 51330 T en Alicante, 17394 T en Castellón y 7939 T en Valencia para una superficie total cultivada de 1245 Ha según los datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/es/default.aspx>).

Tabla 1. Producción de tomate medida en toneladas (T) en las diferentes Comunidades Autónomas de España en 2018 (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación <https://www.mapa.gob.es/es/default.aspx>).

Comunidad Autónoma	Producción (T)
Cantabria	1124
Castilla y León	4329
Asturias	4550
Madrid	4588
País Vasco	5993
Baleares	8790
La rioja	15861
Cataluña	43519
Aragón	49966
Canarias	71615
Comunidad Valenciana	76663
Castilla-La Mancha	88259
Galicia	92677
Navarra	147610
Murcia	260084
Extremadura	1929916
Andalucía	1963051

El tomate es una de las hortalizas más consumidas en España y se ha convertido en un componente fundamental de la dieta mediterránea. Su consumo es beneficioso para la salud ya que tiene muchos componentes saludables, entre el que destaca el licopeno, un carotenoide con capacidad antioxidante beneficioso para el sistema cardiovascular y que previene el desarrollo de tumores (Müller et al. 2016; Campos et al. 2017; Rowles et al. 2017). También es un alimento rico en vitaminas (vitamina B, C y E), flavonoides y minerales como el potasio (Sahlin et al. 2004).

Aunque hoy en día existen variedades de tomate muy productivas y adaptadas a las necesidades del mercado, su cultivo se ve afectado por numerosos factores abióticos y bióticos, que disminuyen la producción originando importantes pérdidas económicas. Entre los primeros, el cambio climático con un aumento de la temperatura y una disminución de la pluviosidad en algunas regiones productoras como ocurre en la cuenca mediterránea (Shen et al. 2015). Por otro lado, los factores bióticos como plagas y enfermedades también originan importantes pérdidas en la producción. El tomate puede verse afectado por enfermedades producidas por virus, hongos, bacterias y nematodos. Existen multitud de virus que infectan tomate causando importantes pérdidas en todo el mundo. Algunos de los ejemplos más representativos podrían ser el virus del mosaico del

pepino (Cucumber mosaic virus, CMV), el virus de la cuchara (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV), el virus del bronceado del tomate (Tomato spotted wilt virus, TSWV) y el virus del mosaico del pepino dulce (Pepino mosaic virus, PepMV) (Stafford et al. 2011; Jacquemond 2012; Moreno-Delafuente et al. 2013). Además, las plagas también reducen la producción de tomate, como causante directo de daños y/o como vectores transmisores de virus. En cuanto a los insectos, áfidos, moscas y trips son los vectores transmisores de virus más importantes. Finalmente, las infecciones por hongos como el oídio (*Leveillula taurica* L.) o *Fusarium oxysporum* S., por nematodos como *Meloidogyne*, *Xiphinema* o *Longidorus*, así como por enfermedades causadas por bacterias, entre las que destacan algunas especies de *Pseudomonas* y *Xanthomonas* tienen un efecto reduciendo la producción de tomate (Schwartz et al. 2015; De Fitopatología 2016; Aung et al. 2017).

Virus de plantas

La palabra “virus” proviene del latín y significa “toxina” o “veneno”. Aunque existen evidencias de enfermedades producidas por virus en el antiguo Egipto en momias que conservan las cicatrices típicas de la viruela, o representaciones de sacerdotes con deformidades en las extremidades producidas probablemente por el virus de la polio, no fue hasta finales del siglo XIX cuando se aisló el primer agente viral (Fig. 1).



Figura 1. Imagen de la momia de Ramses V (reinado 1147-1143 A.C.) y de una tablilla egipcia del año 1450 A.C. mostrando síntomas del virus de la viruela y poliometitis en un sacerdote, en la parte izquierda y derecha de la figura, respectivamente. Imágenes sacadas de internet (<http://xsierrav.blogspot.com/2015/05/ramses-v-el-caso-de-viruela-mas-antiguo.html> y http://www.vacunasyviajes.es/vacunasyviajes/Poliometitis_Atlas.html).

En 1898, el holandés Martinus Beijerinck demostró que un extracto procedente de una planta de tabaco que presentaba severos síntomas de mosaico (*contagium vivium fluidum*) seguía siendo infectivo. El agente patógeno del extracto debía ser más pequeño que una bacteria ya que atravesaba filtros cuyos poros eran capaces de retener este tipo de organismos. El *contagium vivium fluidum* contenía el virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus, TMV) y era un patógeno parásito obligado, pues solo podía multiplicarse en tejido vivo. El TMV se cristalizó en 1935 y en 1958, el equipo dirigido por Rosalind Franklin, codescubridora de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA), determinó su estructura molecular por difracción de rayos X.

Los virus son organismos muy simples que están compuestos por material genético de RNA o DNA, protegido por una cubierta proteica llamada cápside (Cp). Además, algunos virus, entre los que se encuentran solo unos pocos virus de plantas como bunyavirus y rhabdovirus, tienen una envoltura de naturaleza lipídica de origen celular (Prins and Goldbach 1998). Los virus son parásitos intracelulares que necesitan de la maquinaria celular para su replicación y su tamaño es tan reducido que solo son visibles al microscopio electrónico (TEM). Sin embargo, recientemente se han descubierto algunos virus que pueden alcanzar tamaños similares a los de algunas bacterias, pudiendo ser visualizados con el microscopio óptico (Van Etten et al. 2010). Estos virus gigantes se agrupan dentro del género *Mimivirus* de la familia *Mimiviridae* cuya especie tipo es el *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV).

Los virus de plantas tienen mayoritariamente genomas de RNA de cadena simple y de polaridad positiva (ssRNA+), aunque también los hay de polaridad negativa (ssRNA-), ambisentido (ssRNA+/-) o doble cadena (dsRNA). Los virus inician su ciclo al entrar en la célula vegetal, mediante un daño físico en la misma. Una vez el virus ha penetrado en el interior de la célula, comienza el proceso de replicación generándose miles de copias del material genético viral. Tras la replicación, el virus ha de colonizar nuevas células hasta alcanzar los órganos distales produciéndose la infección sistémica de la planta (Gómez-Aix et al. 2015; De Fitopatología 2016). El movimiento del virus hacia las células adyacentes desde el foco inicial de la infección (movimiento célula a célula) se realiza a través de los plasmodesmos. En este movimiento intervienen proteínas específicas codificadas en el propio genoma del virus (proteínas de movimiento). De esta forma, el virus alcanza los tejidos vasculares y se dispersa hacia otros tejidos, dando lugar

a la infección sistémicamente de la planta (movimiento a larga distancia) (De Fitopatología 2016).

Los virus de plantas pueden infectar otros individuos a través de dos mecanismos: transmisión horizontal y vertical. En la primera, los virus infectan plantas que se encuentran más o menos cercanas. Esto se produce durante las tareas agrícolas o a través de organismos transmisores (vectores) como pueden ser artrópodos, nematodos y hongos fitófagos (Walkey 1991; Stange 2006). Los áfidos, hemípteros y trips son los artrópodos vectores de plantas más importantes. Dentro de la transmisión horizontal mediante vectores podemos distinguir tres tipos: transmisión persistente, semi-persistente y no persistente. La transmisión persistente tiene lugar cuando el virus permanece en el vector durante un largo periodo de tiempo que puede variar desde horas a días. En este tipo de transmisión hay una larga fase de latencia del virus antes de poder realizarse la transmisión. En contraposición, la transmisión no persistente tiene lugar cuando el virus permanece durante un periodo de tiempo muy corto en el vector de manera que la transmisión ocurre de forma rápida. Los virus con este tipo de transmisión no requieren un periodo de incubación en el vector. Finalmente, la transmisión semi-persistente resultaría de la combinación de ambas, con periodos de adquisición y retención mayores a los de la transmisión no persistente pero menores que los de la persistente (Blanc 2007; De Fitopatología 2016). Por otro lado, en la transmisión vertical el virus viaja a través de las semillas, dando lugar a plántulas infectadas. La semilla puede infectarse por contacto con el sustrato o el agua infectada, como ocurre con el virus del mosaico del tomate (Tomato mosaic virus, ToMV) o el PepMV. En estos casos, el virus se localiza en la parte más externa de la semilla (la cubierta), resultando la plántula infectada en el momento de la germinación (Sastry 2013a). Por otro lado, la parte interna de la semilla (el embrión) puede resultar infectado por virus a través de las células gaméticas y/o órganos reproductores. Esto es lo que ocurre con virus como el virus del mosaico de la soja (Soybean mosaic virus, SMV) o CMV en plantas de pimiento (Ali and Kobayashi 2010; Jossey et al. 2013). Algunos virus pueden tener uno o más métodos de transmisión como sucede con el PepMV, que es capaz de transmitirse por artrópodos, por agua, por contacto y por semilla (Hanssen et al. 2010c).

Durante el proceso infectivo se producen una serie de alteraciones metabólicas en las células hospedadoras que pueden producir la muerte de la planta, aunque en la mayoría de los casos estas alteraciones no son tan drásticas, traduciéndose en una disminución de

la producción de los cultivos infectados (Strange and Scott 2005; Acosta-Leal et al. 2011; Pallas and García 2011). Esto es lo que sucede con los llamados “virus agudos”, mientras que hay otro grupo de virus, denominados “crípticos, latentes o virus persistentes” que no inducen síntomas aparentes de enfermedad. Además, este tipo de virus se transmiten de manera vertical por semilla e infectan una planta durante todo su ciclo de vida (Roossinck 2010).

Evolución de los virus de plantas

Los virus de plantas son generalmente de RNA y se caracterizan por una rápida evolución con continuos cambios genéticos que influyen en la severidad de las enfermedades que producen, rango de especies hospedadoras y capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Por tanto, los estudios sobre evolución viral son importantes en el control de las enfermedades que producen. La selección natural y la deriva genética son las principales fuerzas que dirigen la evolución de los virus (Acosta-Leal et al. 2011). Éstas actúan sobre las variantes generadas por mutaciones en el proceso de replicación viral, recombinación entre regiones genómicas diferentes y/o intercambio de segmentos genómicos (en los virus con genomas segmentados) entre diferentes aislados virales que coinfectan una misma célula. La recombinación puede ser homóloga o heteróloga, dependiendo del grado de complementariedad que haya entre las secuencias genéticas.

Los virus de RNA poseen una elevada tasa de mutación, en torno a 10^{-3} ya que las RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) virales no poseen actividad de corrección de errores (Sanjuan et al. 2010). Esto permite que los virus de RNA tengan una gran capacidad de adaptación a nuevos ambientes, favoreciendo la emergencia de variantes virales. Por el contrario, los virus de DNA tienen tasa de mutación de alrededor de 10^{-6} , lo que le confiere una menor capacidad de evolución que los virus de RNA. Aquellos cambios que se han introducido y sean beneficiosos pueden ser mantenidos por selección positiva y ser transmitidos a las siguientes generaciones mientras que los cambios deletéreos o que no produzcan ninguna ventaja serán eliminados por una selección negativa o purificadora (Moya et al. 2004). Finalmente, la diversidad entre poblaciones

puede verse reducida por la migración entre poblaciones de diferentes áreas geográficas (Elena et al. 2011).

Control de las enfermedades producidas por virus

Hasta la fecha no existe ningún tratamiento que permita curar las plantas infectadas por virus por lo que el control de estas enfermedades ha de basarse fundamentalmente en medidas profilácticas orientadas a prevenir la infección o disminuir la dispersión del virus. Esto ha de hacerse mediante el uso de material propagativo libre de virus, la realización de prácticas agronómicas adecuadas, la obtención de plantas resistentes o tolerantes y el control de los organismos que actúen como vectores de transmisión. La utilización de material propagativo libre de virus evita la introducción de éstos en los cultivos a través de programas de certificación y cuarentena. La transmisión de virus por semilla tiene un gran impacto ya que la comercialización de semillas infectadas puede transmitir los virus a grandes distancias, contribuyendo a su dispersión y a la aparición de enfermedades emergentes en regiones en donde no estaba presente anteriormente. Por tanto, es muy importante disponer de germoplasma libres de virus y realizar un control fitosanitario riguroso de los productos que se comercializan a través de empresas productoras de semillas y viveros (Hull 2001). Cuando el material propagativo está infectado con virus, éste debe ser saneado mediante termoterapia, quimioterapia y cultivo *in vitro* de meristemas (Walkey 1991; Toussaint et al. 1993).

La aplicación de prácticas agronómicas como la i) descontaminación de herramientas, ii) ruptura del ciclo de transmisión del virus dejando de cultivar durante un tiempo y iii) eliminación de fuentes de inóculo mediante la erradicación de las plantas infectadas, son esenciales para el control de las enfermedades producidas por virus. Otra forma de luchar contra este tipo de enfermedades es establecer métodos de control de los organismos que actúan como vectores transmisores de virus. Esto se puede hacer empleando fauna parasita y/o depredadora o mediante barreras físicas como mallas que impidan el acceso de los insectos vectores. También se puede utilizar el control químico con herbicidas para eliminar malas hierbas que puedan servir como reservorio de virus o con pesticidas para erradicar directamente a los insectos vectores.

El cultivo de plantas resistentes es la forma más eficaz de prevenir enfermedades causadas por virus (Hull 2001). La manera tradicional de obtenerlas se basa en la mejora genética, que consiste en incorporar genes que confieran una resistencia específica contra ciertos virus en variedades vegetales de interés agronómico. Los genes de interés se introducen en la variedad deseada mediante hibridación, retrocruzamiento y selección. Otra forma de obtener plantas resistentes es por transformación genética, que consiste en la producción de plantas transgénicas mediante la introducción de DNA foráneo en el genoma de la planta empleando técnicas de ingeniería genética. También es posible la inducción de resistencias en plantas mediante la estimulación de los mecanismos de defensa. De esta manera, la inoculación de variantes virales poco virulentas puede activar el mecanismo de silenciamiento génico confiriendo resistencia en la planta frente a variantes virulentas (protección cruzada). Esta técnica se ha aplicado con éxito para controlar un gran número de enfermedades producidas por virus como el virus de la mancha anular de la papaya (Papaya ringspot virus, PRV), el ToMV y el PepMV (Rast 1975; Tennant et al. 1994; Hanssen et al. 2010a). Alternativamente, la estimulación de la respuesta sistémica adquirida (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) mediante la aplicación de determinados productos químicos como el ácido salicílico (AS) o análogos estructurales de este como el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) o el ácido benzol (1,2,3) tiodiazol-7-carbotioico (BTH) proporciona resistencia contra una amplia gama de patógenos (Van Loon et al. 1998; Durrant and Dong 2004). Su aplicación aún no está muy extendida, aunque su bajo impacto ambiental, y la prohibición de numerosos tratamientos químicos le proporciona a este método un gran potencial.

Para establecer las medidas de control adecuadas, se necesitan métodos de diagnóstico que permitan detectar los virus de manera específica y sensible. Estos métodos se han basado tradicionalmente en el uso de especies de plantas hospedadoras diferenciales (plantas indicadoras) y en el uso de anticuerpos específicos (*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA). Sin embargo, el desarrollo de las técnicas moleculares que detectan el ácido nucleico viral ha supuesto un gran avance en el diagnóstico de enfermedades virales. Entre éstas se encuentran la hibridación molecular, que emplea sondas específicas marcadas, o la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR y sus variantes (RT-PCR, PCR en tiempo real). Recientemente se ha incorporado una técnica con gran potencial basada en la amplificación isoterma de ácidos nucleicos (*loop-mediated isothermal amplification*, LAMP).

Métodos de detección basados en técnicas moleculares

Las técnicas moleculares se basan en la detección del ácido nucleico viral y actualmente son ampliamente utilizadas en los laboratorios de diagnóstico de virus. La principal ventaja sobre otras técnicas como el ELISA, que detecta la Cp del virus, es la gran sensibilidad que tienen (10 -1000 veces más sensible que el ELISA), mientras que entre las desventajas mencionaremos su complejidad y elevado coste (Sánchez-Navarro et al. 1998; Bruissson et al. 2017). Además, se necesita disponer de secuencias genéticas del patógeno para poder diseñar los correspondientes cebadores y sondas utilizadas en los procedimientos.

La hibridación molecular permite la detección viral utilizando sondas marcadas que se unen a una región concreta del virus. Estas sondas pueden ser de DNA o RNA y se sintetizan utilizando nucleótidos marcados con distintos compuestos. Uno de ellos es la digoxigenina, que es reconocida por un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva conjugado la fosfatasa alcalina. Esta enzima es capaz de catalizar la descomposición de un sustrato emitiendo luminiscencia y/o produciendo un cambio de coloración. La hibridación molecular puede llevarse a cabo a partir de diferentes tipos de material como extractos purificados de DNA o RNA, impresiones de tejidos vegetales (*tissue print*) o extractos de material vegetal sin procesar, lo que permite reducir el coste del proceso eliminando el paso previo de extracción (McClure and Guilfoyle 1989; Chia et al. 1992; Galipienso et al. 2005; Nikolaeva 2017). La hibridación molecular se ha utilizado ampliamente para detectar un gran número de virus de plantas, el virus de Nueva Delhi (Tomato leaf curl New Delhi virus, TLCNDV), el TSWV, el TMV, el PepMV, el CMV, el virus Y de la patata (Potato virus Y, PVY) o el virus del moteado de la parietaria (Parietaria mottle virus, PMoV) (Huguenot et al. 1990; Aramburu et al. 2010; Alfaro-Fernández et al. 2016).

La PCR se basa en la amplificación en cadena de la DNA polimerasa, que permite generar copias de forma exponencial (2^n) utilizando los genomas virales como molde. La PCR tiene 3 fases: i) fase de desnaturalización donde las cadenas de ácido nucleico se separan, ii) hibridación de los cebadores con secuencias homólogas de la cadena molde y iii) fase de amplificación, en la que la DNA polimerasa incorpora nucleótidos elongando las nuevas cadenas (Fig. 2). Existen diferentes tipos de polimerasas que trabajan a diferentes temperaturas y que pueden tener o no actividad exonucleasa 3'-5' (actividad

correctora de errores). La Taq Polimerasa es una de las más usadas en PCR convencional y se obtiene de la bacteria *Thermophilus aquaticus*. En el caso de los virus de DNA, el genoma viral sirve como molde para sintetizar nuevas cadenas mediante PCR mientras que en los virus de RNA es necesario un paso previo de retrotranscripción (RT) en el que el RNA pasa a cDNA que sirve como molde en la reacción de PCR (RT-PCR). La reacción de retrotranscripción se lleva a cabo con una DNA polimerasa RNA dependiente (retrotranscriptasa). La sensibilidad de la PCR es 10-100 veces mayor que la hibridación molecular, pero tiene algunas desventajas como la producción de falsos negativos por la inhibición de las DNA polimerasas y la de falsos positivos por contaminación cruzada (Elvira-González et al. 2017; Puchades et al. 2017). La PCR es una técnica ampliamente usada en la detección del virus de plantas como el TLCNDV, el virus S de la patata (Potato virus S, PVS), el virus del torrado del tomate (Tomato torrado virus, ToTV) y el PepMV entre otros (Alfaro-Fernández et al. 2016; Wang et al. 2016).

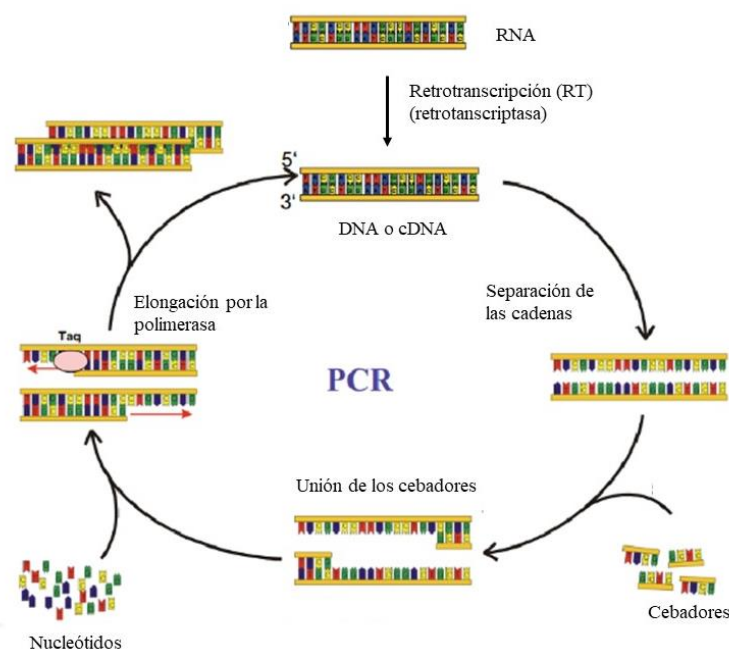


Figura 2. Reacción de PCR en la cual se producen copias de la hebra molde de DNA en sucesivos ciclos de amplificación (2^n). Se señalan las diferentes fases de la PCR: desnaturalización del DNA, unión de cebadores y amplificación por la DNA polimerasa. Para virus de RNA es necesario un paso previo de retrotranscripción (RT) que permite el paso de RNA a cDNA el cual será amplificado por PCR (RT-PCR) (Vasco Aguas 2012).

A partir de la PCR han surgido algunas variantes, entre ellas la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) cuando el molde es DNA o la RT-qPCR si el molde es RNA y ha de acoplarse una reacción de retrotranscripción. Esta técnica incluye el uso de fluoróforos como el SYBR Green, que es un agente intercalante que se une al surco menor de DNA, o de sondas complementarias a una secuencia del virus. Las sondas utilizadas pueden ser de diferentes tipos, pero todas ellas poseen un *quencher* y un *reporter* (fluoróforo). Cuando el *quencher* se encuentra próximo al *reporter*, la emisión de fluorescencia de éste queda anulada. Cuando ambas moléculas se separan, se produce la emisión de fluorescencia. En el caso de las sondas tipo TaqMan, el *reporter* se libera por acción de la actividad exonucleasa 3'-5' de la Taq DNA polimerasa (Fig. 3).

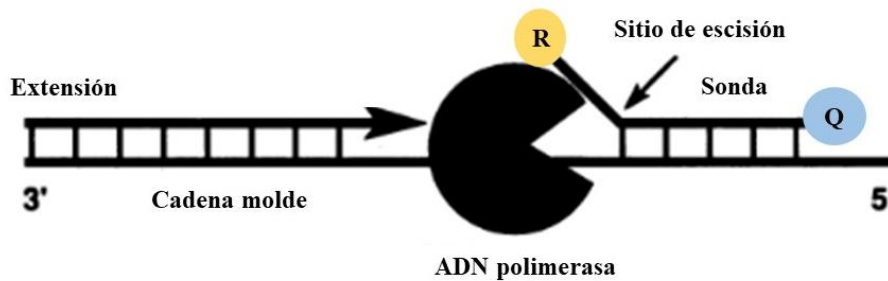


Figura 3. Proceso de degradación de las sondas tipo TaqMan usadas en qPCR. Durante el proceso de elongación de las cadenas, la actividad exonucleasa 3'-5' de la Taq DNA polimerasa produce la liberación del fluoróforo o *reporter* (R) y del *quencher* (Q) permitiendo la emisión de fluorescencia.

Para la detección de la fluorescencia se usan termocicladores con sensores capaces de detectar la longitud de onda a la que emite cada fluoróforo. Esta detección se realiza en cada ciclo de amplificación midiéndose de esta forma la tasa de generación del producto de PCR. Así se obtiene un valor de Ct o Cp (*crossing point*) para cada muestra, que determina en qué ciclo de amplificación la fluorescencia emitida por el producto de PCR adquiere un carácter exponencial rebasando la línea basal. Esta técnica ofrece la posibilidad de cuantificar el material de partida, de forma relativa o absoluta. En la cuantificación absoluta se utiliza una molécula con una secuencia equivalente y concentración conocida a partir del cual se realizan diluciones seriadas. A partir de éstas se genera una curva patrón que nos proporciona una ecuación de la recta la cual se aplicará a cada muestra individual obteniendo de esta forma el número de copias del virus en cada

muestra. En la cuantificación relativa, la recta se genera a partir de diluciones de la muestra con mayor concentración viral (menor Ct), obteniéndose valores arbitrarios que permiten comparar cada muestra respecto a la más concentrada. Entre las principales ventajas de esta técnica está la posibilidad de detección y cuantificación de la diana y la eliminación de la fase post-PCR, reduciendo de esta forma la manipulación de los amplicones y la posibilidad de contaminaciones. Además, la RT-qPCR es más sensible que el ELISA, la hibridación molecular y la PCR convencional (Sánchez-Navarro et al. 1998; Elvira-González et al. 2017; Puchades et al. 2017). Entre los inconvenientes de esta técnica está el elevado coste de los equipos y reactivos así como el elevado grado de procesamiento de las muestras (Logan et al. 2009). La qPCR ha sido ampliamente usada para diferentes virus como el PVY, el TSWV, el virus del marchitamiento del haba 1 (Broad bean wilt virus 1, BBWV-1), el virus de las venas amarillas del pepino (Cucumber vein yellowing virus, CVYV), el virus del mosaico moteado verde del pepino (Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) o el PepMV (Ling et al. 2007; Hongyun et al. 2008; Gil-Salas et al. 2009; Debreczeni et al. 2011; Ferriol et al. 2011; MacKenzie et al. 2015).

Finalmente, otra técnica molecular de reciente implantación es la LAMP o RT-LAMP. Esta técnica emplea el uso de tres parejas de cebadores con secuencias autocomplementarias y una DNA polimerasa isoterma capaz de separar las dos hebras de DNA (Fig. 4). Dicha enzima se obtiene de la bacteria *Bacillus stearothermophilus* y permite realizar la reacción de amplificación a temperatura constante sin necesidad del uso de termocicladores. Además, esta polimerasa es menos sensible a los inhibidores presentes en las muestras que la Taq polimerasa comúnmente usada en la PCR convencional, por lo que permite el uso de extractos brutos sin procesar del material vegetal (se elimina la extracción de ácidos nucleicos) simplificando el procedimiento y reduciendo costes (Mori and Notomi 2009; Herrera-Vásquez et al. 2017).

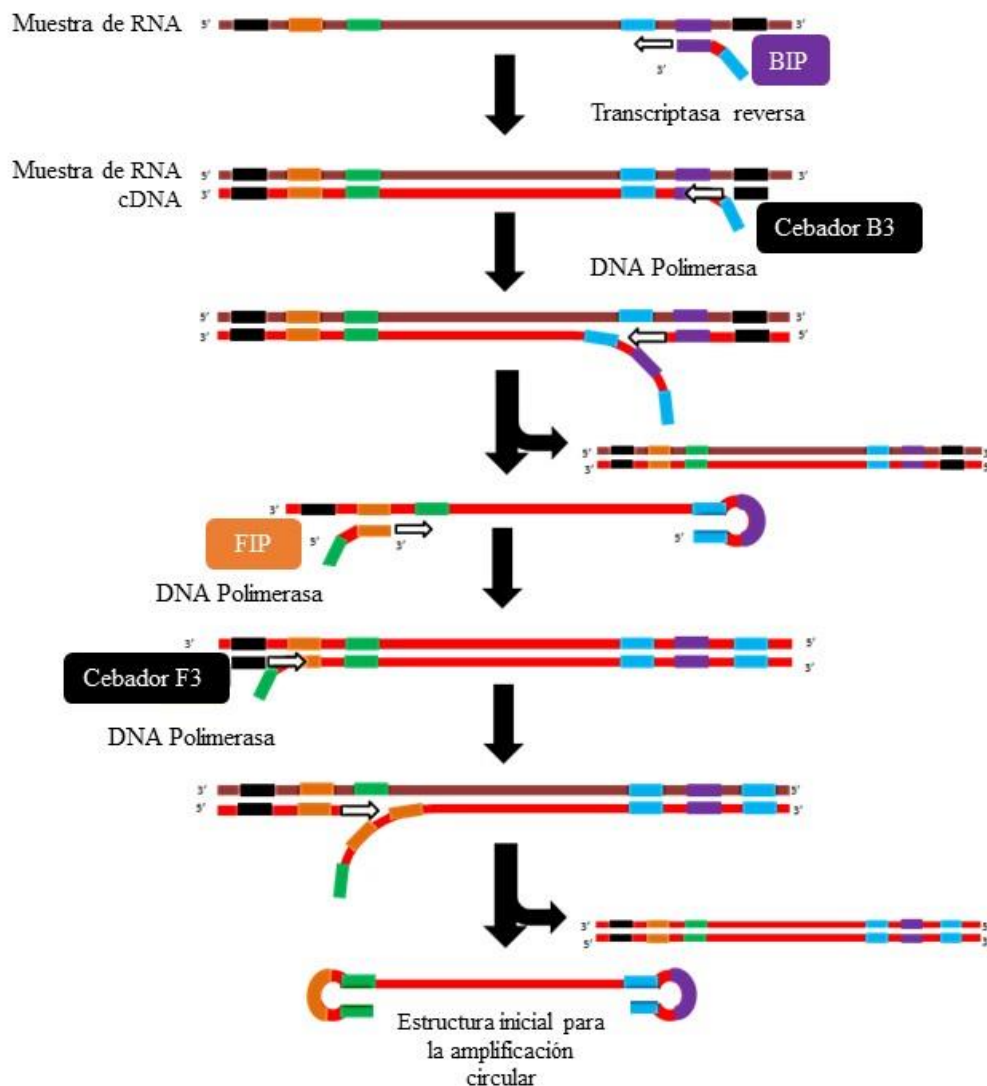


Figura 4. Esquema de la reacción de amplificación por RT-LAMP. En una primera fase la transcriptasa reversa genera el cDNA a partir del cual se produce la amplificación. En esta técnica se emplean hasta tres parejas de cebadores con secuencias autocomplementarias que generan estructuras en bucle permitiendo la amplificación de las cadenas. Imagen obtenida de https://en.wikipedia.org/wiki/File:Initiation_step_of_RT-LAMP_method.png.

Las reacciones de LAMP generan patrones complejos de amplificación, que a veces pueden ir acompañados de *smear* siendo complicada su interpretación. La visualización de los productos de amplificación se puede realizar mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con agentes intercalantes como el GelRed. El proceso de post-PCR se puede simplificar añadiendo directamente el colorante en el tubo de reacción y viendo la fluorescencia directamente en éste (Fig. 5). De esta manera se evita el proceso de

electroforesis y tinción del gel. La sensibilidad de la LAMP es similar a la de la PCR convencional, pero el diseño de cebadores resulta más complicado que en esta última técnica, siendo necesario el uso de programas específicos. La LAMP ha sido empleada para detectar una gran variedad de virus de plantas como el ToTV, el TSWV, el virus del mosaico del ñame japonés (Japanese yam mosaic virus, JYMV), el PVY, el virus del mosaico amarillo de la papa de Panamá (Potato yellow mosaic Panama virus, PYMPV), el virus de Sinaloa del enrollamiento de la hoja de tomate (Tomato leaf curl Sinaloa virus, ToLCSiV) o el virus del moteado amarillo del tomate (Tomato yellow mottle virus, TYMoV) (Fukuta et al. 2003a, 2004; Nie 2005; Budziszewska et al. 2016; Herrera-Vásquez et al. 2017).

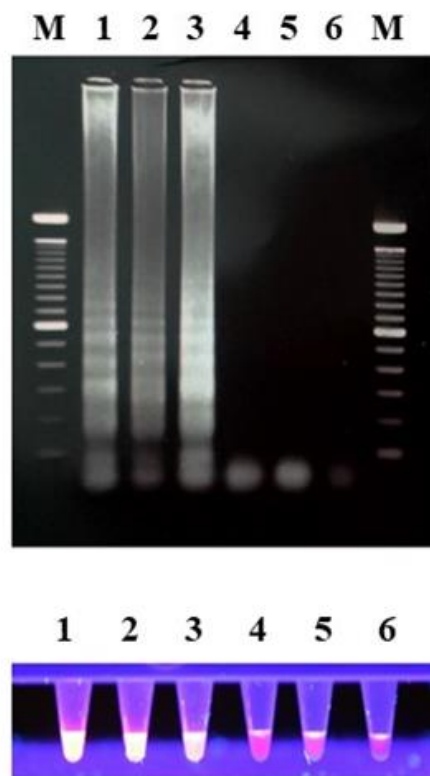


Figura 5. Patrón de amplificación por LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con GelRed (arriba). Visualización directa de las amplificaciones añadiendo directamente el GelRed en el tubo de reacción y aplicando luz ultravioleta (UV) sobre éstos (abajo).

Interacción virus-hospedador

Como hemos visto anteriormente, se pueden distinguir dos tipos de virus: los virus persistentes y los virus agudos. Los primeros no inducen síntomas, se transmiten verticalmente a través de semillas cuyos embriones están infectados y no son capaces de moverse célula a célula. La distinción entre virus agudos y persistentes no es considerada como un criterio taxonómico por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) (<https://talk.ictvonline.org>), que sigue principalmente la Clasificación de Baltimore basada en la naturaleza del genoma viral (DNA o RNA, de simple o doble cadena) y a su estrategia de replicación (Baltimore, 1971), pese a que la mayoría de los virus persistentes tienen genomas de dsRNA. La diferenciación entre virus agudos y persistentes tiene una base fundamentalmente patológica, en la que los primeros inducen enfermedades mientras que los segundos no producen síntomas. Se han descrito algunos casos de virus persistente que establecen relaciones mutualistas con la planta como el virus críptico del trébol blanco (White clover cryptic virus, WCCB-1), que modula la nodulación de las raíces de leguminosas en función de la presencia de N₂. La nodulación se activa a través de los genes *nod* de la planta que son regulados por un factor segregado por bacterias simbiotes fijadoras del N₂. La generación de nódulos tiene un coste energético para las plantas, que es asumible en casos de baja concentración de N₂ atmosférico. Sin embargo, a altas concentraciones de éste, la CP de WCCB-1 es capaz de bloquear los genes *nod* impidiendo la nodulación y ahorrando energía (Nakatsukasa-Akune et al. 2005; Roossinck 2015a). Otros ejemplos de mutualismo entre virus persistentes y plantas son el del virus críptico de la remolacha (Beet cryptic virus, BCV) que aumenta la productividad de la planta en condiciones de estrés hídrico (Roossinck 2011) o el del virus de la tolerancia térmica curvularia (Curvularia thermal tolerance virus, CThTV) que permite a la planta *Dichanthelium lanuginosum* crecer a temperaturas mayores de 50°C (Roossinck 2015a).

Los virus agudos producen síntomas en las plantas que infectan, son capaces de transmitirse de forma horizontal y de moverse a través de los plasmodesmos de las células (Roossinck 2010). Estos tipos de virus suelen establecer una relación de parasitismo con la planta hospedadora que puede resultar en los casos más extremos en la muerte de ésta. Ejemplos de virus agudos que infectan tomate y producen graves daños son el CMV, el

PepMV o el TSWV (Inoue-Nagata et al. 1997; Gomez et al. 2009; Blystad et al. 2015; De la Torre-Almaráz et al. 2016).

Mecanismo de defensa de la planta frente a patógenos

Respuesta hipersensible

Durante el proceso de entrada de un patógeno a la planta, ésta utiliza diversos mecanismos de resistencia para protegerse. Las respuestas bioquímicas más comunes son la síntesis y depósitos de compuestos fenólicos y proteínas en la pared celular, la muerte celular (respuesta hipersensible) y la acumulación de proteínas antimicrobianas y proteínas específicas relacionadas con el patógeno (Kombrink and Somssich 1995). La respuesta hipersensible consiste en la muerte de las células de la planta que están infectadas por un patógeno (Fig. 6). Este tipo de respuesta implica la activación de algunos genes de la planta que están relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno, que son muy tóxicas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ión superóxido (O_2^-) y el óxido nítrico (NO) (Van Breusegem and Dat 2006; Komatsu 2013). Esta respuesta está caracterizada por una muerte rápida y localizada de las células infectadas evitando de esta forma que el patógeno se multiplique y se disperse. Como consecuencia de la respuesta hipersensible también se produce el cierre de estomas y una alteración del proceso fotosintético de la planta (Chaerle et al. 1999).

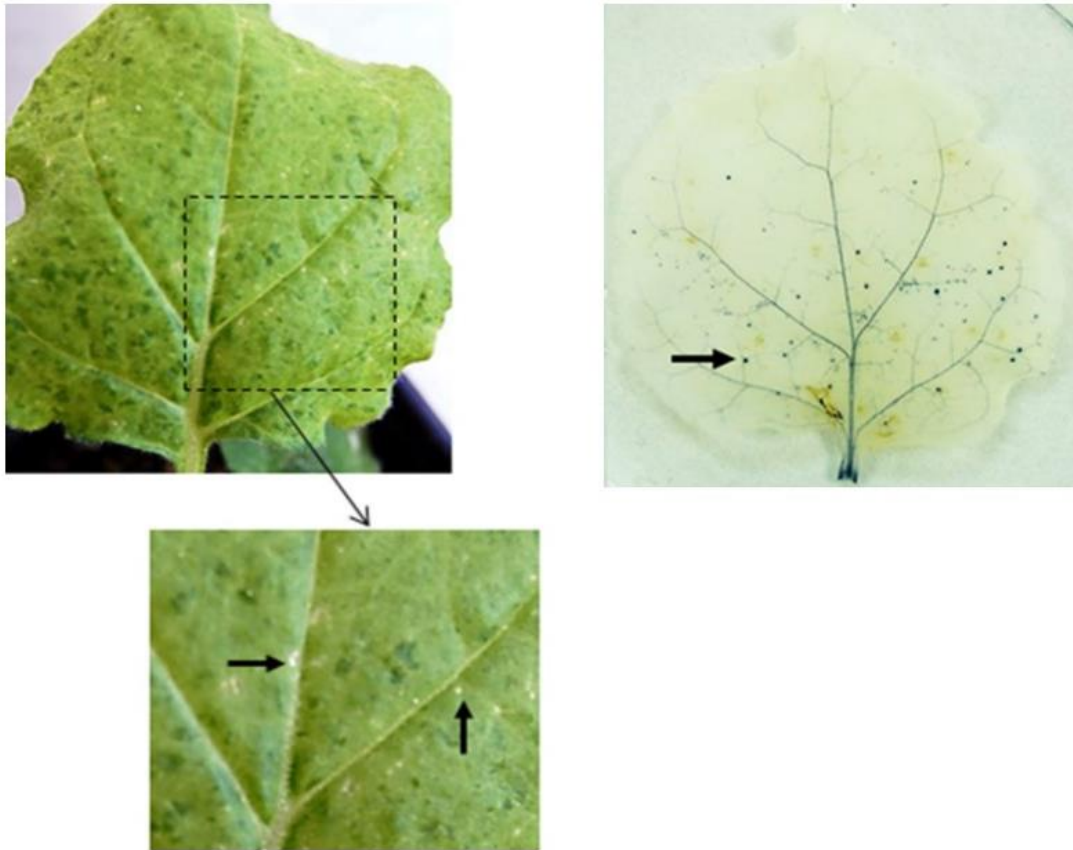


Figura 6. Respuesta hipersensible en forma de lesiones locales inducidas por el virus 1 del marchitamiento del haba (BBWV-1) en plantas de *Nicotiana benthamiana*. En la parte de abajo se muestra un detalle de las lesiones locales y en la derecha se observan acúmulos del ión superóxido (O_2^-) en células muertas mediante tinción con nitroazul de tetrazolio (NBT) (Carpino et al. 2020).

Silenciamiento génico

El silenciamiento génico mediado por RNA es un mecanismo de regulación genética conservado en la gran mayoría de organismos eucariotas. Éste mecanismo sirve como regulador de la expresión de genes endógenos y como mecanismo de defensa contra patógenos (Voinnet 2005; Csorba et al. 2009). Se pueden diferenciar dos tipos de silenciamiento génico mediado por RNA: el silenciamiento génico transcripcional (*transcriptional gene silencing*, TGS) y el postranscripcional (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS). El primero implica la metilación del DNA y la modificación de histonas

mientras que el segundo se basa en la degradación de secuencias homólogas de RNA (Liu and Chen 2016).

El PTGS se activa por moléculas de dsRNA y/o RNA de simple cadena altamente estructurado, siendo procesado por ribonucleasas tipo Dicer (DCL) en moléculas de 21-24 nucleótidos (nts) llamados pequeños RNAs interferentes (*short interfering RNAs*, siRNAs). Existen diferentes tipos de proteínas DCL que generan siRNAs de diferentes tamaños. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* existen cuatro tipos diferentes de DCL: DCL1 se encarga de procesar ssRNA ultraestructurado y formar siRNA de 21 nts, mientras que el resto (DCL 2, 3 y 4) procesa dsRNA formando siRNAs de 21 (DCL4), 22-23 (DCL2) y 24 (DCL3) nts. Estos siRNAs interactúan con proteínas tipo Argonauta (AGO) y se incorporan a un complejo llamado RISC (*RNA-induced silencing complex*) que produce la degradación de las moléculas de RNA que tengan secuencias complementarias a los siRNAs incorporados. Estos complejos también son capaces de metilar el DNA del organismo y de este modo bloquear la expresión de determinados genes endógenos (Wang et al. 2012). Los micro-RNAs (miRNAs) son un tipo de siRNAs que derivan de transcritos de RNA de genes del organismo con funciones reguladoras pero que no codifican para proteínas. Estos transcritos de RNAs (Pre-miRNAs) son muy estructurados siendo procesado por DCL1 en miRNAs, que actúan como elementos reguladores de la expresión de otros genes con los que tenga homología de secuencia (Voinnet 2009). Por otro lado, cuando un virus se introduce en la célula y comienza a replicarse, los intermediarios de dsRNA son detectados también por DCL2 y DCL4 dando lugar a siRNAs derivados del virus (*viral short interfering RNAs*, vsiRNAs). Estos vsiRNAs dirigen la degradación del genoma viral evitando la infección sistémica. Por otro lado, los vsiRNAs también pueden “mimetizar” la acción de determinados miRNAs de la planta provocando cambios en la expresión de algunos de sus genes (Fig. 7). Por ejemplo, los vsiRNA derivados de virus agudos como el CMV o el TYLCV son capaces de regular la expresión de genes de la planta como CHL1 y SIKNR1, respectivamente, induciendo la manifestación de síntomas en la planta (Smith et al. 2011; Yang et al. 2019). La señal del silenciamiento génico mediado por RNA puede transmitirse en las células vegetales mediante el movimiento de siRNAs de 24 nts generados por DCL3 a través de los plasmodesmos, alcanzando el tejido vascular y convirtiéndose en una respuesta sistémica (Baulcombe 2004; Molnar et al. 2010).

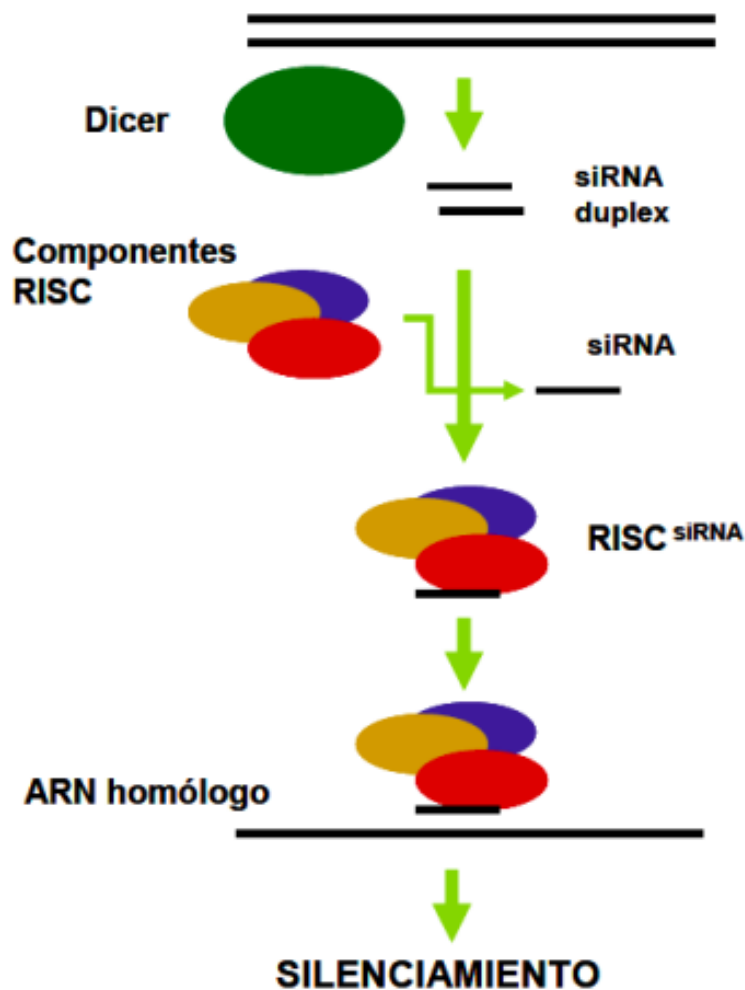


Figura 7. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA desencadenado en la célula huésped tras la entrada de un dsRNA exógeno. <https://www.chilebio.cl/wp-content/uploads/2015/09/Silenciamiento-g%C3%A9nico-en-plantas-ARNi.pdf>.

En los virus con genomas de ssRNA, los intermediarios de replicación de dsRNAs o zonas con fuertes estructuras secundarias del propio genoma activan el PTGS produciendo la degradación del RNA viral e impidiendo la multiplicación y dispersión del virus. En el caso de virus de dsRNAs, es el genoma viral el que directamente puede activar el PTGS. Finalmente, en virus de DNA, la degradación se produce a partir de dsRNA producidos durante el proceso de transcripción bidireccional del genoma (Landeo-Ríos et al. 2017). Para poder evitar este mecanismo de defensa, los virus han evolucionado codificando una o varias proteínas capaces de suprimirlo (*suppressor of RNA silencing*, VSR). Estas proteínas supresoras pueden ser multifuncionales y además

actuar a su vez en distintos puntos en la ruta de silenciamiento génico. Algunos ejemplos de VSR son la p14 del virus latente del poto (Photos latent virus, PoLV), p38 del virus de la arruga del nabo (Turnip crinkle virus, TCV), Ns del TSWV, p19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (Tomato bushy stunt virus, TBSV), p21 del virus de la tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus, CTV), la NS3 del virus del rayado del arroz (Rice stripe virus, RSV), HCPro del PVY, 2b de CMV y p122 del TMV (Chapman et al. 2004; Lakatos et al. 2006; Merai et al. 2006; Csorba et al. 2007; Goto et al. 2007; Kurihara et al. 2007; Martínez-Turiño and Hernandez 2009; Schnettler et al. 2010; Landeo-Ríos et al. 2017).

Interacción entre virus: infecciones múltiples

Las infecciones no solo por un virus sino por dos o más es un fenómeno habitual en los cultivos (Juarez et al. 2013). Cuando una planta es infectada por varios virus, éstos pueden interactuar de diferentes maneras, influyendo en algunos casos en los síntomas desencadenados. Las infecciones múltiples también pueden tener consecuencias en los procesos evolutivos de los virus (DaPalma et al. 2010; Tollenaere et al. 2016). Si la infección múltiple se establece simultáneamente en el huésped, hablaremos de coinfección, y si tiene lugar en distintos momentos temporales estaremos ante una superinfección. Esta secuencia temporal en la infección por diferentes virus puede determinar si la interacción es de tipo sinérgico a antagónico (Syller 2012).

El fenómeno de sinergismo tiene lugar por la supresión de los mecanismos de defensa del huésped y suele darse entre virus no relacionados filogenéticamente que coinfectan una planta (Syller 2012). Se han estudiado multitud de interacciones sinérgicas entre virus, entre las que destacan aquellas en la que está implicado algún potyvirus (género *Potyvirus*, familia *Potyviridae*). En este tipo de interacciones se observa que la presencia del potyvirus hace que aumente la concentración viral del otro virus. Esto es debido a la acción del HCpro (*helper component-proteinase*, HCPro) del potyvirus que es un VSR cuya acción supresora del PTGS favorece la replicación del otro virus (Syller 2012). Así, la acción de HCpro del PVY (potyvirus) favorece la replicación y el aumento de la concentración del virus X de la patata (Potato X virus, PVX) del género *Potexvirus* en una coinfección con ambos virus, incrementándose la intensidad de los síntomas. Otro

ejemplo es la interacción entre el potyvirus de la mancha anular de la papaya (Papaya ringspot virus, PRSV) y el potexvirus del mosaico de la papaya (Papaya mosaic virus, PapMV) que da lugar a un aumento de la concentración y de los síntomas inducidos por el PapMV en plantas de papaya (*Carica papaya*) (Syller 2012; Chávez-Calvillo et al. 2016). En algunas ocasiones excepcionales, el sinergismo puede darse entre dos aislados de un mismo virus, como por ejemplo los aislados del TSWV que pueden sobrepasar la resistencia conferida por el gen *Tsw* en pimiento, cuya presencia en plantas resistentes puede permitir la infección por aislados que no son capaces de superar dicha resistencia, produciendo una necrosis sistémica en la planta (Aramburu et al. 2015). En este caso, se desconoce el mecanismo subyacente mediante el cual se suprime o se limita la acción del gen *Tsw* en pimiento. También se considera sinergismo el fenómeno de dependencia de un *helper* (*Helper dependence*), en el que un virus *helper* ayuda a otro virus a infectar una planta, transmitirse a otras plantas o replicarse (DaPalma et al. 2010). Por ejemplo, los umbravirus no codifican en su genoma para una CP, por lo que no son capaces de transmitirse por los pulgones. Sin embargo, son capaces de utilizar las CPs de los *Luteovirus* (virus *helper*) en infecciones mixtas para poder transmitirse. Otro ejemplo es el enmovirus del mosaico del guisante 1 (Pea enation mosaic virus 1, PEMV-1) que solo es capaz de moverse entre células adyacentes cuando se encuentra en presencia del umbravirus del mosaico del guisante 2 (Pea enation mosaic virus 2, PEMV-2) (DaPalma et al. 2010; Syller 2012).

Las interacciones antagónicas se suelen producir entre virus relacionados filogenéticamente y que infectan una planta a diferentes tiempos (no simultáneamente). Un tipo de antagonismo es la “protección cruzada” que se ha empleado en algunos casos como herramienta de control de enfermedades en plantas. La protección cruzada implica que la infección de un aislado viral suave previene a la planta de la infección por un segundo aislado severo (DaPalma et al. 2010). Uno de los ejemplos sería el caso del PepMV donde se utiliza un aislado como el europeo (EU) para controlar a los aislados más severos como el chileno (CH). También se usó la protección cruzada con el ToMV en tomate con éxito hasta la aparición de variedades resistentes que portaban los genes de resistencia *Tm1* y *Tm2* (Rast 1975; Tennant et al. 1994). Desde hace tiempo hay evidencias experimentales de que en la protección cruzada interviene el PTGS. En estudios con el virus del estriado necrótico del tabaco (Tobacco rattle virus, TRV) y diferentes construcciones del PVX que contenían secuencias homologas del TRV, se

comprobó que la protección cruzada frente al TRV se producía por la pre-activación del complejo RISC a través de los vsiRNAs del TRV derivados de las construcciones del PVX (Ratcliff et al. 1999; Loebenstein 2005).

Otro tipo de interacción antagónica es la “exclusión mutua”, que se da entre dos o más virus que infectan un hospedador simultáneamente. Este fenómeno se estudió inicialmente en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con dos aislados de CMV pertenecientes a subgrupos diferentes, observándose que eran incapaces de infectar la misma célula simultáneamente (Syller 2012). Hasta el momento se desconoce el mecanismo que subyace en este tipo de interacciones.

El virus meridional del tomate

El virus meridional del tomate (Southern tomato virus, STV) es un virus del género *Amalgavirus* (familia *Amalgaviridae*) que tiene un genoma de dsRNA de 3.5 kb con dos pautas de lectura (*Open Reading frames*, ORFs) solapadas. En los extremos 5' y 3' hay regiones no traducibles (*untranslated regions*, UTR) de 137 y 110 nts respectivamente, con un alto contenido en adeninas y uracilos (Sabanadzovic et al. 2009). El ORF 1 (del nucleótido 138 al 1269) codifica para una proteína de función desconocida de 42.4 kDa (p42) (Fig. 8). Podría tratarse de una Cp pero hasta el momento no se han visualizados viriones al TEM (Sabanadzovic et al. 2009b; Elvira-González et al. 2019). Además, el análisis de la secuencia aminoacídica no muestra homología con otras CPs de virus relacionados filogenéticamente. El ORF 2 está solapado con el ORF 1 en 293 nucleótidos y se traduce como proteína de fusión de 122 kDa (p122) con función de RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp) mediante el desplazamiento del ribosoma (*Ribosomal frameshift +1*) (Sabanadzovic et al. 2009; Nibert et al. 2016). El STV tiene una organización genómica similar a los virus de la familia *Totiviridae* con una ORF que codifica para la RdRp y un ORF que codifica para una posible Cp, mientras que los análisis filogenéticos de la RdRp han demostrado similitudes con virus de la familia *Partitiviridae*. Por lo tanto, se sugirió la constitución de un nuevo taxón con entidad de familia denominado *Amalgaviridae* (Sabanadzovic et al. 2009). Más tarde, los análisis de estructura secundaria de proteínas mostraron similitudes de la p42 del STV con Cps de virus del género *Tenuivirus*, de manera que se sugirió que el ancestro común de los

Amalgavirus podría haber surgido por recombinación entre la RdRp de un *Partitivirus* y la Cp de un *Tenuivirus* (Krupovic et al. 2015).



Figura 8. Representación esquemática del genoma del virus meridional del tomate (STV).

Dentro del género *Amalgavirus* encontramos diferentes virus persistentes como el virus latente del arándano (Blueberry latent virus, BBLV), el virus del rododendro A (Rhododendron virus A, RhVA), el virus críptico de la vicia M (Vicia cryptic virus M, VCVM) y el STV que es la especie tipo de este género (Gandía et al. 2007; Sabanadzovic et al. 2009, 2010; Martin et al. 2012). El STV se transmite por semilla con una tasa de hasta el 80%, y se desconoce cualquier tipo de transmisión horizontal. A diferencia de lo que ocurre con totivirus y partitivirus, hasta la fecha no se han podido visualizar viriones del STV mediante TEM (Boccardo et al. 1987).

El STV se ha detectado en distintos países y ha sido asociado a una gran variedad de síntomas, sobre todo a desórdenes en la maduración y coloración del fruto. El virus ha sido detectado en zonas productoras de EEUU (California y Mississippi), en el sureste de México, Italia, Francia, China y Bangladesh (Sabanadzovic et al. 2009; Candresse et al. 2015; Iacono et al. 2015; Padmanabhan et al. 2015a, b; Verbeek et al. 2015). En España se detectó en el año 2015 en plantas de tomate var. Mariana que además estaban infectadas con diferente virus agudos como el ToTV, el virus clorótico del tomate (Tomato chlorosis virus, ToCV), el PepMV, el TSWV y el TYLCV (Verbeek et al. 2015). En algunos lugares de España, el STV ha sido asociado a un síndrome llamado “Falso PepMV” ya que los síntomas que mostraban las plantas se asemejaban mucho a los inducidos por el PepMV, aunque las plantas no estaban infectadas con este virus (Fig. 9). Finalmente, algunos autores también han reportado la presencia del virus en plantas de tomate sin sintomatología (Alcala-Briseno et al. 2017; Fukuhara et al. 2019).



Figura 9. Síntomas de “Falso PepMV” en frutos de tomate infectados con el virus meridional del tomate (STV) recogidos en parcelas de Gran Canarias. Se observa decoloración, maduración anormal y reducción del tamaño del fruto, similar a la descrita por otros autores previamente en tomates infectados con el virus (Sabanadzovic et al. 2009; Candresse et al. 2015; Iacono et al. 2015; Verbeek et al. 2015).

Justificación y Objetivos

El STV es un virus persistente con un genoma de dsRNA perteneciente al género *Amalgavirus* (familia *Amalgaviridae*) que infecta plantas de tomate. El cultivo de tomate es uno de los más importantes a nivel mundial por su alto valor nutricional. En España, el tomate es el principal cultivo hortícola, siendo nuestro país el segundo productor y exportador de Europa. Por tanto, la aparición de un posible agente patógeno que pudiese poner en peligro dicho cultivo tendría un importante impacto en el sector hortofrutícola. El STV fue detectado por primera vez en Estados Unidos y México en el 2009 asociado a alteraciones en el crecimiento de la planta y la maduración y coloración del fruto. A partir de este momento, el virus fue detectado en zonas productoras de diferentes países, en plantas que mostraban distintos tipos de síntomas. En España, el STV se detectó por primera vez en el 2015, y en algunos lugares se le relacionó con la enfermedad del “Falso PepMV” por la similitud con los síntomas inducidos por el PepMV en tomate. El STV se ha detectado frecuentemente en plantas con síntomas que resultaban infectadas con virus agudos como el ToTV, el ToCV, el PepMV, el TSWV y el TYLCV. Finalmente, el virus también se ha detectado en algunas plantas aparentemente asintomáticas. Por tanto, no queda clara la capacidad patogénica del STV y los daños que puede producir en el cultivo de tomate.

El conocimiento que se tiene sobre los virus persistentes en general y el STV en particular es muy limitado: no se han podido aislar partículas virales del STV y la única forma de transmisión conocida del virus es mediante semilla, donde se han reportado tasas de transmisión de hasta el 80%. Se desconoce la incidencia del virus en campo, la efectividad de las medidas de desinfección en la semilla y el efecto que tiene el STV en la planta, tanto en infecciones simples como en coinfecciones con otros virus. Con estos precedentes, en este trabajo de tesis doctoral hemos querido profundizar en el conocimiento del STV, abordando aspectos como el diagnóstico, incidencia del virus en los cultivos, dispersión y efecto en la planta en distintas condiciones. La información obtenida también podría ser extrapolable a la de otros virus persistentes, aumentando así el conocimiento sobre este grupo de virus.

Para ello, en esta tesis se han planteado los siguientes objetivos:

1. Puesta a punto de métodos que permitan una detección sensible del STV y una cuantificación del mismo, basados en técnicas moleculares como la amplificación isoterma RT-LAMP y la RT-qPCR. Esto nos permitirá estudiar la distribución del virus en la planta y semilla, su incidencia en importantes zonas productoras, así como las formas de dispersión del mismo.
2. Análisis de la diversidad genética y procesos que rigen la evolución del STV. Esto es importante para comprender la epidemiología del virus, así como desarrollar métodos de diagnóstico e implementar estrategias de control adecuadas.
3. Estudio de la interacción del STV con la planta hospedadora de tomate a través aspectos como la producción del fruto, inducción de síntomas, resistencia a condiciones de estrés salino y producción de siRNAs, tanto miRNAs endógenos como vsiRNAs de origen viral.
4. Estudio de la interacción del STV con otros virus agudos frecuentes del cultivo del tomate en infecciones múltiples. Esto nos permitirá determinar el papel que puede jugar el STV en plantas infectadas con dos importantes virus agudos que afectan al cultivo de tomate como el CMV y el PepMV evaluando la sintomatología, concentración viral y poblaciones de miRNAs y siRNAs.

Capítulo 1: Desarrollo de métodos de detección del virus meridional del tomate (STV)

Los resultados de este capítulo de la tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Elvira-González L, Puchades AV, Carpino C, Alfaro-Fernández A, Font-San-Ambrosio MI, Rubio L, Galipienso L (2018) Fast detection of southern tomato virus by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 241:11-14 <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jviromet.2016.12.004>.

Elvira-González L, Carpino C, Alfaro-Fernández A, Font-San-Ambrosio MI, Peiró R, Rubio L, Galipienso L (2018) A sensitive real time RT-PCR reveals a high incidence of southern tomato virus (STV) in Spanish tomato crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16:3 <https://doi.org/10.5424/sjar/2018163-12961>.

Introducción

El STV del género *Amalgavirus* (familia *Amalgaviridae*) se detectó en 2009 en plantas de tomate de México y Estados Unidos que mostraban síntomas de enanismo, decoloración y reducción del tamaño de los frutos (Sabanadzovic et al. 2009). Posteriormente, el virus fue detectado en otros países, algunos de la cuenca mediterránea como Francia, Italia y España, en los que el cultivo de tomate tiene una gran importancia socio-económica (Davino et al. 2010; Candresse et al. 2015; Verbeek et al. 2015). En estos países, el STV ha sido asociado a una gran diversidad de síntomas, aunque su implicación en el desarrollo de los mismos no ha sido aclarado hasta la fecha, fundamentalmente por dos motivos: i) el STV siempre ha sido detectado en presencia de otros virus patógenos del cultivo del tomate, como el ToCV, el PepMV, el ToMV, el PVY, el TSWV y el TYLCV y ii) el STV ha sido detectado en algunas plantas de tomate que no mostraban síntomas (Sabanadzovic et al. 2009; Alcalá-Briseno et al. 2017; Puchades et al. 2017). En España, el STV fue inicialmente detectado en unas plantas de tomate var. Mariana que también estaban infectadas con el ToTV, el PepMV, el TSWV y el TYLCV (Verbeek et al. 2015). En algunas zonas productoras del país, como Gran Canaria, el STV se asoció a una enfermedad denominada localmente “Falso PepMV” que se caracterizaba por una alteración en la maduración y coloración de los frutos similares a los inducidos por el PepMV, a pesar de no estar infectadas con dicho virus.

Dentro del género *Amalgavirus* se han descrito otros virus como el BBLV, el RhV-A y el VCV-M que no producen enfermedades y se transmiten solo de manera vertical, por lo que han sido considerados como virus persistentes. En contraposición, los virus agudos producen síntomas en las plantas que infectan, son capaces de transmitirse de forma horizontal y de moverse a través de los plasmodesmos de las células (Roossinck 2010). Para determinar si el STV es un virus patógeno, estudiar su incidencia y distribución, así como para establecer estrategias de control adecuadas, es necesario disponer de métodos de detección del virus que sean específicos y sensibles. Estos métodos deberían ser sencillos, rápidos y con capacidad de procesar un gran número de muestras simultáneamente con el fin de que puedan implementarse en los laboratorios de control fitosanitario. Una de las técnicas más empleadas por su sencillez y robustez (reproducibilidad) es el ELISA que emplea anticuerpos específicos contra proteínas

virales, normalmente la Cp. Sin embargo, esta técnica no se puede usar para detectar el STV ya que no se han podido aislar partículas ni proteínas virales (Sabanadzovic et al. 2009). Por tanto, el diagnóstico del STV se ha basado en la detección del ácido nucleíco viral. El primer método desarrollado fue la PCR convencional, mediante la cual se amplifica una región concreta del genoma del virus empleando unos cebadores específicos basados en su secuencia nucleotídica (Sabanadzovic et al. 2009). Más tarde, se puso a punto la detección del STV por hibridación molecular utilizando una sonda de RNA marcada con digoxigenina complementaria a una región viral que permitió analizar un gran número de muestras con un coste menor al de la PCR convencional (Puchades et al. 2017).

Además de la PCR convencional e hibridación molecular, existen otras técnicas de detección de ácidos nucleicos como la LAMP y la qPCR. Mediante la LAMP se lleva a cabo una amplificación de ácidos nucleicos de forma isoterma, lo que permite prescindir de termocicladores. La enzima empleada en la reacción es menos sensible a los inhibidores que la Taq DNA polimerasa que se emplea en la PCR convencional, por lo que en algunos casos se pueden utilizar extractos de material sin procesar para las reacciones de amplificación. Por tanto, la LAMP permite analizar un gran número de muestras sin necesidad de un equipamiento costoso. Además, se puede eliminar la fase de post-PCR mediante la adición al tubo de reacción de un intercalante de DNA que emite fluorescencia cuando es iluminado con luz ultravioleta (UV) en caso de que haya habido reacción de amplificación (Parida et al. 2008; Mori et al. 2013; Dhama et al. 2014). La LAMP ha sido utilizada para detectar un gran número de virus tanto en animales como en plantas (Fukuta et al. 2003a, b; Nie 2005; Herrera-Vásquez et al. 2017).

La amplificación de ácidos nucleicos por qPCR es más sensible que otras técnicas moleculares como la PCR convencional y la LAMP por lo que puede detectarse el virus en muestras con un título viral muy bajo. Además, permite determinar la concentración del virus en diferentes tejidos y en diferentes momentos de la infección. La monitorización a tiempo real de la amplificación también permite prescindir del procesamiento post-PCR, evitando las contaminaciones por amplicones que dan lugar a falsos positivos. La qPCR ha sido empleada con éxito para detectar y cuantificar una gran variedad de virus, incluyendo virus de plantas (Boonham et al. 2002; Gutiérrez-Aguirre et al. 2009; Ferriol et al. 2011; Rubio et al. 2020).

Este capítulo de la tesis se ha centrado en poner a punto un método sensible de diagnóstico del STV. Mediante RT-LAMP se ha detectado el virus a partir de extractos brutos obtenidos de diferentes tejidos de plantas infectadas sin necesidad de realizar electroforesis. Mediante RT-qPCR con sondas TaqMan, el STV se detectó con una gran sensibilidad y se determinó su concentración en diversos tejidos, incluyendo el embrión y la cubierta de la semilla. También se ha evaluado la variación de la acumulación viral en diferentes tiempos de la infección y se ha estimado la incidencia del STV en plantaciones comerciales de dos áreas productoras de tomate importantes en España, la Comunidad Valenciana (Castellón, Valencia y Alicante) y las Islas Canarias (Gran Canaria). Finalmente, se ha detectado el STV en plántulas distribuidas por viveros de la Comunidad Valenciana y en semillas tanto de variedades comerciales como de variedades locales de tomate.

Resultados

1.1 Detección de STV mediante RT-LAMP

La detección del STV mediante RT-LAMP se llevó a cabo inicialmente a partir de extractos de RNAs totales obtenidos de hojas de plantas de tomate infectadas con el virus. Para ello se diseñó un juego de tres parejas de cebadores diseñados en la región del genoma viral que codifica para la proteína p42 (materiales y métodos: RT-LAMP). Las reacciones de RT y amplificación se realizaron simultáneamente en un termobloque a 68°C durante 1 h. Los productos de reacción se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron mediante luz ultravioleta (UV) después de teñirse con un agente intercalante (GelRed). En los extractos correspondientes a las plantas de tomate infectadas con STV se podía observar un patrón de amplificación complejo compuesto por varias bandas producidas por las diferentes combinaciones de cebadores usados en la reacción (Fig. 1.1, Panel A). Como controles negativos se utilizaron extractos equivalentes de plantas de tomate no infectadas por el STV. Para comprobar la especificidad de la técnica, también se utilizaron extractos de RNAs totales de plantas de tomate infectadas con el ToMV y el PepMV, que son virus frecuentes en el cultivo de tomate y también se transmiten por semilla. Como se puede apreciar en el Panel A de la

Figura 1.1, en ninguno de estos extractos se observaban bandas, corroborando la especificidad de la técnica. Para simplificar el procedimiento y evitar la etapa de post-PCR, consistente en electroforesis y tinción del gel, se ensayó la detección del STV directamente en el tubo de reacción añadiendo GelRed. La aplicación de UV mediante una lámpara mostró fluorescencia en aquellos tubos donde se había producido amplificación, mientras que en los tubos que contenían los extractos de las plantas control no infectados y los infectados con el ToMV y el PepMV no se apreciaba fluorescencia. La reproducibilidad de esta técnica se comprobó realizando la RT-LAMP de extractos de RNAs totales de diez plantas infectadas con el STV y diez plantas control no infectadas.

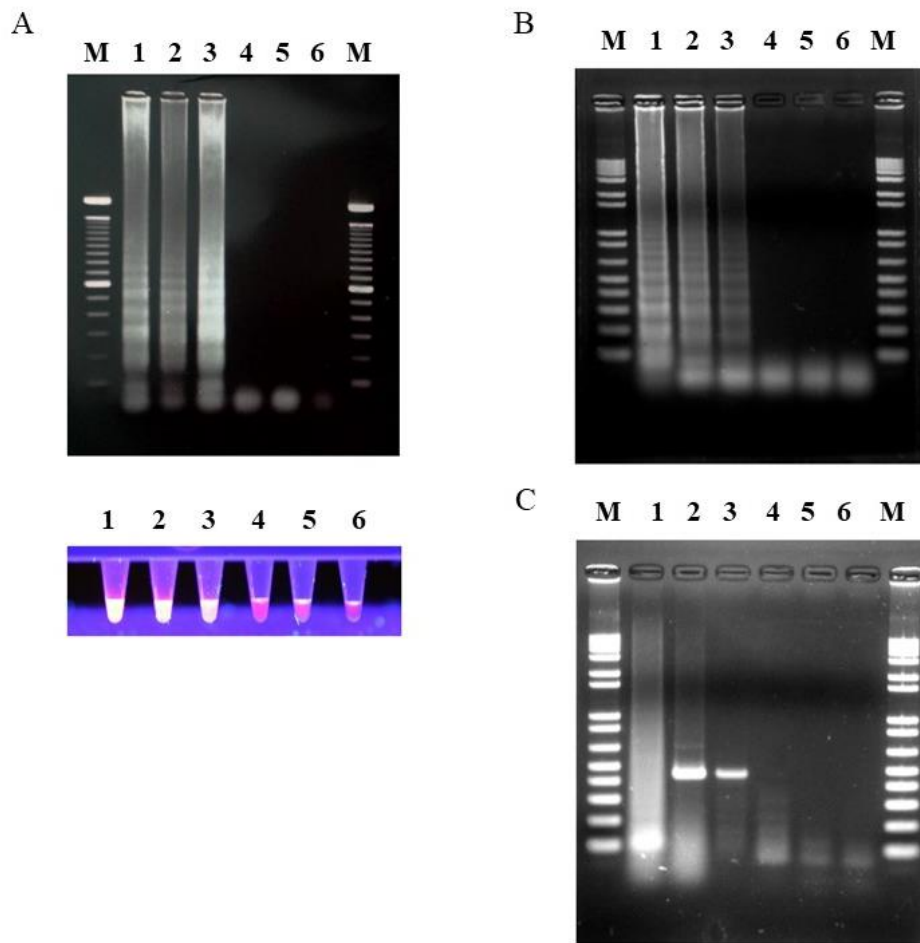


Figura 1.1. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-LAMP y RT-PCR convencional. En la parte superior del Panel A se muestra una electroforesis de los productos de amplificación por RT-LAMP a partir de extractos de RNAs totales de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV) (carriles 1 al 3), el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) (carril 4), el virus del mosaico del tomate (ToMV) (carril 5) y de planta de tomate sin infectar (carril 6); en la parte de abajo se muestra la fluorescencia directa en los tubos de reacción en los que había habido amplificación tras la incorporación de GelRed e iluminación con luz ultravioleta (UV). En el Panel B se muestra una electroforesis de los productos de amplificación obtenidos mediante RT-LAMP a partir de extractos de RNAs totales (100 ng/μl) de plantas de tomate infectadas con STV (carril 1) y diluciones seriadas 10^{-1} del mismo (carriles 2 al 6). En el Panel C se muestra el resultado de un ensayo equivalente al mostrado en el Panel B, pero empleando la RT-PCR convencional (carriles 1 al 6). El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares 1 Kb (Thermo Fisher, Walthman, USA).

A continuación, se determinó la sensibilidad de la RT-LAMP y se comparó con la de RT-PCR convencional empleando diluciones seriadas 10^{-1} de extractos de RNAs totales obtenidos a partir de tejido de hoja de tomate infectado con el STV y ajustado a 100 ng de RNA total/ μ l. El protocolo de RT-PCR usado en estos experimentos fue el descrito por Sabanadzovic et al. 2009. Los productos de amplificación obtenidos mediante RT-LAMP y RT-PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. En la Figura 1.1, Paneles B y C se puede observar que ambas técnicas exhibieron idéntica sensibilidad, situándose el límite de detección en la dilución 10^{-2} de RNA total, equivalente a 1 ng de RNA total/ μ l. Por otro lado, y a diferencia de lo que ocurría en la RT-LAMP, la RT-PCR convencional dio un falso negativo en los extractos de 100 ng de RNA total/ μ l, posiblemente por acción de sustancias inhibidoras presentes en el extracto (compuestos fenólicos, polisacáridos, etc.).

La presencia del STV en diferentes partes de la planta se determinó mediante RT-LAMP a partir de extractos de RNAs totales obtenidos de raíz, hoja y fruto de plantas de tomate infectadas con el virus. Como controles negativos se emplearon extractos equivalentes obtenidos a partir de plantas no infectadas por el STV. Paralelamente, se analizó la presencia del STV en semillas de tomate a partir de extractos de RNAs totales obtenidos de grupos de cinco semillas generadas de plantas que estaban infectadas con el STV. Como control se utilizaron semillas generadas de plantas que no tenían el STV. La RT-LAMP detectó el STV en todas las partes de la planta, incluyendo las muestras de semillas analizadas (Fig. 1.2).

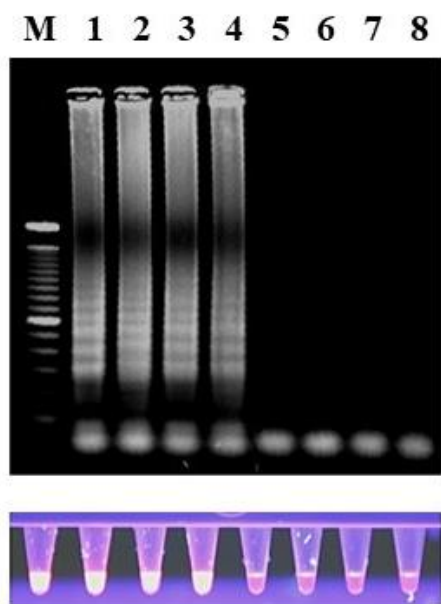


Figura 1.2. Análisis de los productos de amplificación obtenidos por RT-LAMP mediante electroforesis en geles de agarosa (parte superior) y fluorescencia directa en tubo (parte inferior) de extractos de RNA totales obtenidos a partir de fruto, hoja y raíz de plantas de tomate infectadas con el virus meridional de tomate (STV) (carriles 1 al 3, respectivamente) y semillas generadas de plantas de la misma variedad infectadas con el virus (carril 4). Como controles negativos se emplearon tejidos equivalentes de plantas (carriles 5-7) y de semillas (carril 8) de tomates no infectados por el STV. El carril M corresponde al marcador de pesos moleculares 1 Kb (Thermo Fisher, Waltham, USA).

Para simplificar el procedimiento y posibilitar el análisis de muchas muestras de manera simultánea, se ensayó la RT-LAMP directamente a partir de extractos brutos (sin procesar) de tejido de hoja de tomate infectado con el STV, ajustados a 100 ng de RNA total/ μ l y diluciones seriadas 10^{-1} . Como control negativo se usaron extractos equivalentes y sus respectivas diluciones, a partir de plantas de tomate de la misma variedad, que no estaba infectadas por el STV. Mediante electroforesis en geles de agarosa sólo se pudieron visualizar productos de amplificación del genoma viral en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} de los extractos brutos obtenidos a partir de plantas infectadas con el STV mientras que no se observó amplificación en las muestras correspondientes a los controles negativos, ni en ninguna de sus diluciones (Fig. 1.3, Panel A). Paralelamente, se realizó el mismo ensayo mediante RT-PCR convencional, aunque en este caso no se

obtuvo amplificación en ninguna de las muestras analizadas (Fig. 1.3, Panel B). La reproducibilidad de la detección del STV mediante RT-LAMP a partir de extractos brutos de tejido, se evaluó con las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} de los extractos de hojas de 50 plantas de tomate recogidas en parcelas comerciales (una hoja por planta). Estas plantas se habían analizado previamente por RT-PCR convencional a partir de extractos de RNAs totales de hojas, comprobando que nueve de las 50 plantas estaban infectadas por el virus. Los resultados de RT-LAMP mostraron que las mismas nueve plantas positivas para el STV por RT-PCR convencional también eran positivo para el virus mediante RT-LAMP. Las diluciones de los extractos brutos obtenidos de estas nueve plantas se analizaron mediante RT-PCR convencional, no obteniéndose amplificación alguna (datos no mostrados).

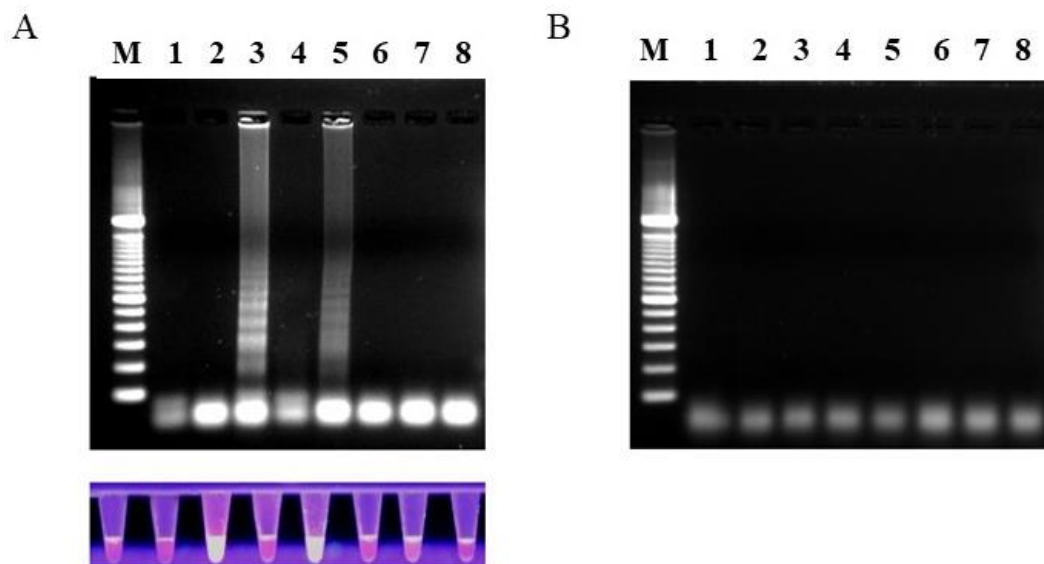


Figura 1.3. Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación obtenidos por RT-LAMP (Panel A) y RT-PCR convencional (Panel B) de extractos brutos sin procesar obtenidos a partir de hojas de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV) ajustados a 100 ng de RNA total/ μ l y diluciones seriadas 10^{-1} del mismo (carriles 1, 3, 5, 7, respectivamente), y el material equivalente con plantas sin infectar (carriles 2, 4, 6, 8, respectivamente). En la parte inferior del Panel A se muestra la fluorescencia directa en tubo de reacción de los productos amplificados.

1.2 Detección y cuantificación del STV mediante RT-qPCR

Para la detección y cuantificación del STV mediante RT-qPCR se diseñaron unos cebadores y una sonda TaqMan en la región genómica del virus que codifica para la p42 (Anexo: material suplementario 6). Las reacciones de RT y amplificación se llevaron a cabo empleando el kit comercial *OneStep PrimeScript RT-PCR* (TaKaRa, Kusatsu, Japón) siguiendo las condiciones descritas en el apartado de materiales y métodos: RT-qPCR. Para la puesta a punto de la técnica se ensayaron diferentes concentraciones de cebadores y sonda, siendo la correspondiente a 0.2 μ M tanto para la sonda como para los cebadores la que mostraba una mayor eficiencia con los valores menores de Ct. La sensibilidad se estimó a partir de diluciones seriadas de RNA de concentración conocida en las que se obtuvo una sensibilidad de hasta 10^8 moléculas para la hibridación molecular, 10^6 para la RT-PCR convencional o RT-LAMP y 10^4 para la RT-qPCR (Elvira-González et al. 2017; Puchades et al. 2017).

Con el objetivo de llevar a cabo una cuantificación absoluta de la concentración del STV en tejidos de la planta, se elaboró una curva patrón a partir de transcritos obtenidos in vitro de la región amplificada. Se obtuvo un rango dinámico de 10^4 hasta 10^{11} moléculas o copias/ng de RNA total, un coeficiente de correlación próximo a uno ($R^2 = 0.99$), un coeficiente de amplificación mayor a 99% y un coeficiente de variación menor al 0.5% (Fig. 1.4). Se detectaron hasta 10^3 copias/ng total de RNA, pero la estimación de la concentración viral no es fiable ya que se sale del rango dinámico de la curva patrón.

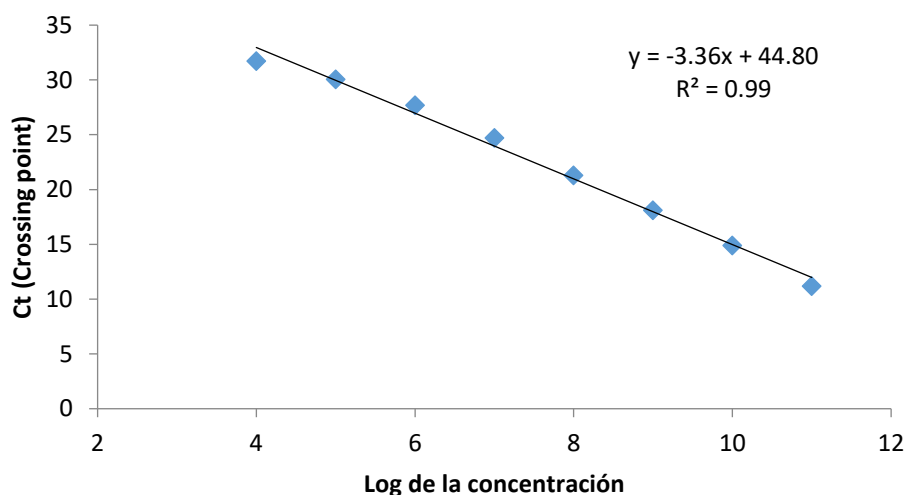


Figura 1.4. Curva estándar para la cuantificación absoluta del virus meridional del tomate (STV) elaborada a partir de diluciones seriadas 10^{-1} de un transcrito de RNA correspondiente a la región genómica del virus que codifica para la proteína p42. En el eje de abscisas se muestra el logaritmo de la concentración del virus y en el eje de ordenadas el valor de Ct. En la parte superior derecha se muestra la recta de regresión obtenida (y) y el coeficiente de correlación de dicha ecuación (R^2).

Para estudiar la concentración del STV en diferentes partes de la planta, se utilizaron extractos de RNAs totales obtenidos de hoja, raíz y fruto de diez plantas de tomate infectadas con el STV. Paralelamente se analizaron extractos de RNAs totales obtenidos de semillas individuales generadas de plantas de tomate de la misma variedad, infectadas con el STV. Como controles negativos se utilizaron tejidos equivalentes y semillas generadas de plantas que no tenían el virus. Los resultados mostraron que el STV se acumulaba en mayor cantidad en raíz y hoja alcanzándose concentraciones promedio de 2.00 y 2.38×10^7 copias/ng de RNA total, respectivamente, con respecto fruto y semilla donde las concentraciones promedio eran de 3.26 y 2.62×10^6 copias/ng de RNA total, respectivamente (Fig. 1.5, Panel A). Los valores de concentración promedio obtenidos en raíz y hoja mostraban diferencias estadísticamente significativas con respecto a los obtenidos en fruto y semilla (P -valor ≤ 0.05). A continuación, se estimó la concentración de STV en el tejido embrionario y en la cubierta de las semillas generadas a partir de plantas de tomate infectadas con el virus. El STV se acumulaba significativamente en mayor cantidad en el embrión que en la cubierta (P -valor ≤ 0.05), con valores promedio

de 2.31×10^6 y 4.24×10^5 copias /ng de RNA total, respetivamente (Fig. 1.5, Panel B). Además, las semillas presentaban un elevado índice de infección ya que el STV fue detectado en ocho de las de las diez semillas analizadas.

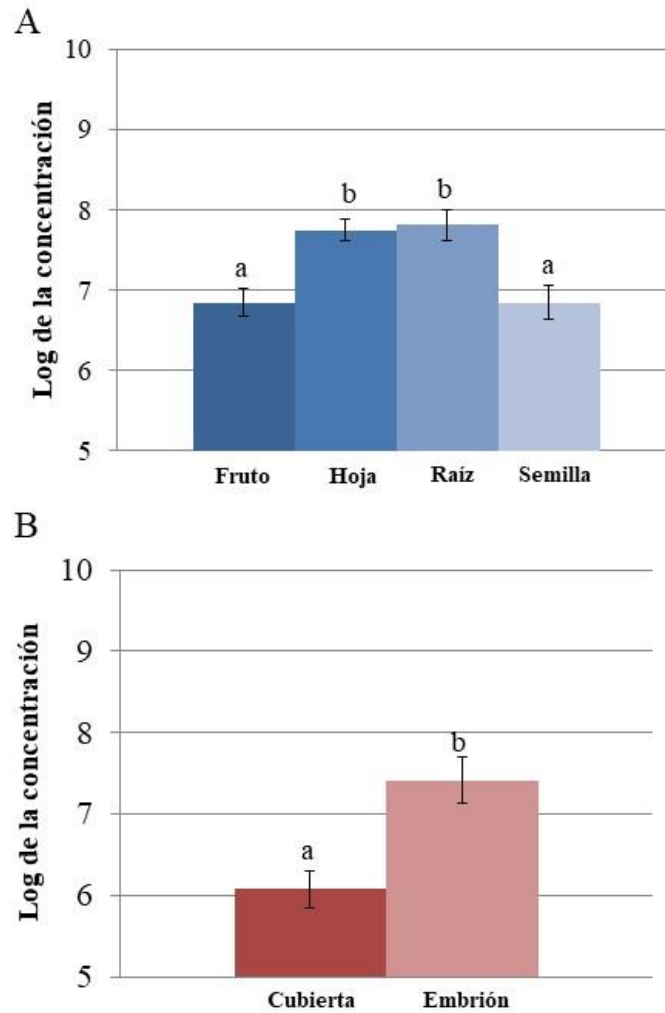


Figura 1.5. Representación del logaritmo de la concentración del virus meridional del tomate (STV) (eje de ordenadas) correspondiente a la media de copias /ng de RNAs totales extraídos de fruto, hoja, raíz y semilla de plantas de tomate infectadas con el STV (Panel A) y de la cubierta y embrión de semillas obtenidas de plantas de tomate de la misma variedad infectadas con el virus (Panel B). Las barras representan el error estándar y los índices *a* y *b* los dos grupos con diferencias significativas (P-valor ≤ 0.05).

La RT-qPCR también permitió determinar la concentración del STV en plantas de tomate en diferentes tiempos. Para ello se analizaron los RNAs totales de hojas apicales a los 7, 14, 21, 28 y 35 días de la formación de las primeras hojas verdaderas de diez plantas de manera individual. Se obtuvieron valores promedio de 1.66, 6.94, 4.31, 5.16 y 4.10×10^7 copias/ng de RNA total para cada uno de los tiempos señalados, respectivamente (Fig. 1.6). El análisis estadístico mostró que estos valores no fueron significativamente distintos (P -valor ≥ 0.05) indicando que el STV se mantiene a una misma concentración a lo largo del tiempo.

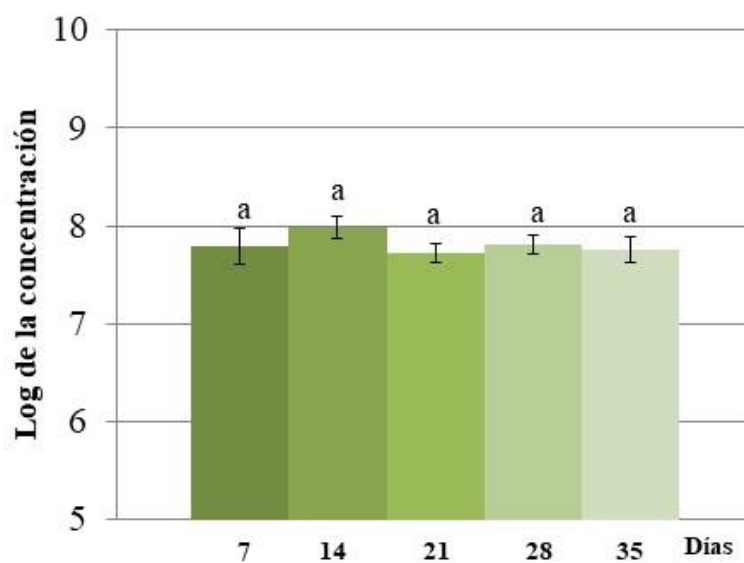


Figura 1.6. Representación del logaritmo de la concentración del virus meridional del tomate (STV) (eje de ordenadas) correspondiente a los valores medios de las copias/ng de RNA total extraído de hoja de diez plantas de tomate infectadas con el virus a los 7, 14, 21, 28 y 35 días después de la formación de las primeras hojas verdaderas de las plántulas (eje de abscisas). Las barras representan el error estándar y el índice el único grupo significativo (P -valor ≤ 0.05).

1.3 Detección del STV en plantaciones comerciales de tomate, en plántulas distribuidas por viveros y en lotes de semillas de diferentes variedades

La puesta a punto de técnicas sensibles y específicas para la detección del STV nos permitió evaluar la incidencia del virus en plantaciones comerciales de la Comunidad Valenciana y Gran Canaria, que son dos zonas productoras de tomate importantes en España. Para ello, se recolectaron muestras de 215 plantas de 14 variedades de tomate en diferentes localidades de las provincias de Alicante, Valencia y Castellón (Comunidad Valenciana) y de la isla de Gran Canaria (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Incidencia del virus meridional del tomate (STV) en plantaciones comerciales de diferentes localidades la Comunidad Valenciana y de la isla de Gran Canaria.

Localización	Variedad de tomate	Nº de plantas analizadas	Nº de plantas infectadas con STV
Campo 1 (Benicarló, Castellón, Comunidad Valenciana)	Properlians ^L	10	0
Campo 2 (Benicarló, Castellón, Comunidad Valenciana)	Mesapico ^C	15	0
Campo 3 (Liria, Valencia, Comunidad Valenciana)	Valenciano ^L	20	0
Campo 4 (Liria, Valencia, Comunidad Valenciana)	Optima ^C	12	0
Campo 5 (Perelló, Valencia, Comunidad Valenciana)	Montane ^L	9	7
Campo 6 (Perelló, Valencia, Comunidad Valenciana)	Trujillo ^C	11	2
Campo 7 (Perelló, Valencia, Comunidad Valenciana)	Rosa ^C	9	0
Campo 8 (Perelló, Valencia, Comunidad Valenciana)	Raf ^C	10	5
Campo 9 (Novelda, Alicante, Comunidad Valenciana)	Anaivis ^C	24	22
Campo 10 (San Vicente del Raspeig, Alicante, Comunidad Valenciana)	Cherry ^C	10	7
Campo 11 (Muchamiel, Alicante, Comunidad Valenciana)	Canario ^C	10	7
Campo 12 (Alicante, Alicante, Comunidad Valenciana)	Cherry ^C	11	7
Campo 13 (Segorbe, Valencia, Comunidad Valenciana)	Valenciano ^L	7	1
Campo 14 (Macastre, Valencia, Comunidad Valenciana)	Teticabra ^L	7	7
Campo 15 (Agüimes, Isla de Gran Canarias)	Tolentina ^C	10	9
Campo 16 (Agüimes, Isla de Gran Canarias)	Boludo ^C	10	9
Campo 17 (Agüimes, Isla de Gran Canarias)	Boludo ^C	10	10
Campo 18 (Agüimes, Isla de Gran Canarias)	Boludo ^C	10	9
Campo 19 (Santa Lucia de Tirajana, Isla de Gran Canaria)	Boludo ^C	10	9
Total:	14 ⁽¹⁾	215 ⁽²⁾	111 ⁽³⁾

L, variedad local de tomate

C, variedad comercial de tomate

(1) Número total de variedades analizadas

(2) Número total de plantas analizadas

(3) Número total de plantas infectadas con el STV

Para el análisis de las muestras de campo se utilizaron extractos de RNAs totales obtenidos de hojas apicales de plantas de tomate. El STV se detectó en nueve de los 14

campos analizados de la Comunidad Valenciana (64%) y en todos los campos de la isla de Gran Canaria (100%). Por otro lado, teniendo en cuenta el número de plantas analizadas, la incidencia del virus en la Comunidad Valenciana fue del 39% (se detectó STV en 65 plantas de un total de 165 plantas analizadas) y del 92% en la isla de Gran Canaria (se detectó el STV en 46 de las 50 plantas analizadas).

Para determinar si la alta incidencia del virus en campo podía estar relacionada con el suministro a los agricultores de material infectado, se analizaron plántulas de tomate procedentes de diferentes viveros y semillas de distintas variedades, tanto comerciales como locales generadas por los propios agricultores. La detección del STV en plántulas de tomate se llevó a cabo en 39 viveros localizados en las tres provincias de la Comunidad Valenciana (Alicante, Valencia y Castellón). Las plántulas analizadas correspondían a 32 variedades de tomate comerciales y siete locales y los análisis se realizaron en grupos de cinco plantas por cada variedad. Para la detección del STV en lotes de semillas de tomate se analizaron un total de 27 variedades, de las cuales 20 eran comerciales y siete locales. En este caso, para simplificar el procedimiento se analizaron grupos de diez semillas por cada variedad. Los resultados obtenidos mostraron una alta incidencia del STV tanto en las plántulas de tomate distribuidas por viveros como en semillas (Tabla 1.2). El virus se detectó en 34 de los 39 viveros analizados (87%). Del total de las 32 variedades de tomate comerciales analizadas, 29 estaban infectadas con el STV (90%) mientras que, en las variedades de tomate locales, el STV se detectó en cinco de las siete variedades analizadas (71%). Los resultados tras el análisis de lotes de semillas de tomate mostraron nuevamente una elevada incidencia del virus, detectándose en 22 de las 27 variedades analizadas (81%). El STV estaba presente en todas las variedades comerciales (100%) mientras que solo estaban presentes en dos de las siete variedades locales analizadas (28%).

Tabla 1.2. Variedades de tomate analizadas para determinar la presencia del virus meridional del tomate (STV) en plántulas distribuidas por viveros de la Comunidad Valenciana y en semillas correspondientes a variedades comerciales y locales.

Genotipo	Origen	Presencia de STV	Genotipo	Origen	Presencia de STV
Valenciano ^L	Plántula/Semilla	+	Maxifort ^C	Plántula /Semilla	+
Malpica ^C	Plántula	+	Corazón de Buey ^L	Plántula	-
Amstrog ^C	Plántula	+	Muchamiel ^L	Plántula	+
Anairis ^C	Plántula	+	Penjar ^L	Plántula	+
Barón ^C	Plántula	+	Pera Caña ^L	Plántula	-
Cándido ^{L,C}	Plántula	+	Pera de Orihuelo ^L	Plántula	+
Conquita ^C	Plántula	+	Cofrentes ^L	Semilla	-
Dumas ^C	Plántula	+	Campillo ^L	Semilla	-
Ercole ^C	Plántula	+	Pimiento ^L	Semilla	+
Eufrates ^C	Plántula	+	Amarillo-Rojo ^L	Semilla	-
Flavoriti ^C	Plántula	+	Colgar ^L	Semilla	-
Globe Troter ^C	Plántula	+	Mutxamiel ^L	Semilla	-
Goreti ^C	Plántula	-	Angelle ^C	Semilla	+
Ibagarza ^C	Plántula	+	Angellety ^C	Semilla	+
Jack ^C	Plántula	+	Bambelo ^C	Semilla	+
Jupiter ^C	Plántula	+	Boludo ^C	Semilla	+
Juri ^C	Plántula	-	Brentyla ^C	Semilla	+
Kykuyu ^C	Plántula	+	Dorothy ^C	Semilla	+
Maties ^C	Plántula	+	Guindo ^C	Semilla	+
Montenegro ^C	Plántula	+	Invictus ^C	Semilla	+
Olympe ^C	Plántula	+	Katalina ^C	Semilla	+
Optima ^C	Plántula	+	Mariana ^C	Semilla	+
Ramyle ^C	Plántula	+	Marinova ^C	Semilla	+
Red Robin ^C	Plántula	-	Mini star ^C	Semilla	+
Red Sky ^C	Plántula	+	Ornela ^C	Semilla	+
Rio Grande ^C	Plántula	+	Realeza ^C	Semilla	+
Robin ^C	Plántula	+	Seychelles ^C	Semilla	+
Royesta ^C	Plántula	+	Shirem ^C	Semilla	+
Top111 ^C	Plántula	+	Sumer sun ^C	Semilla	+
Tovi Sacro ^C	Plántula	+	Sybilla ^C	Semilla	+
Tyking ^C	Plántula	+	Vernal ^C	Semilla	+
Vilma ^C	Semilla	+			

L, variedad local de tomate

C, variedad comercial de tomate

Discusión

En este capítulo de la tesis se ha puesto a punto la detección específica y sensible del STV mediante dos técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la RT-LAMP basada en una reacción isoterma, y la RT-qPCR que permite una monitorización de la amplificación en tiempo real. La puesta a punto de estas dos técnicas ha mejorado el diagnóstico del virus, que hasta la fecha se hacía por RT-PCR convencional e hibridación molecular ya que el STV no se puede detectar por ELISA al no disponer de anticuerpos específicos contra el virus (Sabanadzovic et al. 2009; Puchades et al. 2017). La RT-LAMP ha permitido detectar el STV con una sensibilidad igual a la de la RT-PCR convencional, sin la necesidad de usar termocicladores, y con una sensibilidad 100 veces mayor a la hibridación molecular y permitió visualizar los productos de reacción añadiendo directamente GelRed en el tubo, sin necesidad de hacer una electroforesis en gel de agarosa. Esto supone una gran ventaja sobre la RT-PCR convencional, ya que permite suprimir la etapa de post-PCR, simplificando el procedimiento y ahorrando tiempo y dinero. Además, al no tener la necesidad de hacer electroforesis se evitan las contaminaciones por amplicones y se reducen los falsos positivos. Finalmente, gracias a la resistencia de las enzimas de la RT-LAMP a los inhibidores se consiguió detectar el STV a partir de extractos brutos sin procesar, evitando la purificación de RNA de la planta y permitiendo procesar un gran número de muestras. Por otra parte, los costes de los reactivos empleados en RT-LAMP son mucho menores que los de la RT-PCR, abaratando notablemente el proceso. Por todo ello, la LAMP es adecuada para ser implementada en los análisis rutinarios que se hacen en los laboratorios sanitarios, tanto de virus animales como vegetales, sobre todo en aquellos que tengan un déficit de personal cualificado y equipamientos (Alhassan et al. 2007; Hayashida et al. 2015; Chotiwan et al. 2017). La LAMP y su variante la RT-LAMP se ha empleado con éxito para la detección de numerosos virus, tanto en animales como en plantas. Como ejemplos, citar que se ha realizado con éxito la detección del virus H1N1 y el HIV en humanos, el virus de la septicemia hemorrágica (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) en salmones, y en plantas diversos virus como el CTV, el TSWV, el PYMPV, el ToLCSiV y el TYMoV (Poon et al. 2005; Soliman and El-Matbouli 2006; Curtis et al. 2008; Bhat et al. 2013; Wang et al. 2013; Budziszewska et al. 2016; Herrera-Vásquez et al. 2017). En plantas, se ha podido detectar “*in situ*”, sin necesidad de análisis en el laboratorio, algunos patógenos

empleando sistemas de extracción en bruto muy simples y visualizando la reacción mediante floculación de nanopartículas (Wee et al. 2015; Nurul Najian et al. 2016).

En este trabajo también se ha puesto a punto la detección y cuantificación del STV mediante RT-qPCR empleando una sonda TaqMan específica. Con esta técnica, el nivel de detección del virus se estableció en 10^3 copias/ng de RNA total, siendo 100 veces más sensible que la RT-LAMP o RT-PCR convencional y 10000 más sensible que la hibridación molecular. El rango dinámico de cuantificación fiable fue desde 10^4 hasta 10^{11} copias/ng de RNA total, similar al reportado para otros virus que infectan tomate como el TSWV, el PepMV o el BBWV (Ling et al. 2007; Debreczeni et al. 2011; Ferriol et al. 2011). La alta sensibilidad de la RT-qPCR respecto a otras técnicas diagnósticas permite que esta pueda ser utilizada para el diagnóstico de virus que se encuentran en bajas concentraciones, por ello desde hace mucho tiempo es habitual su uso en los laboratorios de diagnóstico (Mackay et al. 2002; Bustin et al. 2005; Logan et al. 2009). Sin embargo, el elevado coste de los equipos (termociclador y equipos informáticos) y de los reactivos resulta limitante para su uso en algunos países en desarrollo. La cuantificación del STV en distintas partes de la planta mostró que éste se acumulaba en diferentes concentraciones dependiendo del tejido, siendo mayor en hoja y raíz que en fruto y semilla. Así, se recomienda que el diagnóstico del STV se lleve a cabo con los tejidos de la planta donde hay una mayor concentración viral. Según nuestro conocimiento, éste es el primer análisis de distribución viral en diferentes tejidos realizado en virus persistente. En virus agudos, este tipo de estudios es más frecuente. Así, se han encontrado diferencias en la concentración viral en distintos tejidos vegetales, como por ejemplo el virus de la raya parda de la yuca (Cassava brown streak virus, CBSV) que alcanza una mayor concentración en raíz que en la parte aérea de la planta (Ogwok et al. 2015) o el CTV donde se ha observado una mayor concentración viral en el fruto respecto a las hojas (Ruiz-Ruiz et al. 2007). La elevada sensibilidad de la RT-qPCR también permitió detectar el STV en semillas individuales, obteniéndose tasas de infección cercanas al 80% para los tomates utilizados en estos ensayos. El elevado índice de infección del STV en semillas coincide con el reportado por otros autores y es mucho más elevado que el de virus agudos que infectan tomate y se transmiten por semilla como el ToMV, el TMV o el PepMV, para los que se han descrito tasas del 17%, 5% y 0.026%, respectivamente (Hadas et al. 2004; Córdoba-Sellés et al. 2007; Sabanadzovic et al. 2009; Hanssen et al. 2010b). La cuantificación del STV en diferentes partes de la semilla mostró que el virus se acumulaba en mayor cantidad en el embrión que en la cubierta. Esto sugiere que el

virus podría llegar directamente al embrión desde las células sexuales y no por una infección desde la cubierta durante el proceso de germinación de la semilla como ocurre con el ToMV y el PepMV (Sastry 2013a). La presencia del virus en el embrión y la elevada tasa de transmisión por semilla es típica de los virus persistentes como el virus críptico del jalapeño (Pepper cryptic virus 1, PCV-1), en el que las tasas de infección de semillas son prácticamente del 100% (Arancibia et al. 1995). La infección del embrión tiene una gran implicación en el control del STV ya que dificulta enormemente su eliminación de la semilla mediante los métodos tradicionales basados en la desinfección con hipoclorito sódico y los tratamientos térmicos con calor (Sastry 2013b). La evaluación de la concentración del STV en diferentes tiempos mediante RT-qPCR indicó que el título viral no sufría cambios remarcables a lo largo del tiempo. Esto concuerda con la hipótesis de que el STV sea un virus persistente que infecta a la planta durante todo su ciclo vital y lo diferencia de los virus agudos, cuya concentración suele variar con el tiempo en función de la tasa de replicación, movimiento o activación/silenciamiento de los mecanismos de defensa de la planta (Ferriol et al. 2011; Tromas et al. 2014).

Los análisis en plantaciones de tomate comerciales, plántulas distribuidas por viveros y lotes de semillas mostraron una elevada incidencia del STV, muy superior a la de otros virus agudos transmitidos por semilla como el PepMV y el ToMV que infectan el cultivo y están presentes en la zona. Se han reportado elevadas incidencias en otros virus persistentes. Por ejemplo, la incidencia del WCCV-1 (familia *Partitiviridae*) puede alcanzar el 50% en plantas de trébol, el BCV (familia *Partitiviridae*) puede tener incidencias de hasta del 100% en plantas de remolacha, o la incidencia del virus críptico de la hierba del centeno (Ryegrass cryptic virus, RCV) (familia *Partitiviridae*) que puede llegar al 83% en el cultivo de centeno (Boccardo et al. 1987; Guy and Gerard, 2016; Natsuaki et al. 1983). Las plantas y plántulas de tomate infectadas con el STV, recolectadas en campo, viveros y las empleadas en los experimentos de detección descritos en este capítulo de la tesis no mostraban síntomas, lo que sugiere que el STV no es el causante de manera directa de ninguna patología en el cultivo. Esto coincide con otros ensayos de detección mediante hibridación molecular realizados en nuestro laboratorio y en prospecciones de campo realizadas en otros países donde plantas de tomate infectadas con el STV tampoco mostraban síntomas (Sabanadzovic et al. 2009; Alcalá-Briseno et al. 2017; Puchades et al. 2017). Esta ausencia de síntomas se describe en otros virus de la familia *Amalgaviridae* como el BBLV o en virus persistentes de familias relacionadas como el virus críptico de la zanahoria (Carrot cryptic virus, CCV),

el WCCV-1 o el PCV-1 (Arancibia et al. 1995; Roossinck 2010; Martin et al. 2011). La ausencia de síntomas puede deberse a que estos virus no sean patógenos, sino que establezcan otro tipo de relaciones con sus hospedadores. Se ha observado un efecto simbiótico en algunos virus persistentes como por ejemplo el BCV, que aumenta la productividad de la planta en condiciones de estrés hídrico (Roossinck et al. 2011). Por otro lado, el WCCV-1 es capaz de establecer una estrecha relación con bacterias fijadoras de N_2 en plantas de trébol blanco, ya que la Cp del virus puede bloquear el factor de nodulación producido por las bacterias encargado de la formación de nódulos fijadores de N_2 en las raíces de la planta. En ambientes con exceso del gas, el virus bloquea la nodulación, permitiendo a la planta ahorrar los recursos necesarios en este proceso (Nakatsukasa-Akune et al. 2005; Roossinck 2015b). Finalmente, se desconoce el papel que puede jugar el STV en coinfecciones con virus agudos tanto en la modulación de los síntomas como en la multiplicación de los virus agudos (véase el Capítulo 3).

Capítulo 2: Diversidad genética y evolución del virus meridional del tomate (STV)

Parte de los resultados mostrados en este capítulo de la tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Elvira-González L, Rubio L, Galipienso L (2020) Geographically distant isolates of the persistent Southern tomato virus (STV) show very low genetic diversity in the putative coat protein gene. *Virus genes* 56:668–672 <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01785-x>.

Introducción

El STV (género *Amalgavirus*, familia *Amalgaviridae*) tiene un genoma compuesto por una molécula de dsRNA de 3.5 kb con dos ORFs solapantes. La organización genómica del virus es similar a la de la familia *Totiviridae*, con un ORF en la parte 5' terminal que codifica para una hipotética Cp, denominada p42, y con otro ORF en la parte 3' terminal que codifica para la RdRp, que se sintetiza como una proteína de fusión por desplazamiento de un nucleótido (+1) en el marco de lectura del ribosoma (Nibert et al. 2016). Los estudios filogenéticos previos realizados con la RdRp del STV indicaron una relación con la familia *Partitiviridae* (Sabanadzovic et al. 2009). Sin embargo, esto no ocurría con el ORF de la Cp, que no mostraba similitudes de secuencia con ningún virus conocido, aunque sí a nivel estructural (estructura secundaria de la proteína) con Cps de miembros del género *Tenuivirus*, que son virus agudos (Sabanadzovic et al. 2009; Krupovic et al. 2015). Todo ello sugiere que el ancestro de los amalgavirus podría haber surgido por recombinación entre miembros del grupo de los partitivirus, de los que habría obtenido la RdRp, y miembros del grupo de los tenuivirus, de los que habría obtenido la Cp (Krupovic et al. 2015).

El estudio de la diversidad genética de los virus y los mecanismos que rigen su evolución son importante para comprender la epidemiología viral así como desarrollar métodos de diagnóstico e implementar estrategias de control (Acosta-Leal et al. 2011; Grenfell et al. 2004; Rubio et al. 2020). Estos estudios son mucho más abundantes en virus agudos (García-Arenal et al. 2001; Rubio et al. 2013) que en virus persistentes, que prácticamente son inexistentes. En este capítulo de la tesis se ha realizado un análisis de la diversidad genética del STV y se han estudiado los mecanismos implicados en la evolución del virus.

Resultados

El estudio de diversidad genética del STV se realizó con el ORF que codifica para la Cp del virus. Para ello, esta región genómica viral se amplificó mediante RT-PCR y se secuenció en 11 aislados procedentes de la Comunidad Valenciana y cuatro aislados de

Gran Canaria. También se incluyeron secuencias de aislados de diferentes países obtenidas de la base de datos *GenBank* (Tabla 2.1). Los análisis mostraron una escasa variación nucleotídica con una proporción de posiciones segregantes de 0.0212. La diversidad nucleotídica de las dos poblaciones españolas analizadas fue de 0.0007 ± 0.0004 y 0.0006 ± 0.0003 para los aislados de Gran Canaria y la Comunidad Valenciana, respectivamente. Estos valores eran similares a los obtenidos para la diversidad nucleotídica entre ambas poblaciones, que fue de 0.0006 ± 0.0007 y cinco veces menor a la obtenida para la población mundial del STV, que fue de 0.0032 ± 0.0007 .

Tabla 2.1. Aislados del virus meridional del tomate (STV) empleados en el estudio de diversidad genética.

Nombre del aislado	Región geográfica	Año ^a	Nº acceso <i>GenBank</i> ^b
Mexico-1	México	2007*	EF442780*
Gimcheon	Gimcheon, Corea del sur	2016	LC270272*
XJ-p	China	2015	KY228384*
CN-12	China	2012	KT438549*
DR	República Dominicana	2013	KX525266*
FERA_160205	Reino Unido	2016	KY810783*
CH-bpo161	Suiza	2014	MF422617*
CH-bpo163	Suiza	2014	MF422618*
BD-13	Bangladesh	2013	KT634055*
Florida	USA: Florida	2013	KX949574*
MS-7	USA: Mississippi	2008*	EU413670*
NC12-03-08	USA: Carolina del Norte	2012	KT852573*
GCN06	España: Gran Canaria	2006	KJ174690*
SYHLR2	España: Gran Canaria	2016	MK026640
SYHLR4	España: Gran Canaria	2016	MK026641
SVA101	España: Gran Canaria	2016	MK026639
SASb1	España: Gran Canaria	2016	MK026638
Tom15	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026642
Tom20	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026643
Tom25	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026644
P4499-4	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026633
P750-3	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026634
P96067-1	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026635
P96067-2	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026636
767-3	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026630
767-4	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026631
15331.1	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026632
Mac.5	España: Comunidad Valenciana	2016	MK026637

^a Año de recolección de la muestra. Cuando la fecha es desconocida se indica el año de publicación junto con un asterisco (*).

^b Las secuencias nucleotídicas obtenida de la base de datos *GenBank* se indican con un asterisco (*).

La diversidad genética de la Cp del STV se comparó con la diversidad genética de las Cps de otros virus persistentes (familias *Amalgaviridae*, *Partitiviridae* y *Totiviridae*), de virus agudos que infectan plantas de tomate y de virus del género *Tenuivirus*, los cuales comparten una homología estructural con la Cp del STV (Tabla 2.2 y Anexo: Material suplementario 1). Las secuencias de nucleótidos que codifican para la CP de diferentes virus tanto persistentes como agudos se obtuvieron del *GenBank* (Anexo: Material suplementario 1). Los análisis de diversidad nucleotídica se realizaron utilizando el modelo evolutivo que más se ajustaba a los datos de cada virus. En los virus que tenían registradas en el *GenBank* una gran cantidad de secuencias correspondientes a diferentes aislados, se utilizó un número de secuencias manejable escogido al azar, pero de aislados de diferentes regiones geográficas. Dentro de los virus persistentes, el otro virus analizado de la familia *Amalgaviridae* con suficientes secuencias disponibles, fue el BBLV, que mostraba al igual que el STV una baja diversidad nucleotídica con valores de 0.0012 ± 0.0003 . Los seis virus de la familia *Partitiviridae* analizados y que infectan plantas, hongos y protozoos tenían una baja diversidad nucleotídica con valores de entre 0.0058 ± 0.0017 y 0.0339 ± 0.0058 . Sin embargo, los virus de la familia *Totiviridae* que infectan protozoos mostraron una alta diversidad nucleotídica, con valores > 0.1000 . En cuanto a los virus agudos, los valores de diversidad nucleotídica variaron entre 0.0090 ± 0.0019 y 0.2846 ± 0.0402 . Los dos virus del género *Tenuivirus* estudiados en este trabajo y que infectan plantas de arroz fueron el virus del enanismo herbáceo del arroz (Rice grassy stunt tenuivirus, RGST) y el tenuivirus de la raya del arroz (Rice stripe tenuivirus, RST) y mostraron valores de diversidad nucleotídica de 0.0202 ± 0.0030 y 0.0338 ± 0.0038 , respectivamente.

Tabla 2.2. Diversidad nucleotídica del gen que codifica la proteína de cubierta (Cp) de diferentes virus persistentes y agudos.

Virus ^a	Género	Familia	Hospedador	Nº de aislados	Modelo evolutivo ^b	Diversidad nucleotídica
Persistentes:						
STV	<i>Amalgavirus</i>	<i>Amalgaviridae</i>	Planta	28	TN93	0.0031 ± 0.0008
BBLV	<i>Amalgavirus</i>	<i>Amalgaviridae</i>	Planta	38	JC	0.0012 ± 0.0003
VCV	<i>Alphapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Planta	7	TN93+G+I	0.0238 ± 0.0024
WCCV1	<i>Alphapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Planta	10	T92	0.0058 ± 0.0033
CSpV1	<i>Cryspovirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Protozoo	14	T92+G	0.0103 ± 0.0017
PCV1	<i>Deltapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Planta	6	TN93	0.0053 ± 0.0017
PCV2	<i>Deltapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Planta	14	T92+G	0.0247 ± 0.0028
GaRV	<i>Gammapartitivirus</i>	<i>Partitiviridae</i>	Hongo	44	K2+G	0.0339 ± 0.0058
LRV1	<i>Leishmanivirus</i>	<i>Totiviridae</i>	Protozoo	20	TN93+G	0.1244 ± 0.0067
TVV1	<i>Trichomonasvirus</i>	<i>Totiviridae</i>	Protozoo	10	TN93+G+I	0.2268 ± 0.0086
Agudos:						
RGST	<i>Tenuivirus</i>	<i>Phenuiviridae</i>	Planta	7	T92	0.0202 ± 0.0030
RST	<i>Tenuivirus</i>	<i>Phenuiviridae</i>	Planta	20	T92+G	0.0338 ± 0.0038
CGMMV	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	Planta	10	K2+G	0.0542 ± 0.0071
PMMoV	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	Planta	10	K2	0.0274 ± 0.0039
ToMV	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	Planta	11	T92	0.0088 ± 0.0019
PepMV	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	Planta	15	K2+I	0.1613 ± 0.0108
PVX	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	Planta	14	K2+G	0.0410 ± 0.0034
CMV	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Planta	23	K2+G	0.2836 ± 0.0402
TSWV	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>	Planta	10	T92+G	0.0331 ± 0.0042
PVY	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Planta	12	TN93+G	0.0090 ± 0.0074
BBWV-2	<i>Fabavirus</i>	<i>Secoviridae</i>	Planta	10	T93+I	0.1783 ± 0.1230

^a Southern tomato virus (STV), Blueberry latent virus (BBLV), Vicia cryptic virus (VCV), White clover cryptic virus 1 (WCCV1), *Cryptosporidium parvum* virus 1 (CSpV1), Pepper cryptic virus 1 (PCV1), Pepper cryptic virus 2 (PCV2), *Gremmeniella abietina* RNA virus (GaRV), *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1), *Trichomonas vaginalis* virus 1 (TVV1), Rice grassy stunt tenuivirus (RGST), Rice stripe tenuivirus (RST), Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV), Pepper mild mottle virus (PMMoV), Tomato mosaic virus (ToMV), Pepino mosaic virus (PepMV), Potato virus X (PVX), Cucumber mosaic virus (CMV), Tomato spotted wilt virus (TSWV), Potato virus Y (PVY), Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2).

^b Modelo de sustitución nucleotídica que más se ajusta a los datos: TN93: Tamura-Nei, JC: Jukes-Cantor, T92: Tamura 3-parameter, K2: Kimura 2-parameter, G: Distribución gamma, I: fracción de sitios que son evolutivamente invariables.

El árbol filogenético generado siguiendo el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) con los diferentes aislados del STV mostró dos clados o grupos: el grupo A contenía aislados de España, México, Reino Unido, República Dominicana,

USA, Corea del Sur, Bangladesh y China, y el grupo B contenía aislados de Suiza y China (Fig. 2.1). La media de distancia nucleotídica entre ambos grupos fue de 0.0112 ± 0.0028 mientras que la media de distancias dentro del grupo A fue 0.0012 ± 0.0004 y dentro del grupo B fue de 0.0018 ± 0.0010 . No se observó correlación alguna entre la distribución geográfica de los aislados y su distancia nucleotídica y algunos aislados de diferentes países mostraron idéntica secuencia nucleotídica.



Figura 2.1. Árbol filogenético no enraizado siguiendo el modelo de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) de las secuencias nucleotídicas de la Cp de un total de 28 aislados del virus meridional del tomate (STV) de diferentes regiones geográficas mostrando dos clados o grupos (A y B). La longitud de las barras es proporcional a la distancia genética de los aislados. Los valores de bootstrap > 50 se indican en los nodos. Las cajas contienen los aislados del STV con idéntica secuencia nucleotídica.

Se evaluó el papel de la selección natural en la evolución del STV comparando la proporción de sustituciones no sinónimas por los sitios no sinónimos (dN) y la proporción de sustituciones sinónimas por sitios sinónimos (dS) según el método de *Pamilo-Bianchi-Li*. Los valores de dN y dS fueron de 0.0009 y 0.0072, respectivamente y el valor de dN/dS fue de 0.125, lo que indicaba una selección natural negativa para el cambio de aminoácidos. El análisis mediante el método de probabilidad de efectos fijos de la tasa de selección dN y dS en cada codón mostró que las posiciones 31, 36, 53, 138, 157 y 373 podrían estar sometidas a una selección negativa. En este análisis no se observaron codones sometidos a selección positiva. También se evaluó el papel de la selección

natural a nivel poblacional con los análisis de neutralidad de Tajima's D, Fu y Li's D* y F*, obteniéndose en los tres casos valores negativos (D = - 1.52041, D* = - 0.41803 y F* = - 0.90146), que son característicos de una presión de selección negativa purificadora. Sin embargo, el resultado de estos análisis no tuvo soporte estadístico debido probablemente a la baja variabilidad genética del STV. Finalmente, no se detectaron eventos de recombinación entre los diferentes aislados del STV.

Discusión

El estudio de diversidad genética del STV se realizó con la secuencia de la hipotética Cp (p42) de diferentes aislados españoles y de secuencias obtenidas en el *GenBank*, tanto de este virus como de otros virus persistentes y agudos. La información que se tiene sobre la diversidad genética y procesos evolutivos es muy abundante en virus agudos, pero muy escasa o prácticamente inexistente en el caso de virus persistentes. Con respecto al STV, este es el primer estudio de diversidad genética intraespecie realizado hasta la fecha. La diversidad nucleotídica del STV era muy baja (0.003 ± 0.0007) aunque algo mayor que la del BBLV (0.001 ± 0.0003), el otro miembro de la familia *Amalgaviridae* estudiado en este trabajo. El análisis filogenético no mostró correlación entre distancia geográfica y la distancia nucleotídica de los distintos aislados de STV; de hecho, algunos aislados del virus procedente de regiones muy distantes tenían la misma secuencia o casi idéntica. La escasa diversidad genética del STV y la falta de correlación entre la distancia genética de aislados y su origen geográfico podría deberse, como sucede con otros virus, a una rápida dispersión del virus, en este caso a través de la comercialización de semillas infectadas. Otra explicación podría ser que el STV se encuentre sometido a una fuerte presión de selección negativa purificadora (Davino et al. 2012; Walia et al. 2014). Esta última hipótesis se ve reforzada por el hecho de que aislados del STV que fueron recolectados en diferentes años (2007-2016) tenían secuencias nucleotídicas idénticas. La comparación de sustituciones no sinónimas (dN) y sinónimas (dS) mostró un valor de dN/dS (0.125), que indicaba una selección negativa con una presión similar a la de otros virus (García-Arenal et al. 2001). Por otra parte, el valor de dS (0.0072) era mucho más bajo al de otros virus de plantas, lo que sugería que el STV está sometido también a una selección negativa a nivel nucleotídico. La presión negativa

en la secuencia nucleotídica del STV podrían estar causadas por restricciones estructurales del genoma viral o por el sesgo de codones, que limita el número de tripletes nucleotídicos usados para cada aminoácido (Adams and Antoniw 2004; Watters et al. 2017). También, se identificaron posiciones aminoacídicas que podrían estar bajo selección negativa. Estos aminoácidos podrían ser esenciales para la función de la proteína, formando parte de dominios funcionales o siendo esenciales para mantener la estructura de la proteína. A nivel poblacional, los test de neutralidad utilizados (Tajima's D, Fu y Li's D* y F*) dieron valores negativos lo que sugería una presión de selección negativa purificadora a nivel poblacional. Sin embargo, resultaron ser no significativos, probablemente debido a la baja variabilidad del STV. La comparación de las diversidades genéticas entre virus persistentes y agudos mostró que ambos grupos tenían rangos amplios, con valores de entre 0.0053 ± 0.0017 y 0.2268 ± 0.0086 para virus persistentes, y entre 0.0088 ± 0.0019 y 0.2836 ± 0.0402 para virus agudos. En nuestro estudio, algunos virus agudos como el ToMV mostraron valores de diversidad genéticas bajos (0.009 ± 0.0019), muy parecidos a los reportados por otros autores (Rangel et al. 2011). Estos valores de diversidad genética del ToMV fueron similares a los de virus persistentes como el virus 1 del *Cryptosporidium parvum* (*Cryptosporidium parvum* virus 1, CSpV1) y el PCV-1 (0.0103 ± 0.0017 y 0.0053 ± 0.0017 , respectivamente). Por el contrario, otros virus agudos como el CMV tenían valores de diversidad genética elevados (0.2836 ± 0.0402), también similares a los reportados previamente por otros autores y comparables a los valores de diversidad genética del virus persistente que infecta *Trichomonas vaginalis* 1 (*Trichomonas vaginalis* virus 1, TVV1) (0.2268 ± 0.0086) (Davino et al. 2012). Algunos autores han especulado que la alta diversidad genética encontrada en éste virus se debe a la elevada diversidad genética del hospedador, el protozoo *Trichomonas vaginalis* (Ibáñez-Escribano and Gómez-Barrio 2017). Finalmente, no se identificaron eventos de recombinación entre aislados del STV, aunque la baja variabilidad encontrada podría dificultar su detección.

Capítulo 3. Interacción del virus meridional del tomate (STV) con su hospedador, la planta de tomate

Parte de los resultados mostrados en este capítulo de la tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Elvira-González L, Medina V, Rubio L, Galipienso L (2020) The persistent southern tomato virus modifies miRNA expression without inducing symptoms and cell ultrastructural changes. *European Journal of Plant Pathology* 156:615-622 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01911-y>.

Introducción

Los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis sugieren que el STV no está implicado directamente en la inducción de ningún síntoma en las plantas de tomate. Sin embargo, se desconoce la naturaleza de las interacciones que establece con su hospedador. Hay muchos virus agudos que están ampliamente distribuidos y producen importantes daños en el cultivo de tomate como el TSWV, el TYLCV, el ToMV y el PepMV. Los síntomas que inducen estos virus en la planta están relacionados con cambios ultraestructurales que se producen a nivel celular como una excesiva acumulación de almidón en los cloroplastos, alteración de la morfología y del número de mitocondrias, formación de vesículas o alteración del citoesqueleto. Sin embargo, los virus persistentes no suelen inducir síntomas, y en muchos casos no se observan cambios a nivel celular que puedan estar relacionados con la infección viral. Además, en algunas especies virales como el STV hasta el momento no se ha podido demostrar la formación de viriones (Sabanadzovic et al. 2009).

Los virus, durante el proceso de infección, activan diferentes mecanismos de defensa en la planta, entre ellos el silenciamiento génico. En este mecanismo, las moléculas de dsRNA de origen viral son procesadas por proteínas tipo DCL de la planta en fragmentos pequeños, de unos 21-24 nts, llamados vsiRNAs que se asocian a un complejo proteico llamado RISC que degrada aquellas moléculas de RNA viral con secuencias complementarias (Yan et al. 2010). Las proteínas DCL también son responsables de la formación de otros RNAs pequeños endógenos de la planta, los miRNAs, que tienen funciones de regulación de la expresión génica (Moxon et al. 2008). La formación de vsiRNAs o miRNAs viene determinada por la acción de distintas proteínas DCLs. Por otra parte, los virus han evolucionado para codificar proteínas capaces de suprimir el silenciamiento génico. Los supresores de silenciamiento génico son muy variados y pueden interferir en distintos puntos de la ruta de silenciamiento. En virus agudos se han identificado una gran cantidad de VSRs mientras que, en el caso de virus persistentes, a pesar de que éste permanece en la planta durante todo su ciclo de vida, no se ha identificado ninguno hasta el momento (Chapman et al. 2004; Lakatos et al. 2006; Merai et al. 2006; Csorba et al. 2007; Goto et al. 2007; Kurihara et al. 2007; Martínez-Turiño and Hernandez 2009; Schnettler et al. 2010; Landeo-Ríos et al. 2017).

Muchas de las alteraciones que se producen en la planta durante la infección viral se producen por cambios de poblaciones de miRNAs inducidos por los virus (Chapman et al. 2004; Simon-Mateo and Garcia 2006; Zhai et al. 2011; Li et al. 2012). Por ejemplo, se ha determinado que la infección con el ToLCNDV en tomate produce cambios en las poblaciones de miR159/319 y miR172 (Naqvi et al. 2010). Mientras que el ToMV es capaz de inducir cambios en las poblaciones de miR163, miR164 y miR167 en *A. thaliana* (Tagami et al. 2007). Por otro lado, estudios recientes han confirmado que los vsRNAs derivados del CMV y del TYLCV, por su similitud con ciertos miRNAs, pueden regular directamente la expresión de determinados genes del hospedador y de esta forma modular la sintomatología de la planta (Smith et al. 2011; Yang et al. 2019). Hasta el momento hay muy poca información sobre el efecto que tienen los virus persistentes en la producción de vsRNAs y en los cambios de las poblaciones de miRNAs en las plantas hospedadoras. Un estudio reciente muestra que la infección por el STV en tomate está relacionada con cambios en las concentraciones de algunos miRNAs relacionados con la biosíntesis de etileno, una hormona vegetal relacionada con estrés, defensa, senescencia de hojas y maduración del fruto (Fukuhara et al. 2019). Por otra parte, se ha reportado una escasa producción de viRNAs en plantas de tomate infectadas con STV (Fukuhara et al. 2019).

Otro de los mecanismos de defensa en las plantas frente a patógenos es la SAR que implica la producción de señales móviles que están involucradas en la activación de los mecanismos de resistencia en partes no infectadas (Sticher et al. 1997; Vlot et al. 2008). El AS es una de las moléculas que interviene en la transducción de la señal de defensa, tanto a nivel biótico como abiótico. El AS participa en diversos procesos, entre los que se incluye la actividad fotosintética y apertura de estomas, que regula el intercambio de gases y la transpiración permitiendo a la planta desarrollar cierta tolerancia a determinadas situaciones de estrés hídrico, salino y térmico (Chaerle et al. 1999). Se ha comprobado que la infección por algunos virus agudos como el CMV permite que la planta desarrolle una cierta tolerancia a la sequía y al frío (Xu et al. 2008; Bao and Roossinck 2013; Suzuki et al. 2014). En el caso de virus persistentes, como el CThTV se han descrito tolerancia a elevadas temperaturas (Marquez et al. 2007).

En este capítulo de la tesis se ha estudiado el efecto de la infección del virus en su hospedador mediante: i) análisis de la producción de tomate en plantas infectadas con el STV, ii) estudios ultraestructurales mediante microscopía óptica y TEM, iii) análisis de

parámetros fisiológicos relacionados con la transpiración y la fotosíntesis, iv) acumulación de vsRNAs y miRNAs y v) capacidad supresora de silenciamiento génico de la proteína p42 de STV.

Resultados

3.1 Estudio de la influencia del STV en la producción de tomate

Para estudiar si la infección con el STV tenía influencia en la producción de tomate, se seleccionaron 14 plantas de tomate infectadas con el virus y 12 plantas de la misma variedad no infectadas obtenidas a partir de semilleros. Las plantas se mantuvieron en un abrigo de malla anti-trips, pulgón y mosca blanca, con riego controlado. A los tres meses se procedió a la recolección de frutos maduros. Adicionalmente, se realizó una monitorización de síntomas en la planta durante todo el cultivo. Las plantas se analizaron para la presencia de algunos virus transmitidos por semilla y contacto como el ToMV y el PepMV para descartar que se hubiesen infectado a través de la semilla. El número medio de frutos por planta fue de 37 en las plantas no infectadas y 34 en las infectadas con el STV, pero esta diferencia no resultó significativa ($P\text{-valor} \leq 0.05$) (Fig. 3.1, Panel A), lo que indica que el STV no afecta la producción de frutos de tomate. Tampoco hubo diferencias significativas ($P\text{-valor} \leq 0.05$) en el peso medio de los frutos recogidos por planta, 2992 y 3219 g en las plantas infectadas y no infectadas por el STV, respectivamente (Fig. 3.1, Panel B). En general, las plantas mostraron un buen aspecto durante todo el cultivo, no observándose ningún síntoma que pudiera ser atribuido a infección viral, ni en las plantas infectadas con el STV ni en las que no estaban infectadas.

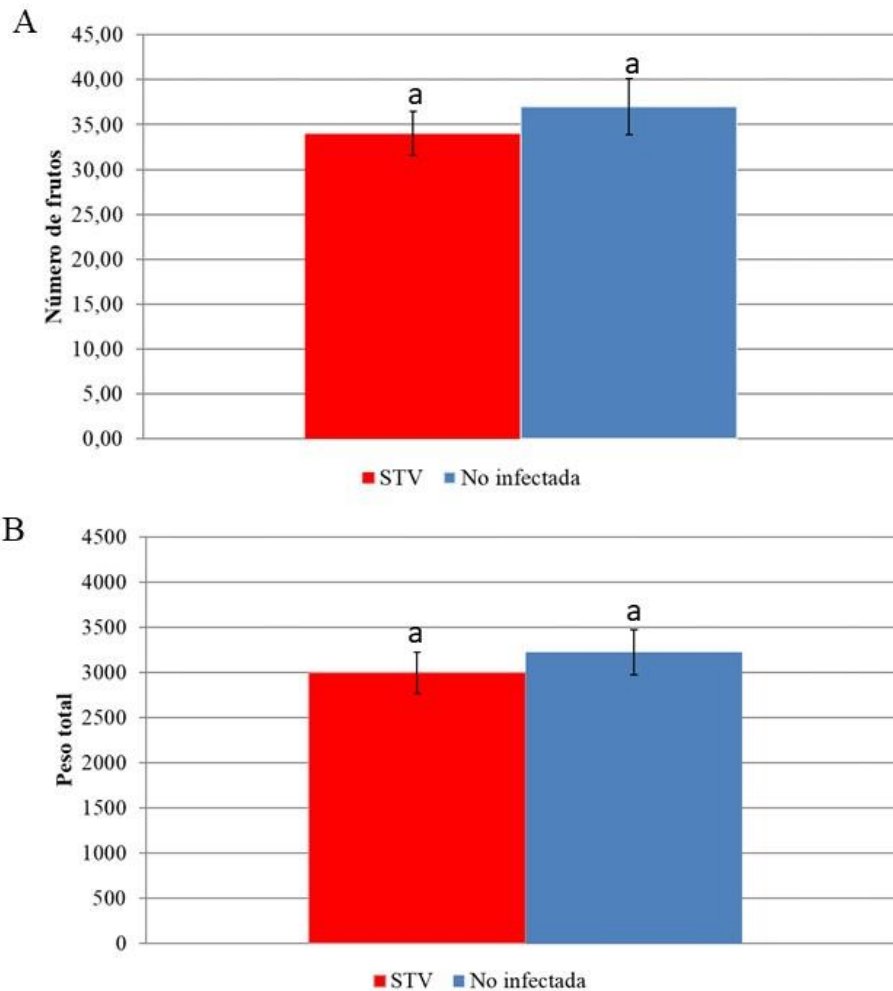


Figura 3.1. Análisis de la producción de tomate en plantas infectadas con el virus meridional del tomate (STV). El Panel A muestra los valores medios del número de frutos por planta en plantas infectadas y no infectadas con el STV mientras que el Panel B muestra los valores medios del peso de los frutos por planta (g). Las barras verticales representan los errores estándar y diferentes subíndices representan diferencias significativas ($P\text{-valor} \leq 0.05$).

3.2 Estudio del efecto de la infección por el STV en la conductividad estomática, fotosíntesis y peso de las plantas de tomate

En este apartado se estudió el efecto del STV midiendo diferentes parámetros fisiológicos en plantas de tomate en condiciones de riego normal y riego con agua salada (estrés salino). Se seleccionaron, 16 plantas de tomate infectadas con el STV y otras 16

plantas de la misma variedad sin infectar y se cultivaron en una cámara con temperatura y humedad controladas (25°C y 60% de humedad). Se aseguró que las plántulas no estuvieran infectadas con el ToMV y el PepMV ya que se transmiten por semilla.

Parte de las plantas (8 infectadas con el STV y 8 sin infectar) se regaron con agua normal tres veces a la semana, mientras que el resto (8 infectadas con el STV y 8 sin infectar) se sometió a un estrés salino añadiendo 125 mM de NaCl en uno de los riegos semanales. A los 4, 7 y 16 días tras la aparición de las primeras hojas verdaderas se tomaron datos de parámetros fisiológicos correspondientes a: i) conductividad estomática (gs) marcado por la apertura o cierre de estomas y que refleja el intercambio de gases, ii) grado de fotoinhibición y la integridad del aparato fotosintético del fotosistema determinando la eficacia cuántica del fotosistema II (PhII) a través de la relación de los parámetros F_v/F_m y iii) la fotosíntesis neta (A_n) o medida de la fijación neta de CO_2 . Al final del experimento, se determinó el peso de las plantas infectadas con el STV y sin infectar en condiciones de riego normal y sometidas a estrés salino.

Los datos de conductividad estomática entre los diferentes grupos de plantas y en las distintas condiciones, se muestran en la Figura 3.2. En esta se puede ver un descenso de estos valores con el tiempo. Los valores de conductividad estomática siempre fueron menores en las plantas sometidas a estrés salino que en las plantas con riego normal, mientras que no se apreciaron diferencias significativas entre las plantas infectadas y no infectadas con el STV tanto en riego normal como en estrés salino (P-valor > 0.05).

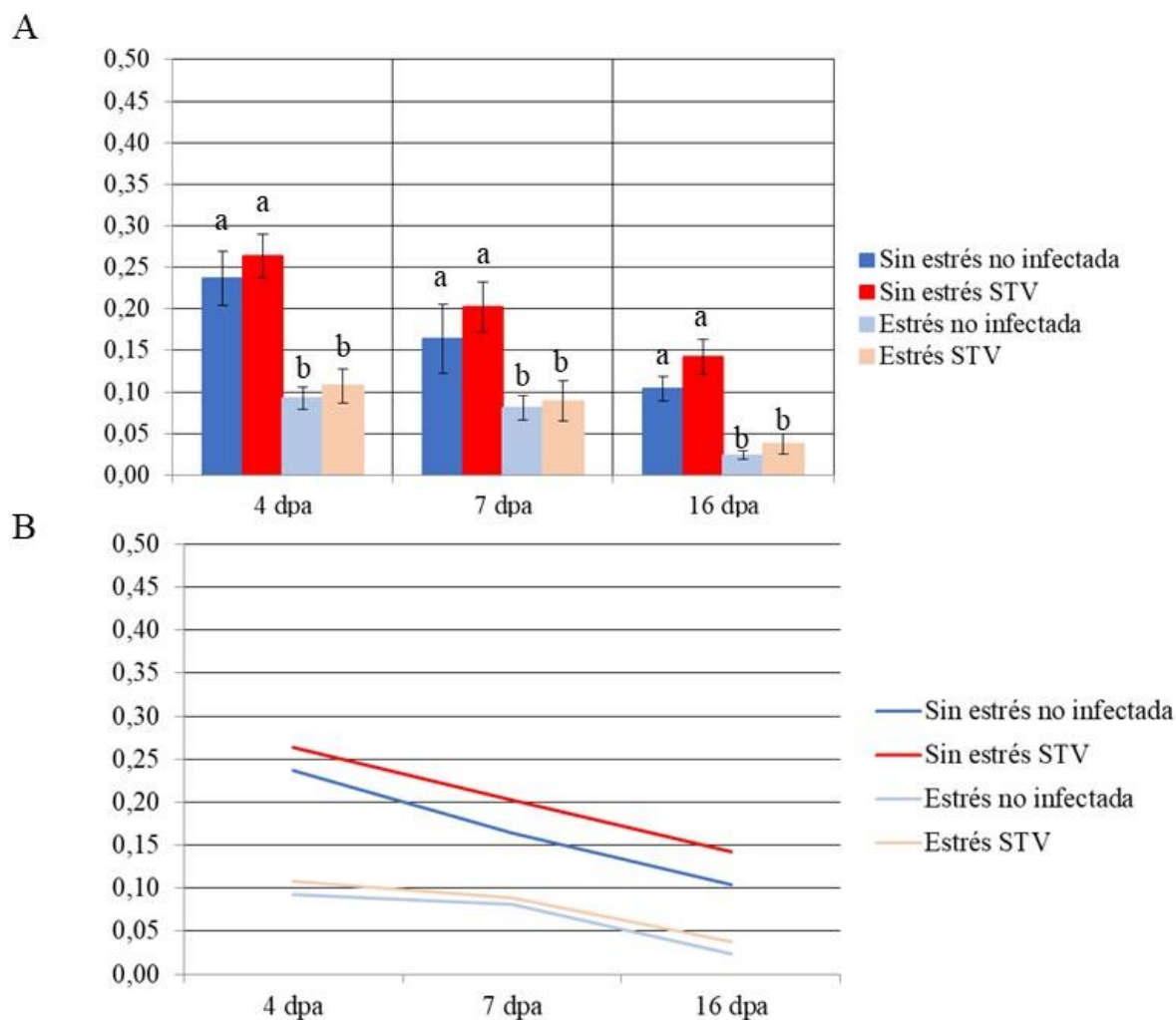


Figura 3.2. Representación en columnas (Panel A) y lineal (Panel B) de la conductividad estomática (gs) de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV) y no infectadas en condiciones de riego normal y de estrés salino (uno de los riegos semanales con 125 mM de NaCl) a los 4, 7 y 16 días tras la aparición de las primeras hojas verdaderas (dpa). Las barras correspondientes a los errores estándar y los subíndices a los grupos con diferencias significativas (P -valor ≤ 0.05).

Los valores de la relación de los parámetros F_v/F_m que miden la eficacia del PhII de los diferentes grupos de plantas se muestran en la Figura 3.3. Se pudo observar un ligero descenso de los valores de F_v/F_m con el transcurso del tiempo. Sin embargo, en cada uno de los tiempos analizados no se observó ningún efecto del tipo de riego ni de la infección.

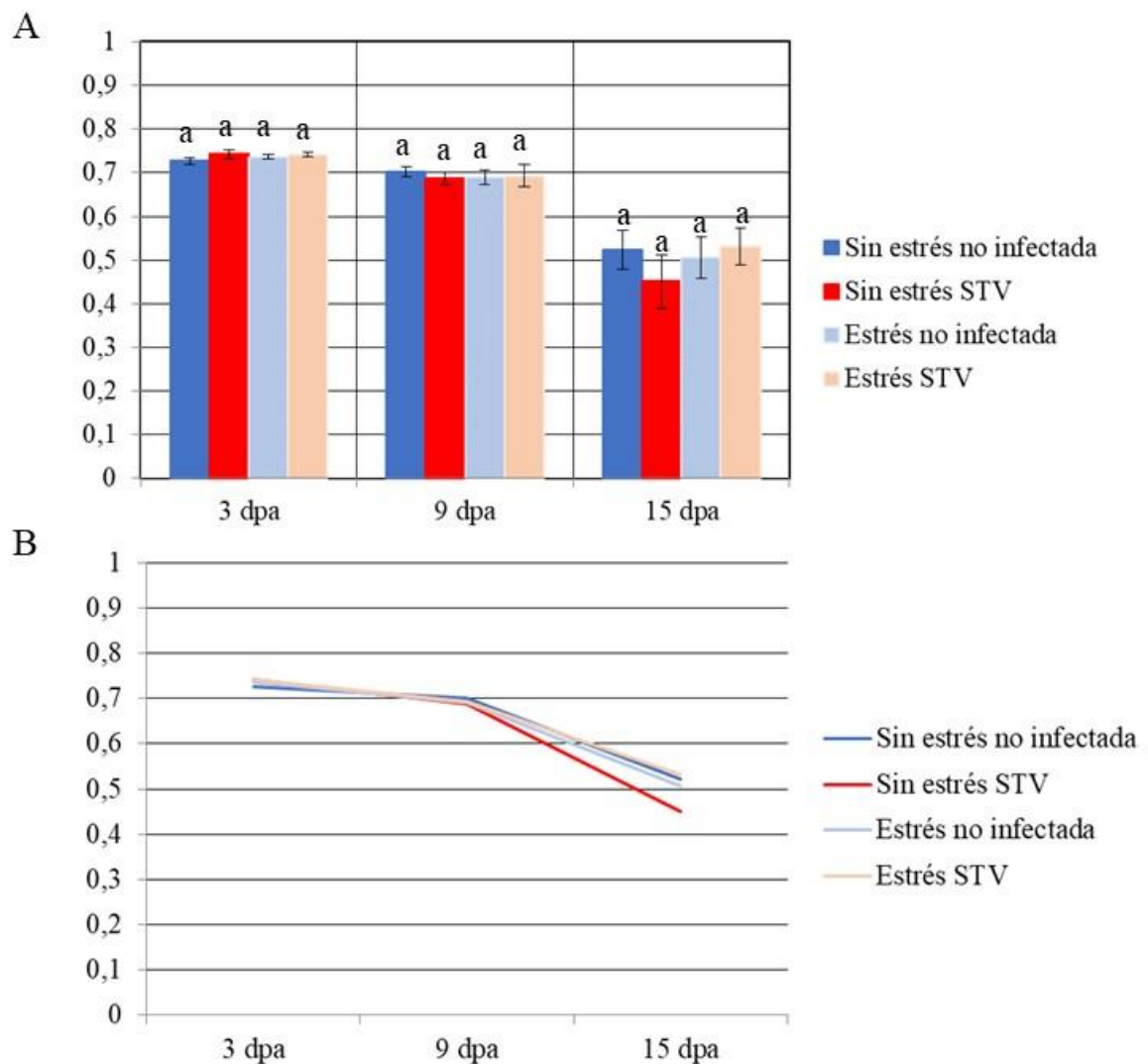


Figura 3.3. Representación en columnas (Panel A) y lineal (Panel B) de la eficacia del PhII (Fv/Fm) de plantas no infectadas e infectadas con el virus meridional del tomate (STV) en condiciones de riego normal y de estrés salino (uno de los riegos con 125 mM de NaCl) a los 4, 7 y 16 días tras la aparición de las primeras hojas verdaderas (dpa). Las barras correspondientes a los errores estándar y los subíndices a los grupos con diferencias significativas (P-valor ≤ 0.05).

En cuanto a la fotosíntesis neta (Fig. 3.4), los valores de An fueron significativamente mayores en las plantas sometidas a un riego normal respecto a las que fueron sometidas a un estrés salino en todos los tiempos analizados (P-valor ≤ 0.05),

mientras que no hubo diferencias significativas entre plantas con y sin virus con ambos tipos de riego (P-valor > 0.05).

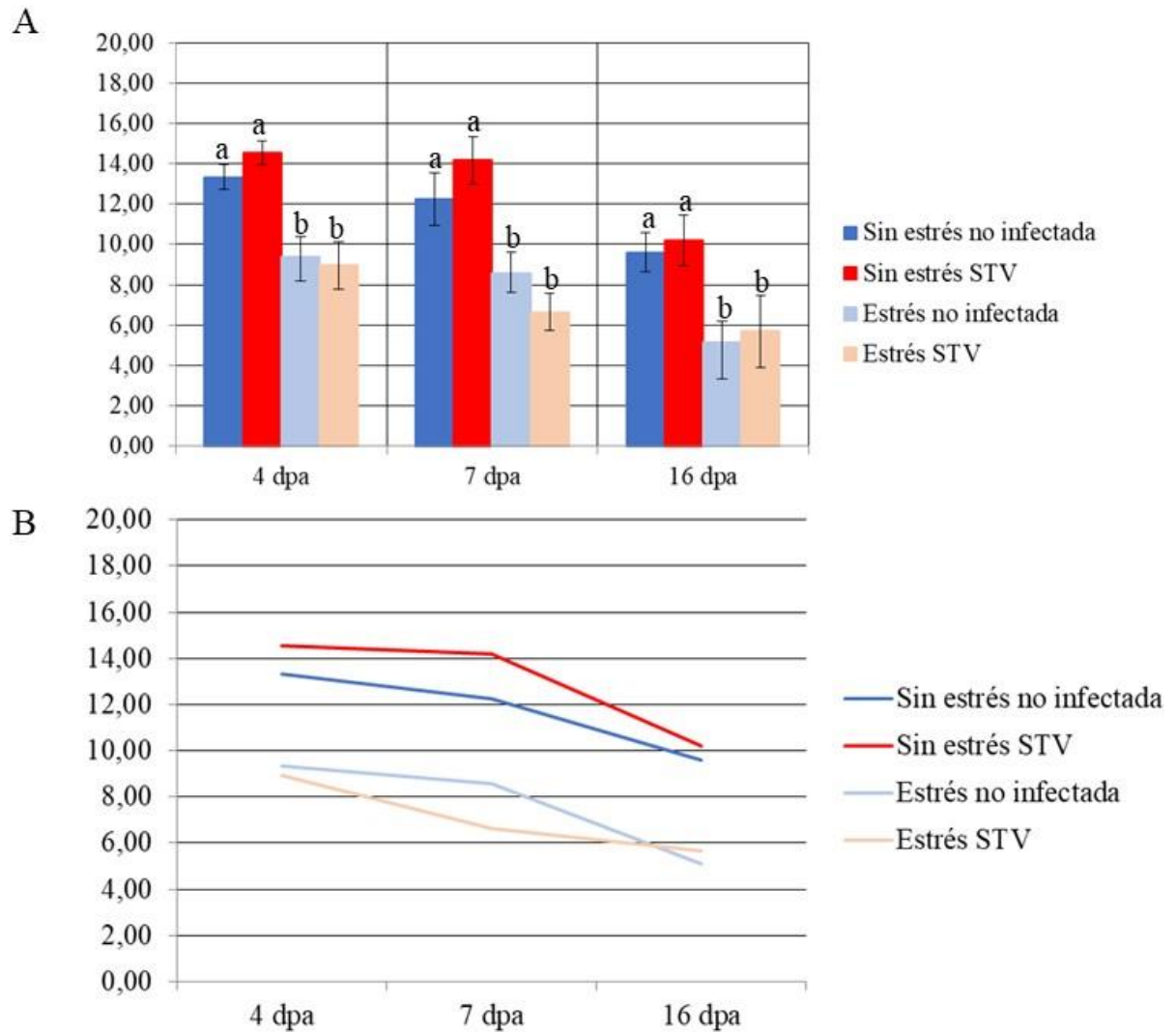


Figura 3.4. Representación en columnas (Panel A) y lineal (Panel B) de la fotosíntesis neta (A_n) de plantas de tomate no infectadas e infectadas con el virus meridional del tomate (STV) en condiciones de riego normal y de riego salino (125 mM de NaCl) a los 4, 7 y 16 días tras la aparición de las primeras hojas verdaderas (dpa). Las barras correspondientes a los errores estándar y los distintos subíndices con diferencias significativas (P-valor ≤ 0.05).

Una vez concluido el experimento se comparó el peso fresco total de las plantas entre los diferentes grupos de plantas (Fig. 3.5). Se observó un mayor peso en las plantas que habían sido sometidas a riego normal con respecto a las que fueron sometidas a riego

salino (P -valor ≤ 0.05). Por otra parte, la infección por el STV no tuvo ningún efecto en el peso de las plantas en ambas condiciones de riego.

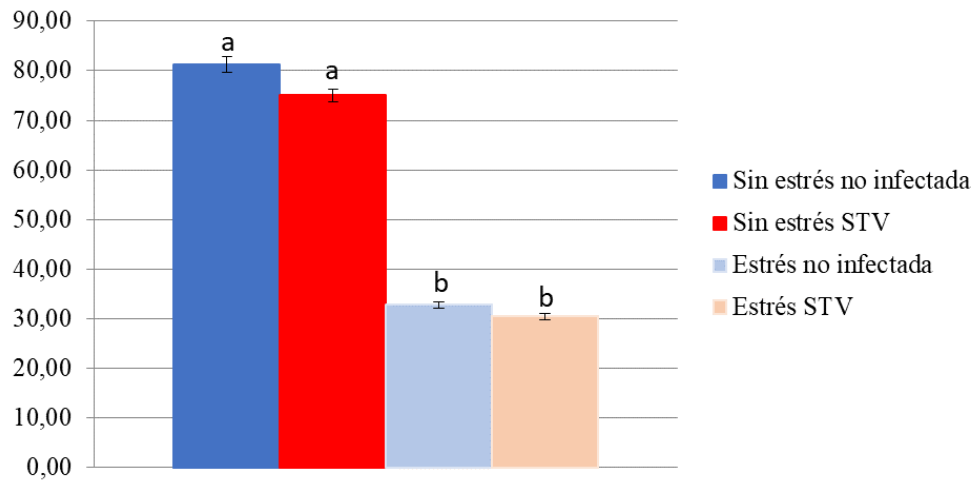


Figura 3.5 Peso medio (g) de las plantas no infectadas e infectadas con el virus meridional del tomate (STV) en condiciones de riego normal y de riego salino con 125 mM de NaCl tomado al finalizar el ensayo. Las barras verticales representan los errores estándar y distintos subíndices representan diferencias significativas (P -valor ≤ 0.05).

3.3 Estudio histológico de tejido de tomate infectado con el STV

Para averiguar si el STV induce cambios a nivel celular y tisular en las plantas infectadas, se analizaron cortes histológicos de tejido de hojas de plantas de tomate infectadas y no infectadas con el virus mediante microscopía óptica y TEM. No se apreciaron diferencias estructurales entre los tejidos de planta infectada y no infectada con el STV al microscopio óptico observándose que tanto el tejido epidérmico como el parenquimatoso y el vascular tenían una apariencia normal (Fig. 3.6, Panel A). En los cortes visualizados por TEM se observaron acúmulos de almidón en los cloroplastos, tanto en las células parenquimáticas del tejido infectado como del control sin infectar, no apreciándose diferencia alguna. Tampoco se observaron otros cambios ultraestructurales típicos de las infecciones virales como proliferación de mitocondrias o cloroplastos, ni estructuras tubulares o vesiculaciones (Fig. 3.6, Paneles B y C). Por otra parte, no se encontraron viriones en los tejidos ni en preparaciones de semipurificados virales obtenidas a partir de las plantas infectadas por el STV.

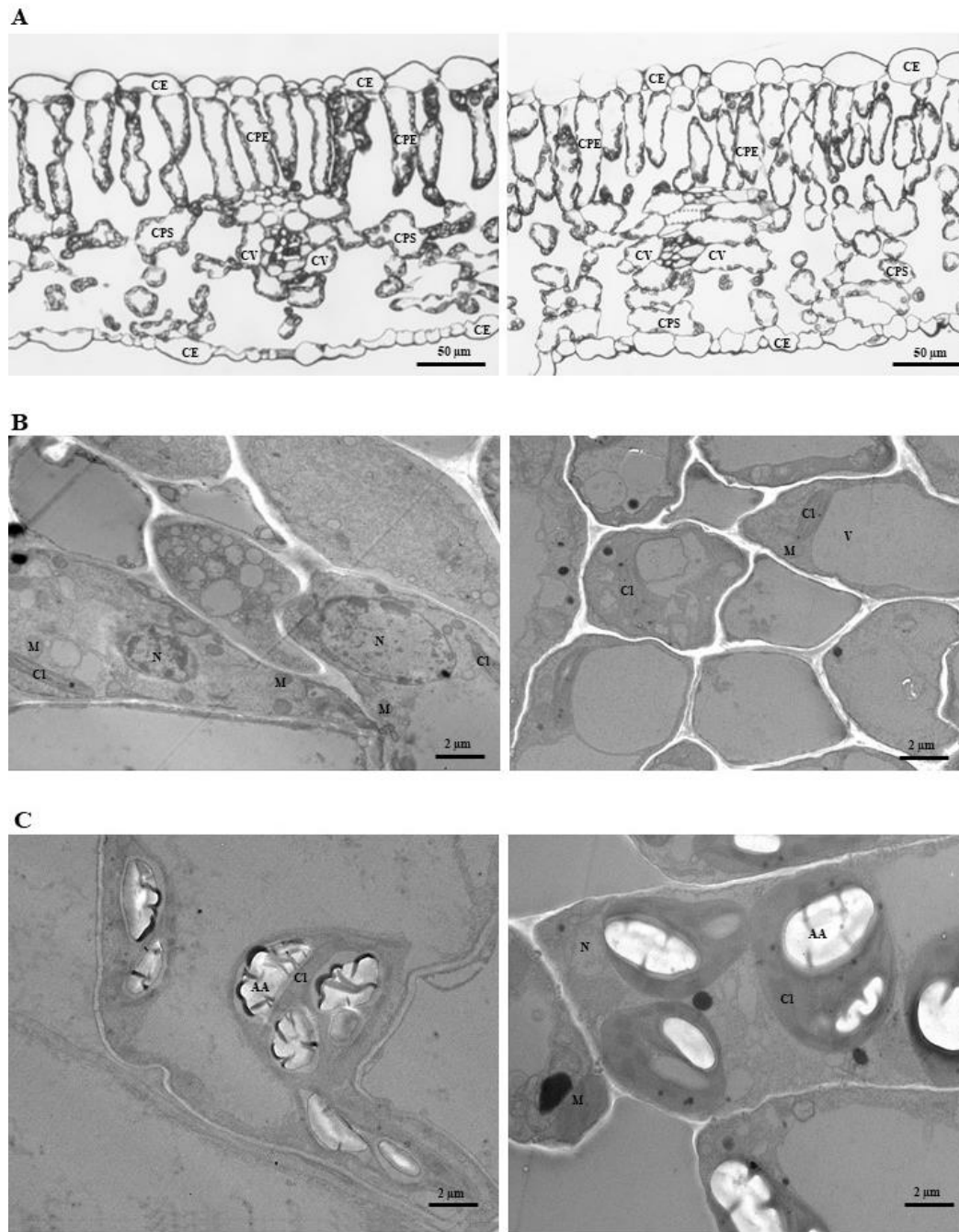


Figura 3.6. Microscopia óptica (Panel A) y TEM (Panel B y C) de cortes histológicos de tejido de tomate infectado y no infectado con el virus meridional del tomate (STV) (columna de la derecha e izquierda, respectivamente). En el Panel C se muestran los cloroplastos de células parenquimáticas con acúmulos de almidón, que están tanto en tejido infectado como no infectado. Abreviaciones: Cl (Cloroplasto), CE (Células epiteliales), M (Mitocondria), N (Núcleo), CPE (Células parenquimales en empalizada), AA (Acúmulos de almidón), CPS (Células parenquimales esponjosas), V (Vacuola) y CV (Células vasculares).

3.4 Efecto de la infección por el STV en la acumulación de siRNAs

Con el objetivo de determinar si la presencia del STV es capaz de alterar las poblaciones de siRNAs de la planta, éstas se analizaron mediante secuenciación masiva con la plataforma NextSeq550 de Illumina. El ensayo constó de nueve plantas infectadas con el STV y nueve no infectadas. Las muestras para las extracciones de RNA total se tomaron a los 15 días después de la aparición de la primera hoja verdadera. Se secuenciaron tres réplicas biológicas por grupo, cada una de las cuales consistía en una mezcla de tres extractos de RNA total. Las lecturas obtenidas de tamaños de 15 a 32 nts se limpiaron eliminando las secuencias de adaptadores y posibles secuencias contaminantes como pueden ser secuencias de otros tamaños, colas poliA o secuencias de baja calidad (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Resultados de la secuenciación masiva de pequeños RNA (siRNA) con plataforma NextSeq550 de Illumina a partir de plantas infectadas y no infectadas (tres réplicas biológicas) con el virus meridional del tomate (STV).

Muestras	Lecturas obtenidas	Lecturas finales	Lecturas eliminadas	% eliminado
No infectada 1	1,4E+07	1.1E+07	2601857	19.06
No infectada 2	9086155	7512326	1573829	17.32
No infectada 3	5448190	4256600	1191590	21.87
STV 1	5280185	3816253	1463932	27.73
STV 2	1,3E+07	1.1E+07	2148519	16.56
STV 3	9810832	7843693	1967139	20.05

Utilizando las lecturas finales se realizó un análisis de identificación y expresión diferencial de miRNAs entre plantas infectadas y no infectadas con el STV mediante el programa informático Oasis 2.0. En el análisis se encontraron cinco miRNAs con expresión diferencial utilizando un P-valor ajustado inferior al 0.05 (FDR < 0.05) y un Log2FoldChange superior a 0.56 los miRNAs stu-miR398-3p, stu-miR398-5p, stu-miR3627-3p y stu-miR319-3p estaban sobreexpresados mientras que el miRNA sly-miR169e-3p estaba infraexpresado en plantas infectadas con el STV con respecto a las no infectadas (Tabla 3.2). Cuatro de los cinco miRNA (stu-miR398-3p/5p, stu-miR3627-

3p and stumiR319-3p) no están descritos en tomate, pero si en patata (*Solanum tuberosum*), por lo que son nuevos miRNAs en tomate.

Tabla 3.2. miRNAs con expresión diferencial (FDR < 0.05 y Log2FoldChange > 0.56). entre plantas de tomate infectadas y no infectadas con el virus meridional del tomate (STV).

miRNA maduro	Cromosoma	Cadena	Secuencia	Log2FoldChange	FDR
stu-miR398a-3p	JH138006.1	+	UAUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	4.48	4E-07
stu-miR398a-5p	JH138006.1	+	GGGUUGAUUUGAGAACAUAUG	4.85	4.4E-05
stu-miR3627-3p	JH137794.1	-	AAGUGCCUCUGUCUUUCGACA	3.66	8.8E-05
sly-miR169e-3p	SL2.40ch08	+	UGGCAAGCAUCUUUGGCGACU	-3.76	0.00739
stu-miR319-3p	JH137816.1	+	UUGGACUGAAGGGUCCCUUC	1.66	0.04927

A partir de los miRNAs con expresión diferencial se realizó una predicción de los posibles genes dianas y sus funciones, mediante el programa informático psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) y utilizando las bases de datos *Uni-protKB*, *Gene Ontology (GO)* y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*. Se encontraron 87 genes diana, de los cuales 59 se han descrito funciones asociadas (Anexo: Material suplementario 2). Estas funciones abarcaban multitud de procesos en la planta relacionados con el metabolismo, homeostasis celular, transporte intracelular, formación de vesículas o estructuración del ribosoma. Además, diez de estos genes dianas eran factores de transcripción como PLATZ, TCP y GATA19 (dianas de stu-miR319-3p y stu-miR398a-5p) que están relacionados con la floración y el desarrollo de la planta. Los miRNAs que regulan estos factores de transcripción estaban sobreexpresados en las plantas infectadas con el STV con respecto a las plantas no infectadas.

Para la identificación de vsiRNAs derivados del STV, las lecturas obtenidas mediante secuenciación masiva de siRNAs se alinearon con el genoma del STV (número de acceso del *GenBank* KJ174690). En las tres réplicas biológicas correspondientes a plantas infectadas con STV se obtuvieron muy pocas lecturas de siRNA de 21-22 nts (14, 77 y 53 lecturas en cada replica) que alineaban con el genoma del STV. Curiosamente, también se encontraron lecturas en las réplicas de las plantas sin infectar (23, 32 y 17) que alineaban con el genoma del STV, pero éstas no correspondían a vsiRNAs, pues sus tamaños eran de 15 y 16 nts (Fig. 3.7).

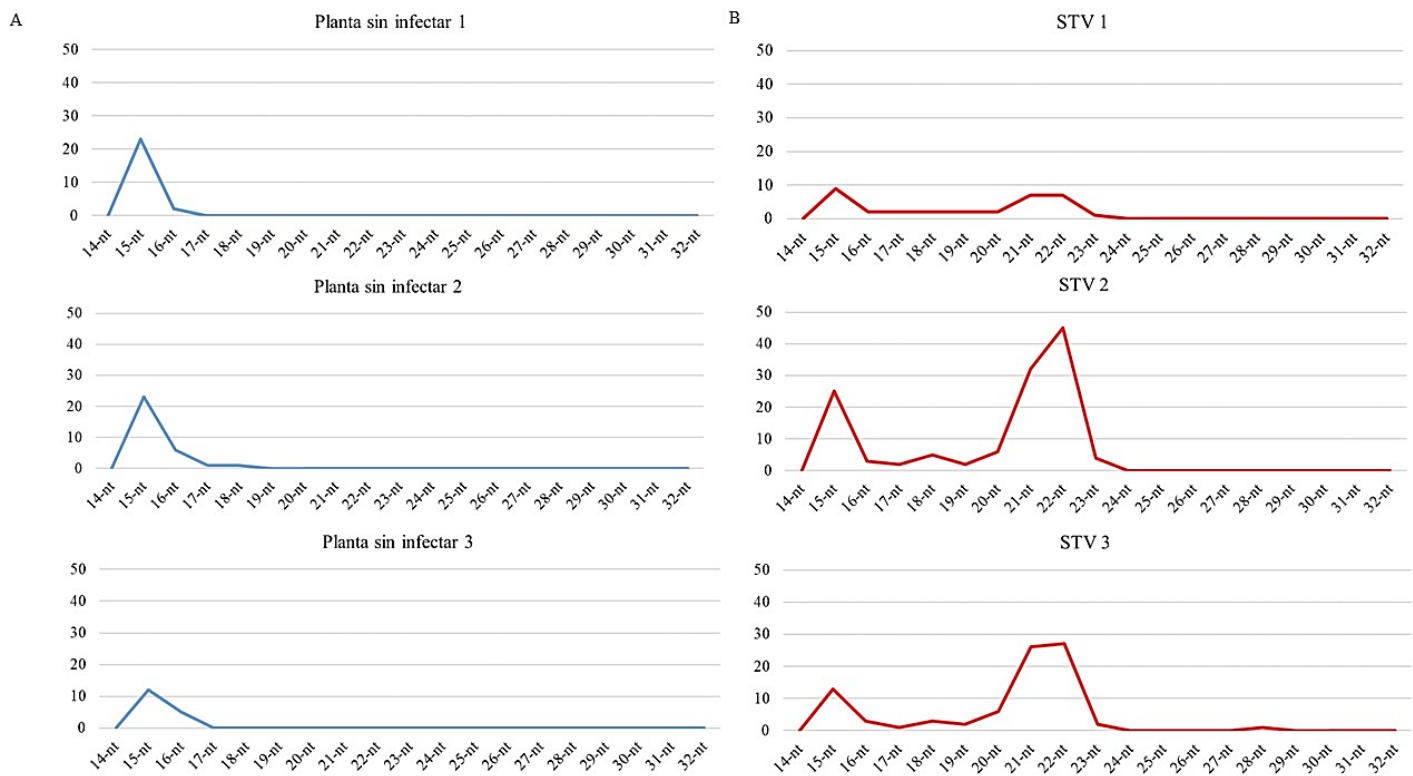


Figura 3.7. siRNAs de 15 a 32 nts que alinean con el genoma del virus meridional del tomate (STV) en las tres réplicas correspondientes a plantas de tomate infectadas con el virus y 3 réplicas en plantas no infectadas. El eje de abscisas corresponde a la longitud de los siRNAs y el eje de ordenadas corresponde al número de lecturas.

3.5. Estudio de la función supresora de silenciamiento génico de la proteína p42 del STV

Para averiguar el papel que puede jugar la hipotética Cp, también llamada p42, como VSR se realizó un ensayo de expresión transitoria de esta proteína en plantas transgénicas de *N. benthamiana* 16C que expresan la proteína GFP (*Green fluorescent protein*) de forma constitutiva (Carpino et al. 2020). Se elaboró una construcción en el plásmido binario pCambia (pCambia-p42) y como controles se utilizaron el VSR p19 del TBSV a través de la construcción pBin-p19 y el plásmido pCambia sin inserto (pCambia- \emptyset). Las diferentes construcciones se introdujeron en plantas de *N. benthamiana* 16C mediante agroinfiltración de una mezcla 1:1 de cada una de éstas con la construcción pBin-GFP que expresa la proteína fluorescente GFP y activa el PTGS suprimiendo la expresión del transgén de GFP. Si la construcción co-infiltrada expresa una proteína con

actividad VSR, se inhibirá el PTGS no silenciándose la expresión del transgén GFP y se observará una fluorescencia verde intensa al aplicarle a la planta UV.

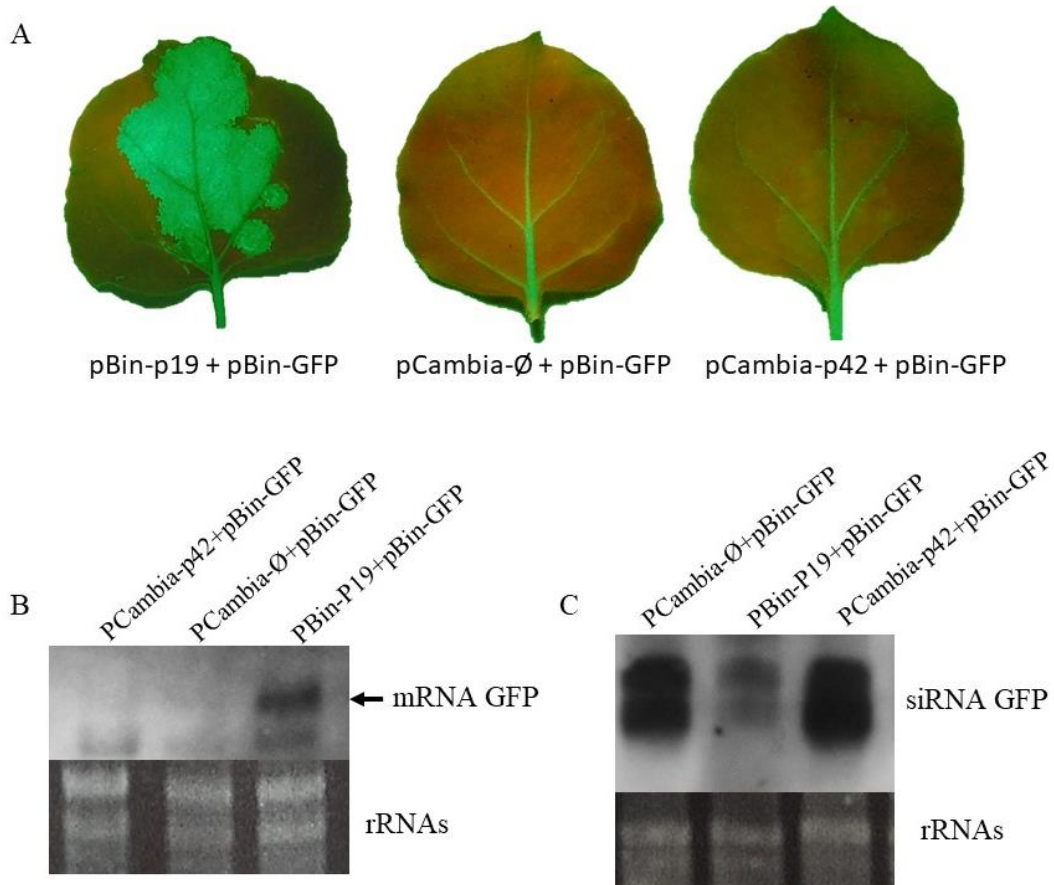


Figura 3.8. Ensayo de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* 16C coagroinfiltradas con la construcción pCambia-p42 que expresa la proteína p42 del virus meridional del tomate (STV) y con la construcción pBin-GFP que expresa la GFP. Como control positivo se agroinfiltró junto con pCambia-GFP la construcción pBin-p19, que expresa una proteína con una actividad VSR intensa codificada por el virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV) y como control negativo, el plásmido pCambia (pCambia-Ø). En el Panel A se observa la fluorescencia emitida tras iluminar con una lámpara UV las zonas agroinfiltradas con cada una de las combinaciones (pBin-p19 + pGFP, pCambia-Ø + pBin-GFP y pCambia-p42 + pBin-GFP). En los Paneles B y C se muestran los miRNAs y los siRNAs de GFP, respectivamente, mediante análisis de *Northern Blot* con una sonda específica de GFP. Como control de carga en la electroforesis se muestran los RNAs ribosómicos debajo del Panel B y C.

Se coagroinfiltraron un total de 12 plantas de *N. benthamiana* 16C para cada combinación (cuatro pBin-p19 + pBin-GFP, cuatro pCambia-Ø + pBin-GFP y cuatro pCambia-p42 + pBin-GFP) y a los 2-3 días se observaron las hojas agroinfiltradas iluminadas con una lámpara UV. En las plantas coagroinfiltradas con pCambia-p42 + pBin-GFP se observó una ligera fluorescencia verde mientras que en las plantas coagroinfiltradas con pBin-p19 + pBin-GFP (control positivo) se observó una fluorescencia verde intensa (Fig. 3.8, Panel A). En las plantas coagroinfiltradas con pCambia-Ø + pGFP (control negativo) no se observó fluorescencia en la zona de agroinfiltración. Los análisis mediante *Northern Blot* con una sonda específica para GFP, marcada con digoxigenina, mostraron que en las plantas agroinfiltradas con pCambia-p42 + pBin-GFP no había producción de mRNAs del transgén de GFP y sí había producción de siRNAs, lo que sugiere que la proteína p42 no actúa como VSR (Fig. 3.8, Panel B). Estos resultados fueron idénticos a los observados en el control negativo (pCambia-Ø + pBin-GFP). Por el contrario, en las plantas agroinfiltradas con pBin-p19 + pBin-GFP y que expresan el VSR p19 sí había producción de mRNAs del transgén de GFP y no había producción de siRNAs.

Discusión

A diferencia de los virus agudos, cuyas infecciones tienen un efecto visible en las plantas ya que inducen enfermedades, prácticamente se desconoce el efecto de las infecciones de los virus persistentes. En ningún caso se ha reportado la inducción de enfermedades y solo se han descrito unos pocos casos de relaciones mutualistas entre virus y hospedador. Por ejemplo, hay plantas que son capaces de soportar temperaturas superiores a 50°C, gracias a la presencia de un hongo endófito infectado con el CThTV (Marquez et al. 2007). Algo similar ocurre con el WCCV-1, que es capaz de establecer una relación mutualista con bacterias fijadoras de N₂ y de esta forma ayudar a la planta a asimilarlo en condiciones de escasez de este elemento (Nakatsukasa-Akune et al. 2005). En este trabajo se ha estudiado el efecto del STV en la planta hospedadora analizando varios parámetros como la producción de fruta, inducción de síntomas, la respuesta al

estrés salino, cambios histológicos y celulares, y producción de siRNAs. Con respecto al efecto de la infección por el STV en la producción de fruto, no se encontraron diferencias significativas ni en el número ni en el peso medio de los frutos producidos en plantas de tomate de la var. Mariana. Estos resultados estaban en consonancia con resultados previos obtenidos por otros autores: en las variedades de tomate Guindo y Valenciano no se encontraron diferencias significativas ni en el número medio de frutos ni en el peso medio de la producción por planta entre las plantas infectadas por el STV y las plantas sin infectar (Sanahuja 2017). En la variedad de tomate M82 tampoco se encontraron diferencias significativas en el número medio de frutos producidos por planta entre plantas infectadas y no infectadas por el STV (Fukuhara et al. 2019). Las plantas infectadas con el STV tenían una apariencia normal y no mostraban ningún tipo de síntomas. Esto junto a la detección del STV en plantas asintomáticas realizada en el primer capítulo de esta tesis, sugiere que el virus no induce síntomas en la planta huésped.

Para estudiar el efecto de la infección por el STV en plantas bajo estrés salino, se analizó la conductividad estomática, fotosíntesis y peso de las plantas de tomate regadas en condiciones normales y con riego salino (125 mM de NaCl). No se encontró ningún efecto de la infección viral en la transpiración ni en la fotosíntesis (eficacia del PhII y fotosíntesis neta) tanto en riego normal como en el salino. Solo se observaron disminuciones de conductividad estomática y de la fotosíntesis neta entre los grupos de plantas con riego normal y riego salino, aunque la eficacia del PhII no se veía alterada. Estos resultados contrastan con los obtenidos con algunos virus agudos como el TMV cuya infección provoca un aumento de ABA en la planta que induce una disminución de la conductividad estomática mediante el cierre de estomas (Chaerle et al. 1999). Se ha podido demostrar que algunas proteínas del virus del mosaico amarillo del nabo (Turnip yellow mosaic virus, TYMV) son capaces de inhibir el PhII y reducir la capacidad fotosintética de la planta (Li et al. 2016). También se ha comprobado que el virus del mosaico bandeado de la cebada (Barley stripe mosaic virus, BSMV) y el CMV induce cambios ultraestructurales en los cloroplastos que afectan a la capacidad fotosintética de la planta (Zhao et al. 2016; Jin et al. 2018). Finalmente, la infección por el STV no mostró ningún efecto significativo en el peso de las plantas de tomate, solo se observó una reducción clara en el grupo de plantas sometidas a riego salino con respecto a las que tuvieron un riego normal, influenciado por el descenso de la conductividad estomática y de la fotosíntesis neta. Resultados similares se han reportado por otros autores donde el

peso de las plantas sometidas a estrés salino era menor que las plantas sometidas a riego normal, independientemente de la infección o no infección por el STV (Fukuhara et al. 2019).

La observación al microscopio óptico y TEM de tejido de hoja de tomate infectada por el STV no mostró ninguna anomalía ni tisular ni ultraestructural. No se observaron alteraciones en ninguno de los orgánulos, como cloroplastos o mitocondrias, en contraste con algunos virus agudos como el CGMMV y/o el ToTV que inducen hipertrofia y proliferación en las mitocondrias (Šutić and Sinclair 1991; Alfaro-Fernández et al. 2010). Tampoco se observó la presencia de estructuras tubulares derivadas del citoesqueleto y relacionadas con el movimiento viral típicas en las infecciones de algunos miembros de la familia *Secoviridae* (Medina et al. 2003; Liu et al. 2011). Finalmente, no se observaron viriones del STV por TEM ni en semipurificados virales ni en cortes histológicos. La ausencia de viriones de STV también se ha reportado por Sabanadzovic et al. 2009. Hasta la fecha no se ha encontrado partículas virales asociados a ningún miembro de la familia *Amalgaviridae* (Martin et al. 2011). En contraste, en otros virus persistentes de las familias *Partitiviridae* y *Totiviridae* sí que se han podido identificar viriones, aunque a baja concentración (Boccardo et al. 1987; Nibert et al. 2014).

En este trabajo se ha estudiado el efecto de la infección del STV en la acumulación de miRNAs endógenos y en la producción de vsiRNAs en plantas de tomate. La infección por el STV indujo la sobreexpresión de los miRNAs stu-miR398-3p, stu-miR398-5p, stu-miR3627-3p y stu-miR319-3p y la infraexpresión del miRNA sly-miR169e-3p respecto a las plantas no infectadas. Cuatro de estos miRNAs (stu-miR398-3p, stu-miR398-5p, stu-miR3627-3 y stu-miR319-3p) corresponden a miRNAs nuevos en tomate, descritos solo en patata (*Solanum tuberosum*). La producción de miRNAs nuevos se ha asociado a efectos de estrés biótico y abiótico (Prigigallo et al. 2019). Por ejemplo, la infección con el RSV induce la acumulación de unos 100 miRNAs nuevos en plantas de arroz, mientras que en plantas de tomate sometidas a estrés térmico se ha detectado la acumulación de 23 miRNAs nuevos (Guo et al. 2012; Pan et al. 2017). Estos cinco miRNAs, cuya expresión se ve influenciada por el STV, regulan al menos 58 genes de la planta, que están involucrados en importantes funciones celulares como metabolismo, homeostasis celular, transporte intracelular, formación de vesículas o estructuración del ribosoma. Además, diez de estos genes dianas eran factores de transcripción como PLATZ, TCP y GATA19 (dianas de stu-miR319-3p y stu-miR398a-5p). En el caso del sly-miR169e-3p, se han

encontrado evidencias experimentales que lo relacionan con el desarrollo de la planta y con la respuesta al estrés (Blevins et al. 2011; Zhao et al. 2017). Se han encontrado ortólogos del sly-miR169e-3p en diferentes especies (*A. thaliana*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa* y *Sorghum bicolor*) y se ha determinado experimentalmente su relación con el estrés térmico en plantas de *Glycine max* (Xu et al. 2016). Con respecto a el STV, hay muy poca información de su intervención en la regulación de genes de la planta, un estudio mostró una relación entre la presencia del STV y la reducción en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno, una hormona que interviene en diversos procesos como maduración de fruto, germinación y arquitectura de la planta (Fukuhara et al. 2019).

La infección por el STV produjo vsiRNAs (resultado del silenciamiento génico de la planta), en cantidades ínfimas (solo 14, 77 y 53 lecturas en cada replica biológica), En trabajos previos también se ha reportado una baja concentración de vsiRNAs del STV en infección simple, pero su concentración aumentaba notablemente en plantas coinfectadas con otros virus (Turco et al. 2018; Fukuhara et al. 2019). En algunos virus se ha observado que algunos vsiRNAs exhiben la suficiente homología de secuencia para mimetizar la función de miRNAs endógenos que intervienen en la regulación genética de la planta. Se ha comprobado experimentalmente que vsiRNAs derivados del CMV y del TYLCV son capaces de unirse a los genes CHL1 y SIKNR1 respectivamente e inducir síntomas en la planta de tomate (Smith et al. 2011; Yang et al. 2019). En el caso de la infección por el STV, la ausencia de síntomas, tanto a nivel macroscópico como microscópico, podría estar relacionada con la baja cantidad de vsiRNAs detectados (Puchades et al. 2017; Elvira-González et al. 2018). La baja concentración de vsiRNAs derivados del STV podría ser debido a que el genoma viral se encuentra protegido en la célula vegetal, siendo inaccesible a la maquinaria de silenciamiento génico de la planta. Los estudios de TEM no revelaron la presencia de viriones ni ninguna estructura que pudiera proteger al genoma viral. Alternativamente, el STV podría codificar un VSR, aunque los ensayos de expresión transitoria de p42 (hipotética Cp) del STV en plantas de *N. benthamiana* 16C mostró que no tenía actividad VSR. Este es el primer trabajo sobre supresión de PTGS realizado con un virus persistente, en contraposición a los numerosos ensayos de este tipo realizado con virus agudos (Moissiard and Voinnet 2004; Qu and Morris 2005).

Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que el STV no tiene ningún efecto negativo en tomate, ni ejerce ningún efecto sinérgico en la respuesta a estrés salino. Sin embargo, la infección por el STV modificaba las poblaciones de miRNAs endógenos de la planta que pueden afectar a procesos importantes como metabolismo, desarrollo y respuestas a diferentes tipos de estrés.

Capítulo 4: Interacción del virus meridional del tomate (STV) con virus agudos del cultivo del tomate

Los resultados de este capítulo de la tesis están en proceso de publicación:

Elvira-González L, Peiró R, Rubio L, Galipienso L (*en redacción*) Persistent Southern tomato virus (STV) modifies symptoms, viral and small RNA accumulation in tomato plants mixed-infected with Cucumber mosaic and/or Pepino mosaic virus.

Introducción

Las infecciones con múltiples virus en una misma plantas son comunes en los cultivos (DaPalma et al. 2010; Juarez et al. 2013), produciéndose distintos tipos de interacciones entre ellos. Cuando dos virus coinfectan simultáneamente una planta se puede establecer un sinergismo, que facilita la replicación de al menos uno de ellos y el incremento de la intensidad de los síntomas en la planta. Las interacciones sinérgicas suelen tener lugar entre virus no relacionados filogenéticamente. La interacción sinérgica mejor estudiada es aquella en la que interviene un potyvirus (genero *Potyvirus*, familia *Potyviridae*). En estos casos, el VSR del potyvirus facilita la replicación del otro virus mediante la supresión del PTGS de la planta (Pacheco et al. 2012a; Mascia and Gallitelli 2016).

Cuando un virus infecta una planta, el dsRNA viral (genoma o intermediarios de replicación) activa el mecanismo de defensa basado en el PTGS produciendo la degradación del RNA viral en pequeñas moléculas de 21-24 nt (vsiRNAs). Este mecanismo también produce la degradación de determinados RNAs de la planta, produciendo miRNAs endógenos. Los miRNAs están involucrados en la regulación de genes que intervienen en gran multitud de procesos vitales en las plantas como desarrollo, reproducción o estrés (Moxon et al. 2008; Zhai et al. 2011). Por otro lado, los vsiRNA virales pueden mimetizar determinados miRNAs endógenos por homología de secuencia y de esta forma pueden regular ciertos genes de la planta hospedadora (Smith et al. 2011; Huang et al. 2016; Yang et al. 2019). En los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio del efecto que tienen las infecciones con virus agudos en la producción de vsiRNAs y miRNAs (Pacheco et al. 2012b; Xu et al. 2014; Prigigallo et al. 2019). Sin embargo, hay muy poca información sobre estas poblaciones de RNAs pequeños en infecciones con virus persistentes.

En sentido opuesto están las interacciones antagónicas, que se suelen producir entre virus relacionados filogenéticamente (una identidad nucleotídica alta). Un tipo de antagonismo es la “protección cruzada”, en la que la infección por un aislado viral suave protege a la planta de posteriores infecciones por aislados severos del virus (Zhang et al. 2018). Se han propuesto diversos mecanismos para explicar este fenómeno, como que la CP del primer virus impediría la liberación del ácido nucleico del segundo virus

bloqueando su replicación. Otro mecanismo propuesto es que la activación del PTGS por el primer virus protegería a la planta de la infección del segundo virus (Ratcliff et al. 1999; Powell et al. 2003). Otro tipo de interacción antagónica es la exclusión mutua, que se produce entre dos o más virus relacionados filogenéticamente que infectan simultáneamente la planta. En este caso, las células de la planta solo se pueden infectar con uno de los virus, es decir, la infección de la célula por un virus previene una siguiente infección por otro virus (Elena et al. 2011).

La infección de las plantas de tomate con el virus persistente STV suele ir acompañada de diversos virus agudos como el PepMV, el ToTV, el ToCV, el TSWV, el TYLCV, el TMV, el PVY o el CMV (Davino et al. 2010; Candresse et al. 2015; Padmanabhan et al. 2015b, a; Verbeek et al. 2015). En este capítulo de la tesis se propone evaluar las infecciones mixtas del STV con el PepMV y el CMV.

El PepMV (género *Potexvirus*, familia *Flexiviridae*) tiene un genoma de simple cadena de polaridad positiva ssRNA⁺ de 6.4 kb con cinco ORFs: el ORF 1 codifica para la replicasa, los ORF 2, 3 y 4 codifican para proteínas de movimiento (*triple gene block*, TGB) y el ORF 5 que codifica para la CP viral (Cruz et al. 1998; Aguilar et al. 2002; Morozov and Solovyev 2003). El PepMV produce síntomas de mosaico en las hojas y decoloración y alteración en la maduración del fruto. Hasta el momento se han identificado seis aislados del PepMV: el aislado Peruano (LP), el EU, el Norteamericano (US1-CH1), el recombinante norteamericano (US2), el CH2 y un segundo aislado Peruano detectado recientemente (PES) (Mumford and Metcalfe 2001; Maroon-Lango et al. 2005; Ling 2007; Alcaide et al. 2020). En general, el aislado CH2 induce síntomas más severos que el resto, siendo el aislado EU el que induce una sintomatología más leve, aunque esto puede variar dependiendo del hospedador (Blystad et al. 2015). El PepMV se transmite por contacto y también por semillas y no existen en el mercado variedades de tomates resistentes al virus (Ling 2008; Hanssen et al. 2010c).

El CMV (género *Cucumovirus*, familia *Bromoviridae*) tiene un genoma tripartito de ssRNA⁺. El RNA 1 de 3.4 kb tiene un ORF que codifica para la RdRp, el RNA 2 de 3.1 kb tiene dos ORFs solapados, el ORF 2a y ORF 2b, que codifican para la RdRp y un VSR, respectivamente. El RNA 3 de 2.2 kb tiene también dos ORFs, el ORF 3a y el ORF 3b que codifican para la proteína de movimiento y la CP viral, respectivamente (Perry et al. 1998). El CMV infecta una gran variedad de especies (más de 1200 especies de plantas de 100 familias diferentes) incluyendo tomate y pimiento, y se transmite de manera semi-

persistente por pulgones. Solo en unas pocas especies de plantas como el pimiento, el CMV es capaz de transmitirse por semillas (Ali and Kobayashi 2010). Los síntomas provocados por el CMV dependen de la especie y de la presencia de RNA satélites: en tomate, los síntomas inducidos por el CMV son de mosaico y deformación foliar pero cuando se encuentra en presencia del satélite CARNA-5 se produce un incremento en la severidad de los síntomas produciéndose una necrosis en las hojas y frutos, y provocando la muerte de la planta (Montasser et al. 1998; De la Torre-Almaráz et al. 2016). No hay variedades de tomates con resistencias naturales al virus y la única manera de minimizar el impacto del CMV es mediante el control de pulgones.

Los estudios sobre las interacciones establecidas por distintos virus en infecciones múltiples se han incrementado notablemente en los últimos años. Los resultados de estos trabajos nos han permitido comprender mejor el desarrollo de las enfermedades en los cultivos y nos ha ayudado a establecer estrategias de control más eficaces. Sin embargo, estos estudios se han restringido mayoritariamente a virus agudos, dándose por supuesto que los virus persistentes no tienen ningún tipo de efecto. En este trabajo de tesis se ha estudiado la interacción que se establece entre el virus persistente STV y los virus agudos CMV y PepMV, que son muy importantes en el cultivo de tomate. Para ello se realizó un ensayo de infección simple y múltiple con estos tres virus, estudiándose el efecto en la inducción de síntomas en la planta, la acumulación viral y de las poblaciones de vsiRNAs de los diferentes virus y de miRNAs de la planta de tomate.

Resultados

4.1 Síntomas en plantas de tomate infectadas con el STV, el CMV y el PepMV en condiciones de infección simple y múltiple

Se germinaron 100 semillas de tomate y mediante RT-qPCR con cebadores específicos se seleccionaron las plantas infectadas de las no infectadas con el STV. Se comprobó que las plantas no estuvieran infectadas con el PepMV y el ToMV, que también se transmiten por semilla, mediante RT-PCR convencional. A continuación, se llevó a

cabo un ensayo con infecciones simples y múltiples (dobles y triples) del STV, el CMV y el PepMV. Las plantas infectadas con el STV se generaron a partir de semillas infectadas, mientras que las infectadas con el CMV y/o el PepMV se obtuvieron mediante inoculación mecánica. El ensayo consistió en diez plantas control o *Mock* no infectadas con ningún virus (solo inoculadas con tampón de inoculación), diez plantas infectadas con el STV generadas a partir de semillas infectadas (grupo STV), ocho plantas infectadas con el CMV (grupo CMV), cinco plantas infectadas con el PepMV (grupo PepMV), diez plantas infectadas con el STV y el CMV (grupo STV + CMV), diez plantas infectadas con el STV y el PepMV (grupo STV + PepMV), ocho plantas infectadas con el CMV y el PepMV (grupo CMV + PepMV) y diez plantas infectadas con el STV, el CMV y el PepMV (grupo STV + CMV + PepMV). Se realizó un seguimiento periódico de los síntomas a los 5, 10, 15 y 20 días post-inoculación (dpi). Los síntomas observados fueron de mosaico y de deformación foliar, estableciéndose una escala de severidad de 0 a 3, donde 0 correspondía a ausencia de síntomas, 1 síntomas leves, 2 moderados y 3 síntomas severos (Fig. 4.1).

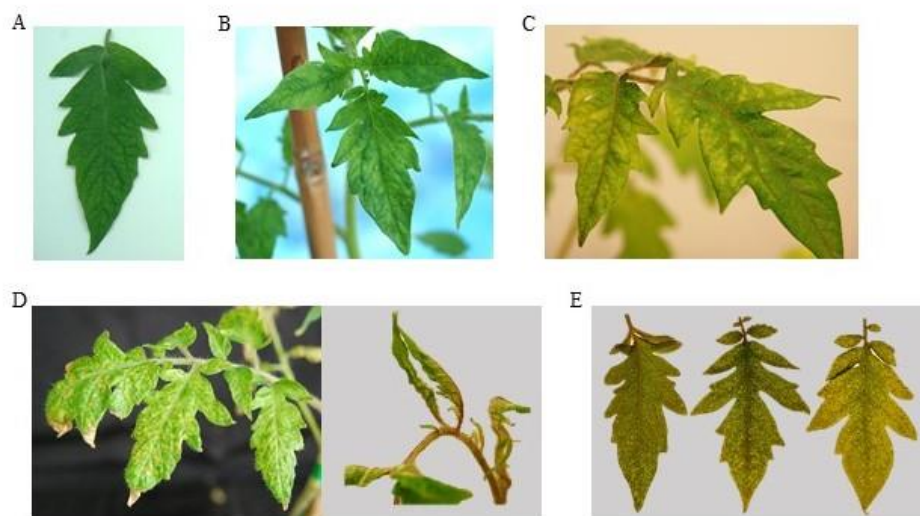


Figura 4.1. Grados de severidad de los síntomas de mosaico y deformación foliar observados en los diferentes grupos de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV), el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV). Se consideraron tres niveles de síntomas, donde 0 correspondía a ausencia de síntomas (Panel A), 1 síntomas leves (Panel B), 2 síntomas moderados (Panel C) y 3 síntomas severos (Panel D). En la parte derecha del Panel D se muestra en detalle la intensa deformación foliar observada en el ápice de la planta. El Panel E muestra en detalle los tres grados de síntomas en la hoja formada (leve, medio y severo, de izquierda a derecha respectivamente).

En la Figura 4.2 se muestra la intensidad media de los síntomas en los diferentes grupos de plantas y en los distintos tiempos. Las plantas infectadas solamente con el STV, al igual que las plantas *Mock*, no mostraron síntomas en ninguno de los tiempos analizados. A 5 dpi, solo las plantas del grupo STV + CMV mostraron síntomas leves (1.25), mientras que no se observaron síntomas en ningún otro grupo de plantas. A 10 dpi, la intensidad de los síntomas de las plantas del grupo STV + CMV aumentaron (2.12) mientras que las plantas del grupo STV + PepMV empezaron a mostrar síntomas leves (1.47). En cambio, en las plantas con infección simple con el CMV o el PepMV los síntomas observados eran menos intensos que las correspondientes coinfecciones con el STV (1.24 en el CMV y 1.06 en el PepMV). A este tiempo también se observaron síntomas leves en las plantas del grupo CMV + PepMV (1) mientras que en las plantas del grupo STV + CMV + PepMV no se observaron síntomas. A 15 dpi, los síntomas observados en las plantas del grupo STV + CMV decrecieron (1.55) y las del grupo STV + PepMV aumentaron (1.97). En este tiempo, las plantas con infecciones simples con el CMV mostraron síntomas menos intensos (1) que la correspondiente coinfección con el STV (STV + CMV) mientras que las plantas con infección simple con el PepMV (2.63) mostraron síntomas más intensos que la correspondiente coinfección con el STV (STV + PepMV). Con respecto a las plantas del grupo CMV + PepMV y STV + CMV + PepMV, la intensidad de los síntomas fue similar (1.43 y 1.37, respectivamente). Finalmente, a los 20 dpi tanto en las plantas del grupo STV + CMV como las del grupo STV + PepMV la intensidad de los síntomas disminuyó (1.26 y 1, respectivamente). En este tiempo, las plantas con infecciones simples con el CMV mostraron síntomas más intensos (2.62) que la correspondiente coinfección con el STV (STV + CMV) mientras que en las plantas con infección simple con el PepMV (1) la intensidad de síntomas fue igual que la correspondiente coinfección con el STV (STV + PepMV). Con respecto a las plantas del grupo CMV + PepMV y STV + CMV + PepMV, la intensidad de los síntomas fue ligeramente mayor en las primeras (2 y 1.76, respectivamente).

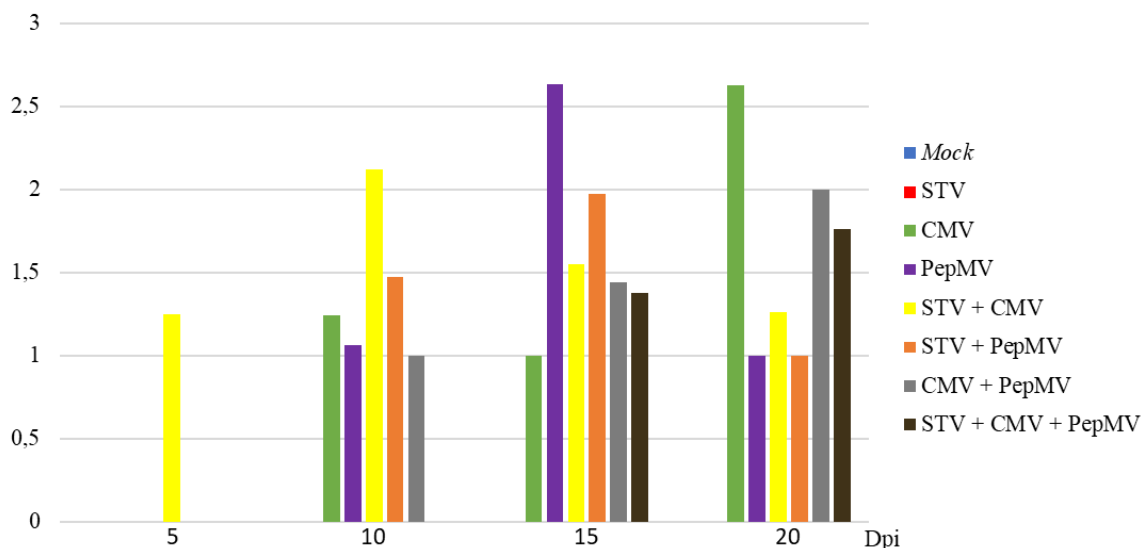


Figura 4.2. Representación gráfica de la severidad (valores medios, eje *y*) de los síntomas observados en hojas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV), el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV), en los diferentes grupos de plantas a los 5, 10, 15 y 20 dpi (eje *x*). Las plantas sin infectar corresponden a las plantas control inoculadas sólo con tampón de inoculación (*Mock*). Los niveles correspondientes a la intensidad de los síntomas fueron de 0 hasta 3, siendo 0 la ausencia de síntomas y 1, 2 y 3 síntomas leves, moderados y severos, respectivamente.

También se calcularon los valores medios de altura y peso de las plantas de los diferentes grupos a 20 dpi (Fig. 4.3). Las plantas *Mock* mostraron una altura similar a las plantas infectadas sólo con el STV (64 y 65 cm, respectivamente). Sin embargo, las plantas infectadas sólo con el CMV mostraron un tamaño significativamente menor (57.50 cm) respecto a las *Mock* mientras que las plantas infectadas sólo con el PepMV tenían un tamaño significativamente mayor (71 cm). Las plantas del grupo STV + PepMV eran significativamente más altas que las infectadas sólo con el PepMV, alcanzando el valor máximo de todo el experimento (75.50 cm). En cambio, las plantas del grupo STV + CMV (57.70 cm) eran de similar tamaño que las plantas infectadas sólo con el CMV. Las plantas del grupo CMV + PepMV tenían una altura intermedia (64 cm) a la de las plantas infectadas solo con el CMV o con el PepMV, con diferencias significativas a ambos grupos. Finalmente, las plantas del grupo STV + CMV + PepMV fueron las plantas más bajas de todo el experimento (50 cm), con diferencias significativas al del resto de los grupos, incluido CMV + PepMV. En cuanto al peso, éste fue similar en las plantas

infectadas sólo con el STV o el CMV y en las *Mock* (11.90, 12.30 y 11 g respectivamente). Las plantas infectadas sólo con el PepMV fueron las de mayor peso (32.70 g), con diferencias significativas al resto de grupos, incluyendo el grupo STV + PepMV (21.70 g). Las plantas infectadas sólo con el CMV mostraron un peso (12 g) similar al grupo STV + CMV (13.20 g). Las plantas del grupo CMV + PepMV (15.50 g) tenían un peso intermedio entre las plantas infectadas sólo con el CMV (12.30 g) y con el PepMV (32.70 g) con diferencias significativas con ambos grupos. El peso del grupo CMV + PepMV también fue significativamente mayor a la del grupo STV + CMV + PepMV (11.30 g).

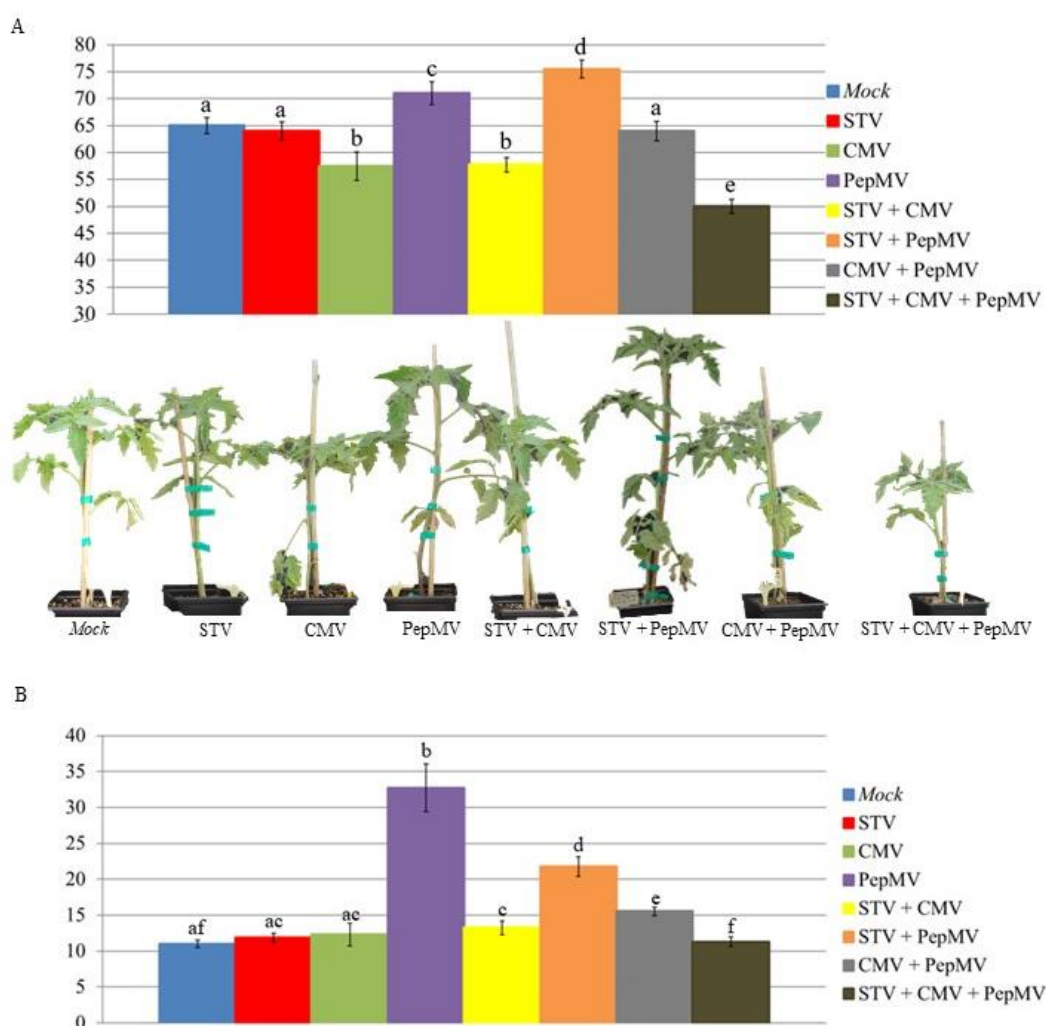


Figura 4.3. Representación gráfica de la altura en cm (Panel A) y peso en g (Panel B) (valores medios) para cada grupo de plantas de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV), virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y del virus del mosaico del pepino (CMV) a 20 dpi. Las plantas sin infectar corresponden a las plantas control inoculadas con tampón de inoculación (*Mock*). Las barras verticales y los subíndices encima de las columnas indican el error estándar y las diferencias significativas entre grupos (P-valor ≤ 0.05), respectivamente.

4.2 Acumulación viral del STV, CMV y PepMV en plantas de tomate en condiciones de infección simple y múltiple

La acumulación del STV, CMV y PepMV en los diferentes grupos de plantas se determinó a los 5, 10, 15 y 20 dpi mediante RT-qPCR empleando cebadores y sondas TaqMan específicas para cada uno de los virus. Para la cuantificación del STV se utilizó la RT-qPCR puesta a punto en esta tesis doctoral (Capítulo 1) y que tenía un rango de cuantificación de 10^{11} a 10^4 copias/ng de RNA total. Para la cuantificación del CMV se diseñaron unos cebadores y una sonda TaqMan en la región CP del RNA 3 del aislado CM95 (*GenBank* AB188236.1) que permitió un rango de cuantificación de 10^{10} a 10^4 copias/ng de RNA total (materiales y métodos: RT-qPCR). Para la cuantificación del PepMV se utilizaron unos cebadores y una sonda TaqMan diseñados a partir de zonas conservadas de la región TGB2 que permitieron un rango de cuantificación de 10^{11} a 10^3 copias/ng de RNA total (Ling et al. 2007). Las curvas patrón de todos los virus fueron óptimas, mostrando una relación lineal con un alto coeficiente de correlación $R^2 = 0.99$, un bajo coeficiente de variación ($< 0.5\%$), y una alta eficiencia de amplificación ($> 99\%$).

Los valores medios de acumulación de cada virus en los diferentes grupos de plantas se muestran en la Figura 4.4. En el caso del STV, su concentración apenas varió (2.38×10^4 - 2.29×10^5 copias/ng de RNA total) en los distintos grupos de plantas (STV, STV + CMV, STV + PepMV y STV + CMV + PepMV) durante todo el ensayo (Fig. 4.4, Panel A). En el caso del PepMV, el patrón de acumulación fue similar en los distintos grupos (PepMV, STV + PepMV, CMV + PepMV y STV + CMV + PepMV): la concentración disminuía desde 5 dpi (2.70 - 5.28×10^6 copias/ng de RNA total) hasta alcanzar un mínimo a 15 dpi (1.39 - 2.43×10^5 copias/ng de RNA total) para luego aumentar ligeramente a 20 dpi (1.01 - 5.20×10^6 copias/ng de RNA total) (Fig. 4.4, Panel B). Sin embargo, el patrón de acumulación del CMV variaba dependiendo del grupo de plantas (Fig. 4.4, Panel C): en las plantas infectadas sólo con el CMV, la concentración del virus se incrementaba ligeramente desde 5 dpi (5.21×10^3 copias/ng de RNA total) hasta los 10 dpi (1.64×10^4 copias/ng de RNA total) y más bruscamente a partir de ese momento hasta los 20 dpi (2.96×10^8 de copias/ng de RNA total). La presencia del STV alteraba el patrón de acumulación del CMV, así en el grupo STV + CMV la concentración del virus aumentaba de manera más constante hasta los 20 dpi (2.45×10^8 copias/ng de

RNA total). En el grupo CMV + PepMV, el patrón de acumulación del CMV variaba completamente, disminuyendo la concentración desde los 5 dpi (8.93×10^3 copias/ng de RNA total) hasta los 15 dpi (1.05×10^2 copias/ng de RNA total), para luego incrementarse en 20 dpi (7.47×10^3 copias/ng de RNA total). Esto cambiaba drásticamente con la presencia del STV, así en el grupo STV + CMV + PepMV la concentración del CMV se incrementaba hasta los 20 dpi (4.16×10^7 copias/ng de RNA total), con un patrón similar a las plantas sólo infectadas con el CMV.

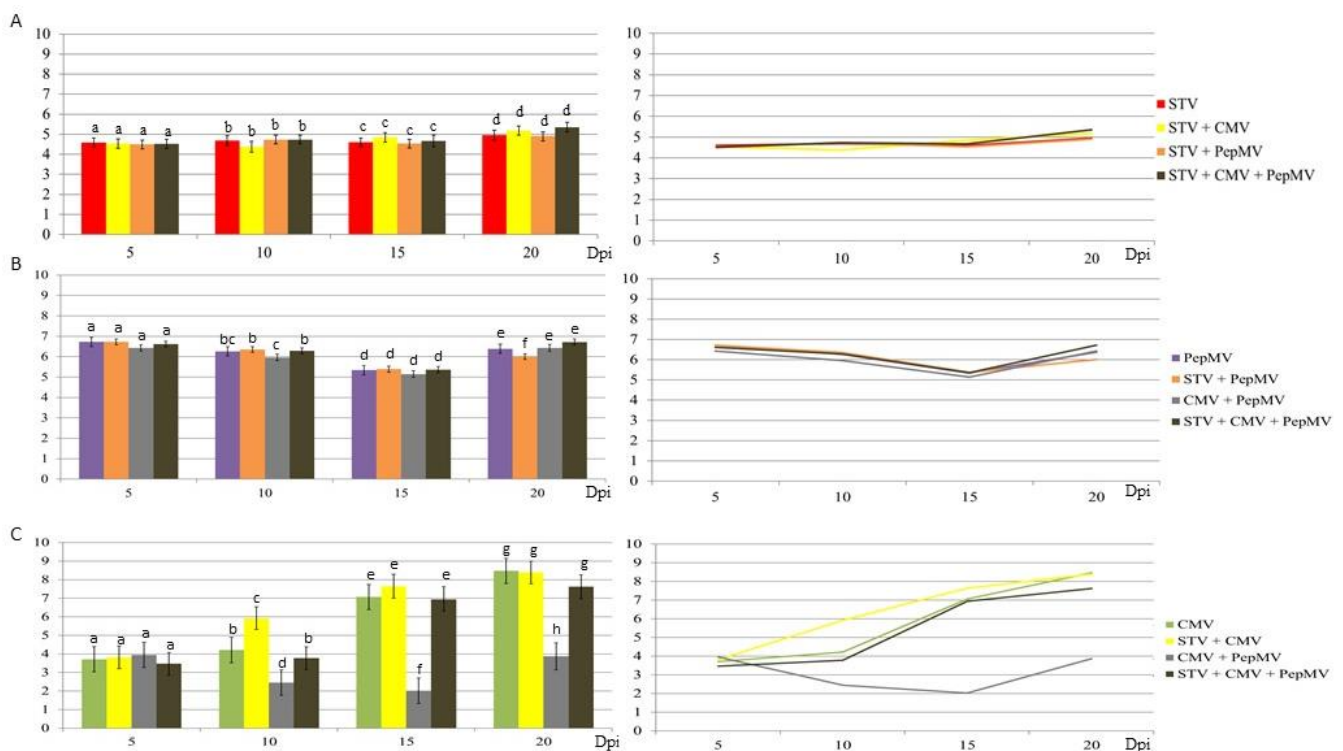


Figura 4.4. Acumulación viral representada como el logaritmo de la concentración del número de copias/ng de RNA (valores medios para cada grupo de plantas, eje y) del virus meridional del tomate (STV), virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y del virus del mosaico del pepino (CMV) (Paneles A, B y C, respectivamente) a 5, 10, 15 y 20 dpi (eje x). Las barras y los subíndices en la parte superior de las columnas corresponden al error estándar y a las diferencias significativas entre grupos (P -valor ≤ 0.05). En cada Panel se muestra la acumulación viral en columnas (parte superior) y en representación lineal (parte inferior).

4.3 Acumulación de siRNAs en plantas de tomate infectadas con el STV, el PepMV y el CMV en condiciones de infección simple y múltiple

La acumulación de siRNAs se estudió en las plantas de los diferentes grupos de plantas. A partir de los extractos de ácidos nucleicos obtenidos de plantas individuales a los 15 dpi se prepararon mezclas de dos o tres extractos de RNA total con el fin de tener tres réplicas biológicas por cada grupo. Como control negativo se emplearon las plantas del grupo *Mock*. De cada una de las réplicas se realizó una secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño obteniéndose las lecturas totales que correspondían a moléculas de RNA tamaño era de 15 a 32 nts (Tabla 4.1). Las lecturas útiles totales a partir de la cuales se realizaron los análisis de miRNAs y vsiRNAs (Tabla 4.1) se obtuvieron al procesar las lecturas totales tras la eliminación de las secuencias de los adaptadores, las colas poliAs y la selección de lecturas de 21-24 nts.

Tabla 4.1. Lecturas obtenidas por secuenciación masiva de RNAs pequeños de las réplicas biológicas de los diferentes grupos de plantas de tomate infectadas con el virus meridional del tomate (STV), virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y del virus del mosaico del pepino (CMV). Las réplicas *Mock* corresponden a las plantas de tomate inoculadas solo con tampón de inoculación.

Muestras	Lecturas totales	Lecturas útiles totales
<i>Mock</i> 1	11049447	7748372
<i>Mock</i> 2	7512326	5140699
<i>Mock</i> 3*	4256600	2831539
STV 1	3816253	2287884
STV 2*	10821879	7447223
STV 3	7843693	5429672
CMV 1	5189500	2001513
CMV 2	6990514	2925636
CMV 3*	7190131	2195301
PepMV 1	11402409	4573369
PepMV 2*	14378959	4754936
PepMV 3	10289785	3818637
STV + CMV 1	9929524	4560116
STV + CMV 2	8479770	3300271
STV + CMV 3*	10460441	2982811
STV + PepMV 1*	8454639	3167202
STV + PepMV 2	8118009	2858518
STV + PepMV 3	8058229	2769603
CMV + PepMV 1	13536163	4702048
CMV + PepMV 2*	10052688	1829211
CMV + PepMV 3	18927187	6740106
STV + CMV + PepMV 1	15292678	7367472
STV + CMV + PepMV 2	11748747	5624718
STV + CMV + PepMV 3	12804145	6063582

* Replicas desestimadas mediante análisis PCA en posteriores estudios.

Tras el procesamiento de las lecturas totales, se obtuvieron entre un 34% y un 70% de lecturas útiles totales, dependiendo del grupo de plantas. El mayor porcentaje se obtuvo en las plantas *Mock* y en las plantas infectadas sólo con el STV (59% y 70%, respectivamente). En el resto de los grupos de plantas, el porcentaje de lecturas útiles obtenidas fue menor (34 - 48%). A partir de estas lecturas útiles totales se identificaron los miRNAs de la planta empleando el programa informático OASIS 2.0 y se analizó su acumulación diferencial en los distintos grupos de plantas infectadas respecto al grupo *Mock* con un P-valor ajustado ($FDR < 0.05$) y un $\log_2\text{FoldChange} > 0.56$ (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Expresión diferencial de miRNAs, identificados en *Solanum lycopersicum* y en otras especies (nuevos), en cada grupo de plantas de tomate respecto a las plantas sin infectar (*Mock*) empleando el programa informático OASIS 2.0 (FDR < 0.05 y log2FoldChange > 0.56).

Grupos	miRNAs con expresión diferencial	
	<i>Solanum lycopersicum</i>	Nuevos
STV – <i>Mock</i>	1	4
CMV – <i>Mock</i>	14	20
PepMV – <i>Mock</i>	14	25
STV + CMV – <i>Mock</i>	26	31
STV + PepMV – <i>Mock</i>	15	22
CMV + PepMV – <i>Mock</i>	11	13
STV + CMV + PepMV – <i>Mock</i>	10	15

Se identificaron un total de 78 miRNAs que mostraban expresión diferencial en los diferentes grupos de plantas infectadas respecto al *Mock*. De éstos, 31 correspondían a miRNAs identificados previamente en tomate y 47 a miRNAs nuevos que habían sido descritos en otras especies vegetales como patata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa*), soja (*Glycine max*), melocotón (*Prunus persica*) o *A. thaliana*. También se encontraron algunos miRNAs con homologías en especies animales como la vaca (*Bos taurus*) o el ratón (*Mus musculus*).

En las plantas infectadas solo con el STV, el CMV y el PepMV se detectaron 5, 34 y 39 miRNAs con expresión diferencial, respectivamente. Se observó que la presencia del STV en los grupos STV + CMV y STV + PepMV modificaba el número de estos, incrementándolo en el primer grupo a 57 y reduciéndolo en el segundo a 37 (Anexo: Material suplementario 3 y 4). La presencia del STV en el grupo STV + CMV + PepMV modificó ligeramente el número de miRNAs con expresión diferencial respecto al grupo CMV + PepMV, 25 y 24, respectivamente (Anexo: Material suplementario 5). Finalmente, en el grupo CMV + PepMV también se observó un número de miRNAs con expresión diferencial (24) menor al de las respectivas infecciones simples con CMV (34) y PepMV (39) (Anexo: Material suplementario 6). A parte de las diferencias en el número, también se observaron variaciones en los niveles de expresión de muchos miRNAs. En las tablas de los anexos se han señalado aquellos que mostraban diferencias significativas considerando valores del log2FoldChange > 0.56.

Del total de 78 miRNAs con expresión diferencial, se infirió la función de un miRNA (mmu-miR-466i-5p) mediante el programa informático psRNAtarget que mediante homología de secuencia determina el gen diana y su función, y de 52 de ellos a través de referencias bibliográficas. Estas funciones abarcaban procesos fundamentales en la planta como metabolismo, estrés abiótico y biótico, respuesta a patógenos y en el desarrollo (Anexo: Material suplementario 3, 4, 5 y 6). El mmu-miR-466i-5p de ratón (nuevo en tomate), se encontraba sobreexpresado en las plantas del grupo STV + CMV (log2FoldChange de 4.06). Este miRNA tenía como diana en plantas de tomate un gen que codifica una proteína constitutiva del lumen tilacoidal de los cloroplastos, por lo que podría estar implicada en el proceso fotosintético de la planta. Ejemplos de miRNAs cuyas posibles funciones habían sido estudiadas en trabajos previos: sly-miR9470-5p el cual estaba sobreexpresado en las plantas infectadas sólo con el CMV o el PepMV y en los grupos STV + CMV, STV + PepMV, CMV + PepMV y STV + CMV + PepMV (log2FoldChange de entre 0.57 y 5.75). Este miRNA estaba involucrado con la respuesta de la planta a estrés hídrico, salino y biótico resultado de la infección por el PVY (Zhao et al. 2017; Prigigallo et al. 2019). El mtr-miR172c-5p de *Medicago truncatula*, que es un nuevo miRNA de tomate, estaba sobreexpresado en plantas infectadas sólo con el CMV y en el grupo STV + CMV (log2FoldChange de 3.77 y 4.73, respectivamente) e infraexpresado en el grupo STV + CMV + PepMV (log2FoldChange de -2.75). Este miRNAs estaba relacionado con la respuesta a estrés salino en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) (Long et al. 2020).

La formación de vsRNAs de origen viral se determinó alineando las lecturas útiles con las secuencias nucleotídicas completas del STV, CMV y PepMV (KJ174690.1, AB188234 y KJ018164). Con los datos del total de lecturas útiles (medias de las réplicas) y los de vsRNAs totales derivados de cada virus (medias de las réplicas) se calculó su porcentaje respecto a las primeras (Fig. 4.5) comprobándose que éstos variaban para cada virus en los distintos grupos de plantas. En las plantas infectadas sólo con el STV se detectaron muy pocos vsRNAs (23.56 lecturas, 0.0003% de las lecturas totales). En cambio, cuando el STV se encontraba con el CMV o el PepMV o con ambos, la cantidad de vsRNAs del STV aumentaba considerablemente (839.88, 329.39 y 1559.32 lecturas y porcentajes del 0.0106%, 0.0028% y 0.0081% de las lecturas totales, respectivamente). Los vsRNAs del CMV fueron muy numerosos en las plantas infectadas sólo con el virus y en los grupos STV + CMV y STV + CMV + PepMV (272758.04, 288716.41 y

330588.95 de lecturas y porcentajes del 5.53%, 3.67% y 1.73% de las lecturas totales, respectivamente). La presencia del PepMV hacía disminuir mucho la cantidad de vsiRNAs del CMV en el grupo CMV + PepMV (7.82 lecturas totales y un porcentaje del 0.000068% de las lecturas totales), aunque como hemos mencionado anteriormente, la presencia del STV hacía que los valores aumentaran nuevamente en el grupo STV + CMV + PepMV. Finalmente, los vsiRNAs del PepMV (21741.45 lecturas totales y porcentaje de 0.2590% de las lecturas totales) disminuyeron con la presencia del STV en el grupo STV + PepMV y del CMV en el grupo CMV + PepMV (8140.93 y 15980.81 lecturas totales y porcentajes de 0.1446% y 0.1396% de las lecturas totales). Sin embargo, en el grupo STV + CMV + PepMV la cantidad de vsiRNAs del PepMV aumentó notablemente (48620.65 lecturas totales y un porcentaje de 0.2551% de las lecturas totales).

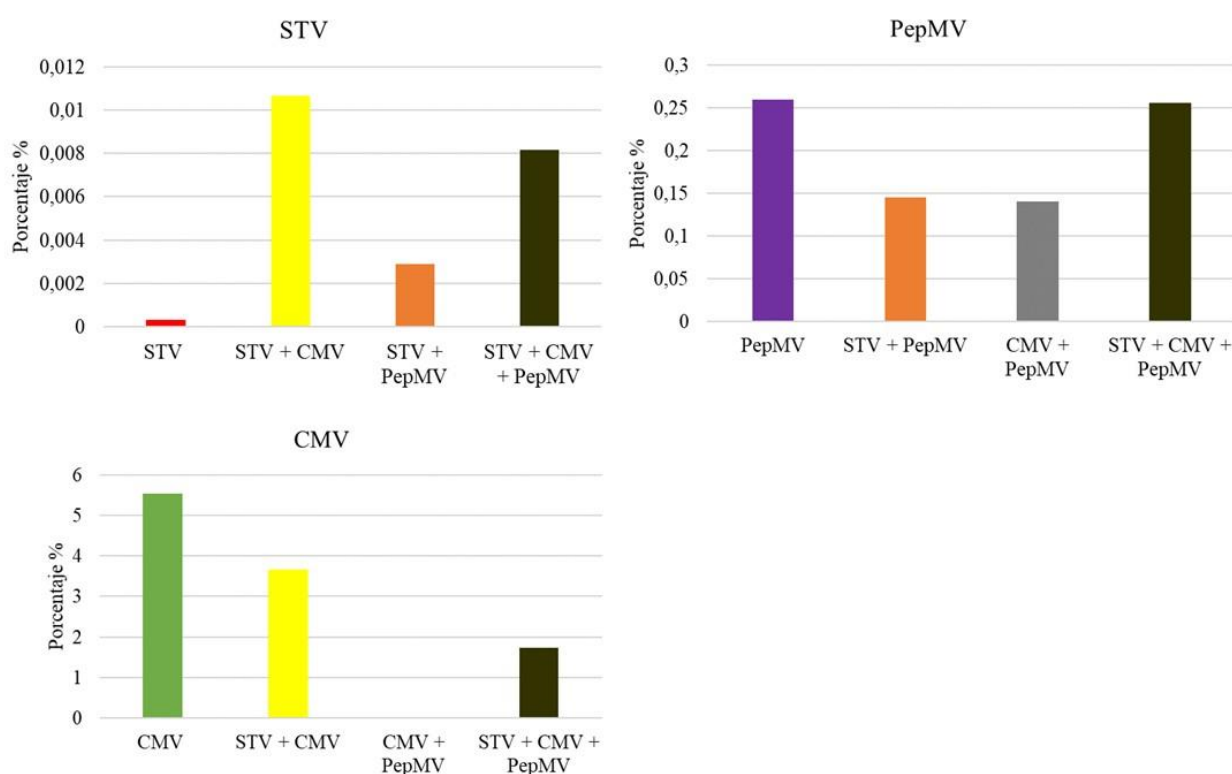


Figura 4.5 Representación gráfica de los porcentajes (% , eje y) de vsiRNAs respecto a las lecturas útiles totales obtenidas por secuenciación masiva de RNAs pequeños para cada virus (virus meridional del tomate, STV, virus del mosaico del pepino, CMV y virus del mosaico del pepino dulce, PepMV) en los diferentes grupos de plantas. La escala en el eje y varía en cada virus.

También se determinó la polaridad de los vsiRNAs alineando las secuencias de éstos con las cadenas positivas y negativas de los genomas de cada virus (Tabla 4.3). Para el STV, en todos los grupos de plantas se detectó una mayor cantidad de vsiRNAs de polaridad negativa (52-74%) que de polaridad positiva (26-48%) y la mayor cantidad correspondía al grupo STV + PepMV (74%). En todos los grupos de plantas infectadas con el CMV también se encontró una mayor cantidad de vsiRNAs de polaridad negativa (67-72%) que de polaridad positiva (28-33%), con la excepción del grupo CMV + PepMV en el que había una mayor cantidad de vsiRNAs de cadena positiva (57%). En cuanto a el PepMV, se detectó una cantidad de vsiRNAs similar de polaridad positiva (50-53%) que de polaridad negativa (47-50%) en todos los grupos de plantas.

Tabla 4.3 Número de vsiRNAs de polaridad positiva y negativa del virus meridional del tomate (STV), el virus del mosaico del pepino (CMV) y el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) en los diferentes grupos de plantas infectadas. Los valores representan las medias de vsiRNAs de las réplicas biológicas. Los porcentajes de vsiRNAs de polaridad positiva y negativa calculados según las lecturas totales se muestran entre paréntesis.

	STV		CMV		PepMV	
	Cadena +	Cadena -	Cadena +	Cadena -	Cadena +	Cadena -
STV	11.12 (47.2%)	12.44 (52.80%)	- -	- -	- -	- -
CMV	- -	- -	88928.90 (32.61%)	183829.1 4 (67.39%)	- -	- -
PepMV	- -	- -	- -	- -	11469.85 (52.75%)	10271.60 (47.25%)
STV + CMV	332.56 (39.6%)	507.32 (60.40%)	78955.78 (27.35%)	209760.6 3 (72.65%)	- -	- -
STV + PepMV	84.43 (25.64%)	244.96 (74.36%)	- -	- -	4346.79 (53.39%)	3794.14 (46.61%)
CMV + PepMV	- -	- -	4.44 (56.78%)	3.38 (43.22%)	8047.01 (50.35%)	7933.80 (49.65%)
STV + CMV + PepMV	626.67 (40.19%)	932.65 (59.81%)	90349.20 (27.33%)	240239.7 5 (72.67%)	24113.38 (49.59%)	24507.27 (50.41%)

A continuación, se determinó la frecuencia de vsiRNAs del STV, CMV y PepMV en cada posición nucleotídica, tanto de las cadenas positivas como negativas, a lo largo de los genomas virales (Fig 4.6). La distribución de vsiRNAs no era uniforme en ninguno

de los casos, detectándose regiones de acumulación con picos que no solían coincidir en las cadenas positivas y negativas. Los patrones de distribución de vsiRNAs de cada virus no variaban en las infecciones dobles o triples (diferentes grupos), lo único que podían variar son las intensidades de los patrones, pero esto era debido a las diferencias de lecturas obtenidas.

La cantidad de vsiRNAs del STV en las plantas infectadas sólo con el STV o del CMV en el grupo (CMV + PepMV) fue tan baja que no fue posible su representación gráfica. La representación de vsiRNAs del STV mostró dos regiones de acumulación (con varios picos) en la cadena negativa, una en la parte media del genoma correspondiente a la zona solapante de p42 con RdRp y otra en la parte final de la RdRp e inicio de la región 3'UTR. En la cadena positiva, solo se observó una zona de acumulación con 2-3 picos en la parte final de la RdRp e inicio de la región 3'UTR. En el CMV se observaron distintas intensidades de acumulación de vsiRNAs dependiendo del segmento genómico (RNA 1, 2 y 3), sobre todo en la cadena negativa. El que mayor cantidad de vsiRNAs presentaba fue el RNA 3, seguido del RNA 2 y finalmente el RNA 1. En este último destacaban dos picos, sobre todo en la cadena negativa, uno al principio (final de 5'-UTR e inicio de la RdRp) y otro al final del segmento en la parte final de la RdRp e inicio de 3'UTR. En el RNA 2 también se observó una mayor acumulación de vsiRNAs en la parte inicial y final de la cadena negativa, con varios picos destacables en la región inicial de la RdRp y en la parte final de 2b. En este segmento, el perfil de la cadena positiva fue algo diferente, destacando un par de picos en la región media de la RdRp. La acumulación de vsiRNAs del RNA 3 fue elevada, sobre todo en la cadena negativa, con 3-4 cuatro picos en las regiones MP y CP. El perfil fue diferente en la cadena positiva en donde se veía una zona de acumulación de vsiRNAs de baja intensidad en la MP y una zona de mayor acumulación en la CP. Finalmente, se observó una mayor acumulación vsiRNAs de PepMV en la mitad 5'terminal del genoma, con al menos 4 picos en la cadena negativa, en la región RdRp. Sin embargo, en la cadena positiva, la acumulación de vsiRNAs parecía más homogénea observándose diferentes picos repartidos a lo largo de todo el genoma y afectando a las regiones 5'y 3'UTRs y a varios ORFs como la región central de la RdRp, el inicio del TGB1 y el inicio de la CP.

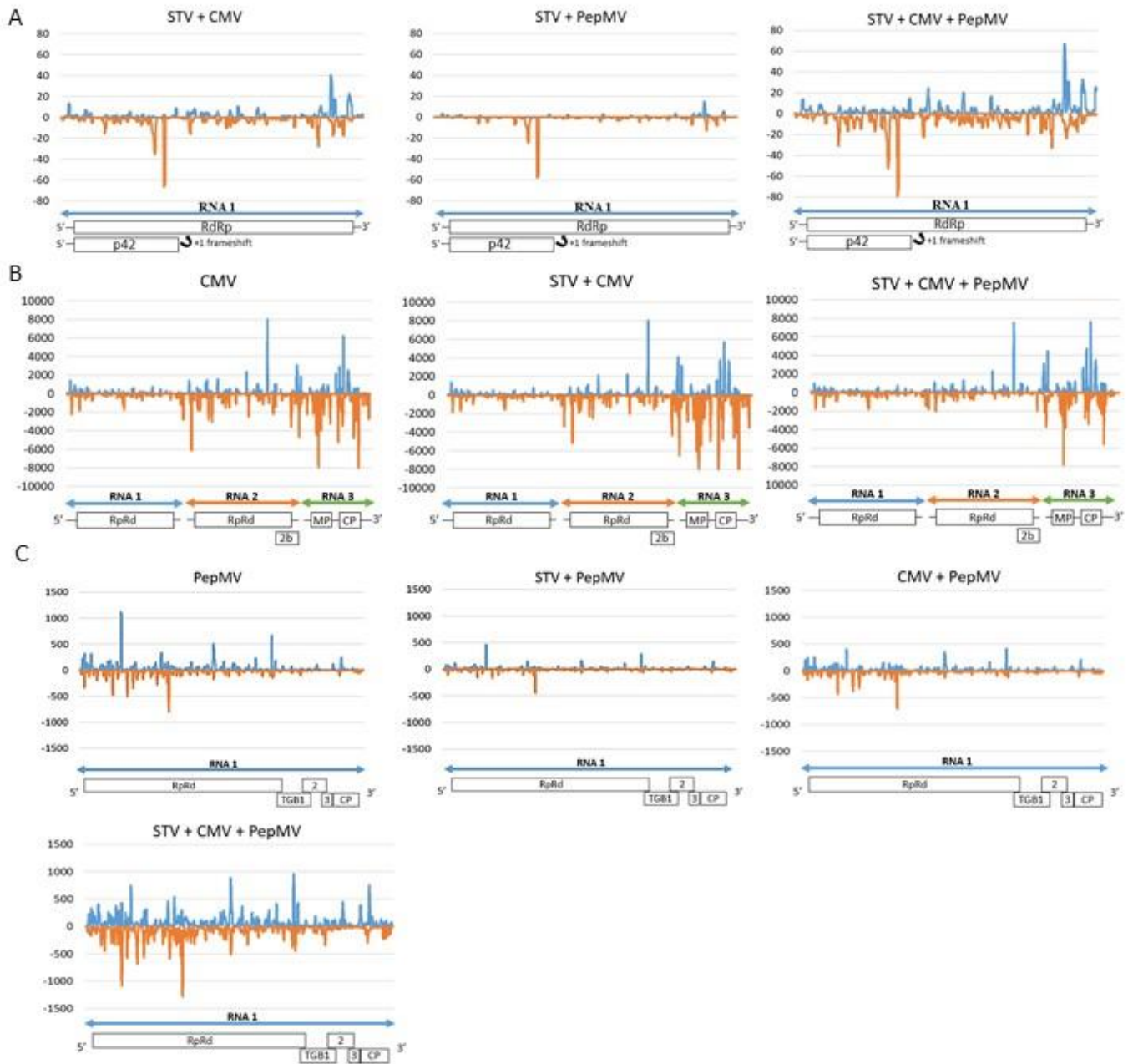


Figura 4.6. Representación gráfica de las frecuencias de acumulación de vsiRNAs de polaridad positiva (azul) y negativa (naranja) derivados del virus meridional del tomate (STV), virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) (Paneles A, B y C, respectivamente) a lo largo del genoma en los diferentes grupos de plantas. La escala en el eje y varía en cada virus.

Discusión

En los capítulos precedentes de esta tesis se demostró que no había ningún efecto visible en las plantas de tomate cuando éstas estaban infectadas solo con el STV tanto en la producción de fruta, síntomas, cambios a nivel tisular o celular y respuesta a la salinidad, aunque se modificaba la acumulación de algunos miRNAs relacionados con funciones importantes como metabolismo, homeostasis celular, transporte intracelular, formación de vesículas o estructuración del ribosoma.

En este capítulo se ha estudiado la capacidad del STV para interactuar con otros virus agudos, ya que el STV se detecta frecuentemente en infecciones múltiples con diversos virus agudos (Candresse et al. 2015; Iacono et al. 2015; Padmanabhan et al. 2015a, b; Verbeek et al. 2015). Se realizó un ensayo con plantas de tomate infectadas con el STV y con dos virus agudos importantes como el CMV y el PepMV en infecciones simples, dobles y triples. El grupo de plantas infectadas solo con el STV no mostró ningún síntoma, corroborando los resultados obtenidos en el Capítulo 2, así como los reportados por otros autores (Herrera-Vásquez et al. 2017; Puchades et al. 2017; Elvira-González et al. 2018, 2019; Fukuhara et al. 2019). En este ensayo, la concentración del STV se mantenía constante en el tiempo tanto en infección simple como en múltiple (doble y triple), en concordancia con los resultados del Capítulo 1 (Elvira-González et al. 2018). Esto contrasta con la mayoría de virus agudos, cuya concentración varía en las distintas fases de la infección (Ferriol et al. 2011; Carpino et al. 2019).

El STV y el CMV (grupo STV + CMV) establecían una interacción sinérgica que producía el adelanto de los síntomas, incrementando su severidad, y un aumento de la acumulación del CMV en las primeras fases de la infección. El STV también producía un incremento de los síntomas en plantas coinfectadas con el PepMV (grupo STV + PepMV) pero no provocaba cambios en la acumulación del PepMV. Hasta la fecha han sido descritas numerosos sinergismos entre virus agudos, aunque esta es la primera descripción de una interacción sinérgica entre un virus persistente y dos virus agudos. Dentro de los sinergismos entre virus agudos, podemos destacar aquellos en los que interviene un potyvirus. Por ejemplo, la infección con el potyvirus PVY y el potexvirus PVX produce un incremento en la acumulación del PVX acompañado del aumento de la severidad de los síntomas en la planta infectada (Chávez-Calvillo et al. 2016; Landeo-Ríos et al. 2017). El mecanismo que subyace en las interacciones sinérgicas no está del

todo claro, aunque en el caso de los potyvirus se ha reportado que el VSR de éstos (HC-Pro) es capaz de suprimir el mecanismo de defensa basado en el PTGS de la planta, favoreciendo la replicación y acumulación del virus acompañante (Syller 2012). En el Capítulo 2 de esta tesis se determinó que p42 de STV no tenía actividad VSR. Sin embargo, no podemos descartar que esta actividad pudiera estar en la otra proteína codificada por el STV como la RdRp.

La infección simple por PepMV inducía síntomas foliares en las plantas de tomate, cuya intensidad aumentaba hasta ser de intensidad media-severa a los 15 dpi, disminuyendo a los 20 dpi. Sin embargo, la concentración viral variaba poco, observándose un ligero descenso a los 15 dpi y una recuperación a los 20 dpi. Este patrón de acumulación no es común en los virus agudos, que normalmente incrementan su concentración desde el momento de la infección hasta alcanzar un máximo que sigue con una meseta o un ligero descenso (Ferriol et al. 2011; Carpino et al. 2019). Además, a los 20 dpi se observó que el PepMV inducían un aumento de la altura y peso de las plantas con respecto a las plantas control. Hay estudios que demuestran que la infección por un virus agudo no necesariamente tiene un efecto negativo en su hospedador, como sucede con CMV, que favorece la resistencia de la planta de remolacha al estrés térmico (Roossinck 2011). La presencia del STV en plantas infectadas con el PepMV hacía aumentar su altura, pero disminuía el peso, debido a una disminución del grosor del tallo. Se ha reportado que la coinfección del PepMV y el ToTV induce un ligero incremento de la altura de las plantas de tomate infectadas respecto a las plantas sin infectar (Gómez et al. 2010).

En las plantas coinfectadas con el CMV y el PepMV (grupo CMV + PepMV) se observó un efecto antagónico con una disminución de la acumulación del CMV y unos síntomas distintos a las infecciones simples del CMV o el PepMV. Al tratarse de virus que no están relacionados filogenéticamente, esta interacción no puede explicarse como una protección cruzada o un fenómeno de exclusión mutua. También se han descrito antagonismos entre virus distintos filogenéticamente, aunque en estos casos no se ha determinado el mecanismo implicado en el mismo. Un ejemplo es la infección simultánea del CGMMV y el ToLCNDV en plantas de calabacín, donde se observa un antagonismo que dificulta la replicación del ToLCNDV y una disminución de los síntomas inducidos por este, aunque el mecanismo es desconocido (Crespo et al. 2020). Algo así podría suceder con el CMV y el PepMV en nuestro experimento. La infección del STV en

plantas infectadas con el CMV y el PepMV produjo la supresión del efecto antagónico que ocurre en infecciones dobles del CMV y el PepMV, restaurando la concentración viral del CMV y modificando nuevamente los síntomas. Esta es la primera descripción de un fenómeno en el que la presencia de un virus persistente, como el STV, modifica el tipo de interacción que se establece entre dos virus agudos distintos el CMV y el PepMV.

En este capítulo de tesis también se ha estudiado el efecto que tiene la interacción entre el STV, el CMV y el PepMV en las poblaciones de los miRNAs de la planta y los vsiRNAs de origen viral. Se determinó la expresión diferencial de 78 miRNAs en las plantas de tomate infectadas por estos virus respecto al control (*Mock*), de los cuales 47 correspondían a miRNAs nuevos en tomate. Se ha descrito que la infección por virus, como el PVY y el PRSV, estimula la síntesis de miRNAs nuevos (Guo et al. 2012; Prigigallo et al. 2019). Estos miRNAs con expresión diferencial estaban mayoritariamente involucrados en procesos fundamentales en la planta como desarrollo, metabolismo, estrés abiótico y biótico (Anexo: Material suplementario 3, 4, 5 y 6), por lo que variaciones en su acumulación podrían implicar importantes cambios en la planta. El número de miRNAs expresados diferencialmente y su nivel de acumulación variaba dependiendo de la combinación de virus con el que la planta estuviese infectada.

En este estudio se concluyó que la presencia del STV en los distintos grupos de plantas también era capaz de inducir cambios en la acumulación de miRNAs, tanto en número como en el nivel de expresión. Por ejemplo, sly-miR164b-3p, que está relacionado con estrés salino, sequía y maduración del fruto en plantas de tomate, tenía expresión diferencial en el grupo STV + CMV pero no en las plantas infectadas sólo con CMV, además este miRNA no tenía expresión diferencial en el STV (Zhao et al. 2017; Yin et al. 2018). El miRNA stu-miR398a-5p, que está relacionado con la tolerancia a la infección de virus, tenía expresión diferencial en el grupo STV + PepMV pero no en las plantas infectadas sólo con el PepMV, de igual forma, este miRNA no tenía expresión diferencial en STV (Stare et al. 2019). Se han reportado numerosos casos en los que la infección por virus afecta la acumulación de miRNAs endógenos. Algunos ejemplos en tomate son el miR159/319 y miR172, que están relacionados con el enrollamiento de las hojas, y su acumulación se ve alterada por la infección con el ToLCNDV (Naqvi et al. 2010). En *A. thaliana* la acumulación de los miR163, miR164 y miR167 se altera por la infección por el ToMV (Tagami et al. 2007).

También se identificaron los vsiRNAs de origen viral, tanto de polaridad positiva como negativa, y su proporción variaba dependiendo del virus y de la combinación de dichos virus en infecciones múltiples. La cantidad de vsiRNAs generados en las plantas infectadas solo con el STV fue muy pequeña, pero los vsiRNAs del STV se incrementaba notablemente en plantas coinfectadas con el PepMV y el CMV. Estas variaciones en la producción de vsiRNAs del STV no estaban relacionadas con la acumulación viral ya que la concentración del STV no variaba con la presencia de otros virus. Estos resultados son similares a los de otros autores que han reportado concentraciones bajas de vsiRNAs del STV en plantas en infecciones simples y altas en infecciones con otros virus (Niu et al. 2017; Turco et al. 2018; Fukuhara et al. 2019). Se observó que la presencia del STV variaba la cantidad de vsiRNAs del CMV y PepMV generados, en algunos casos de manera notable, no relacionados con la acumulación viral. La interacción del CMV y PepMV también tuvo efecto en la formación de los vsiRNAs en ambos virus, principalmente en el CMV donde prácticamente no se detectaban. En este caso, sí que podía haber una correlación con la replicación viral, ya que la concentración del CMV era muy baja por el efecto antagónico del PepMV. Las diferencias en la expresión de vsiRNAs pueden ser relevantes en el desarrollo de los síntomas ya que son capaces de mimetizar, por homología de secuencia, la acción de miRNAs endógenos. Existen evidencias de que algunos vsiRNAs del virus del mosaico de la caña de azúcar (surgarcane mosaic virus, SCMV) y el RSV pueden tener como diana ciertos genes en maíz y arroz, respectivamente, alterando su desarrollo (Huang et al. 2016). También hay evidencias de este fenómeno en los vsiRNAs generados por el RNA satélite Y del CMV en *N. tabacum* y por el TYLCV en tomate (Smith et al. 2011; Yang et al. 2019).

El estudio de la frecuencia de vsiRNAs por nucleótido, tanto de las cadenas positivas como negativas de los genomas virales, mostró que la distribución de vsiRNAs no era uniforme en ninguno de los virus, detectándose regiones de acumulación con picos que no solían coincidir en las cadenas positivas y negativas. Sin embargo, los patrones de distribución de vsiRNAs para cada virus no parecían estar influenciados por otros virus en los diferentes grupos de plantas. Sólo podían observarse diferencias en la intensidad de acumulación de vsiRNAs, que podía correlacionarse con diferencias en la cantidad de lecturas útiles totales obtenidas. Es habitual encontrar patrones no uniformes en la distribución de las frecuencias de vsiRNAs como sucede con el propio STV o el PepMV (Turco et al. 2018). También se ha comprobado que en las infecciones simultáneas de

virus como el PRSV y el PapMV no alteran los patrones de frecuencias de acumulación de vsiRNAs respecto a las infecciones simples (Chávez-Calvillo et al. 2016).

En resumen, en este capítulo de la tesis se ha demostrado que el STV interacciona con los virus agudos CMV y PepMV mediante: i) adelanto de los síntomas inducidos por CMV así como su severidad y acumulación del virus a 10 dpi, ii) aumento de la severidad de los síntomas inducidos por PepMV a 10 dpi, iii) supresión del antagonismo entre el CMV y el PepMV con la recuperación de la concentración de CMV y modificación de los síntomas respecto a las plantas co-infectadas con ambos virus, iv) alteración del número y acumulación de miRNAs expresados diferencialmente en plantas infectadas con el CMV, el PepMV o ambos y v) la modificación de la cantidad de los vsiRNAs generados por el CMV y el PepMV. Todo esto hace que el STV sea muy relevante desde el punto de vista fitopatológico y urge a establecer medidas para controlar su dispersión en campo.

Discusión general

La información que se tiene sobre los virus persistentes es muy limitada ya que han sido poco estudiados debido a que no suelen producir daños en los cultivos. En esta tesis se ha estudiado el STV, un virus persistente, del género *Amalgavirus* en la familia *Amalgaviridae*. Infecta solamente tomate y se encuentra ampliamente distribuido incluyendo algunos países de la Cuenca Mediterránea como España e Italia. Inicialmente, el STV se asoció a diversos síntomas como decoloración y alteración en la maduración del fruto de tomate. Sin embargo su implicación en el desarrollo de los síntomas descritos no estaba clara ya que frecuentemente el STV se detectaba en múltiples infecciones con otros virus y en algunas plantas asintomáticas (Sabanadzovic et al. 2009; Alcalá-Briseno et al. 2017; Puchades et al. 2017).

Para poder establecer estrategias de control eficaces, es necesario disponer de herramientas diagnósticas específicas y sensibles. Estas se pueden utilizar para estudiar la forma de transmisión y dispersión de los virus y avanzar en el desarrollo de estrategias para minimizar los daños que producen (Pallás et al. 2018). En el primer capítulo de esta tesis se llevó a cabo la puesta a punto de la RT-LAMP y la RT-qPCR para la detección específica y sensible del STV. La RT-LAMP permitió reducir costes y simplificar el procedimiento, siendo muy útil para la detección del STV en campo. Además, su sencillez resulta ideal para ser empleada en laboratorios con recursos y equipamientos limitados. Esta técnica se ha utilizado con éxito en la detección de los virus H1N1 y el HIV en humanos, el VHSV en salmones, y el CTV, el TSWV, el PYMPV, el ToLCSiV y el TYMoV, entre otros (Poon et al. 2005; Soliman and El-Matbouli 2006; Curtis et al. 2008; Bhat et al. 2013; Wang et al. 2013; Budziszewska et al. 2016; Herrera-Vásquez et al. 2017). La LAMP ha permitido la detección “*in situ*” de distintos patógenos de plantas visualizando la reacción mediante floculación de nanopartículas (Wee et al. 2015; Nurul Najian et al. 2016).

La RT-qPCR es una técnica muy sensible que permitió detectar y cuantificar el STV en distintos tipos de tejidos de tomate, incluyendo semillas individuales. El virus se acumulaba principalmente en las raíces y hojas, y en las semillas se encontraba tanto en cubierta como en embrión, lo que dificulta las tareas de desinfección de las mismas. Se comprobó que las tasas de transmisión por semilla del STV podían alcanzar el 80%, y la incidencia en campo del virus era muy elevada en las dos zonas estudiadas, la Comunidad Valenciana y Gran Canaria, siendo mayor en esta última. En trabajos previos también se han reportado elevadas tasas de transmisión del STV y otros virus persistentes como el

PCV-1 (Sabanadzovic et al. 2009; Sabanadzovic and Valverde 2011). Esto parece indicar que la tasa de transmisión es mucho más elevadas en los virus persistentes que en los virus agudos transmitidos por semilla como el TMV, el ToMV o el PepMV (Hadas et al. 2004; Córdoba-Sellés et al. 2007; Sabanadzovic et al. 2009; Hanssen et al. 2010c). La elevada tasa de transmisión por semilla podría explicar las alta incidencia en campo del STV y otros virus persistentes como el WCCV-1 o el BCV (Boccardo et al. 1987; Natsuak et al. 1983; Guy and Gerard 2016). El análisis de plántulas de tomate reveló la presencia del STV en la mayoría de los viveros que se analizaron. La incidencia del STV en plantas de campo, plántulas de vivero y semillas era mayor en las variedades de tomate comerciales (semillas distribuidas por empresas) que en las locales (generadas por los propios agricultores). Por otra parte, la concentración del STV en la planta se mantuvo constante en el tiempo, en contraste con la mayoría de virus agudos, cuya acumulación fluctúa durante la infección (Ferriol et al. 2011; Tromas et al. 2014).

El análisis de las secuencias nucleotídicas de la región que codifica para la hipotética (p42) de aislados del STV de distintos países reveló una diversidad genética muy baja, como ocurre para el BBLV, otro miembro del género *Amalgavirus*. También se realizaron análisis comparativos de diversidad genética con otros virus persistentes y con virus agudos, observándose amplios rangos en ambos grupos (Roy et al. 2005; Kaye et al. 2011; Martin et al. 2012; Cantanhêde et al. 2018). El análisis filogenético de los aislados del STV reveló que no existía correlación entre la región geográfica y la diversidad genética de éstos. La escasa diversidad genética del virus y la falta de correlación entre la distancia genética de aislados y su origen geográfico podría deberse a una rápida dispersión del virus a través de la comercialización de semillas infectadas. También podría ser debido a una fuerte presión de selección negativa, dado que aislados separados en el tiempo y espacio tenía la misma secuencia y que el análisis de las substituciones no sinónimas y sinónimas (dN/dS) mostró una selección negativa a nivel nucleotídico y aminoacídico. En otros virus de plantas también se ha observado baja variabilidad y fuertes presiones de selección negativa (García-Arenal et al. 2001; Davino et al. 2012; Walia et al. 2014; Rubio et al. 2020). En este trabajo de tesis doctoral se han estudiado diversos aspectos relacionados con la interacción del STV con la planta de tomate como la producción, resistencia a la salinidad, inducción de síntomas y producción de siRNAs. El ensayo realizado mostró que no había una diferencia significativa ni en el número medio de frutos producidos ni en su peso medio entre las plantas infectadas con

el STV y las plantas no infectadas, lo que concuerda con otros estudios (Sanahuja 2017; Fukuhara et al. 2019). La infección del STV tampoco tuvo ningún efecto en el peso de la planta. Al estudiar la respuesta a la salinidad de las plantas de tomate con o sin virus se observó que algunos parámetros fisiológicos, como la conductividad estomática, eficacia del fotosistema II, la fotosíntesis neta y peso de la planta variaban con la salinidad, pero la infección por el STV no producía ningún efecto. Hay virus capaces de proporcionar a la planta un beneficio frente a situaciones de estrés, como el CMV que confiere tolerancia a las plantas de remolacha a bajas temperaturas o el TMV que confiere tolerancia a plantas *N. benthamiana* frente a la sequía (Xu et al. 2008; Roossinck 2011).

Finalmente, las plantas de tomate infectadas sólo con el STV no mostraron ningún síntoma, lo cual ya había sido reportado previamente (Alcala-Briseno et al. 2017; Puchades et al. 2017). La observación al microscopio óptico y TEM de tejido infectado no mostró ninguna anomalía que se pudiera relacionar con una infección viral. Por ejemplo, la proliferación o hipertrofia de cloroplastos y mitocondrias o la formación de estructuras tubulares derivadas del citoesqueleto han sido asociadas a la infección por algunos virus agudos (Šutić and Sinclair 1991; Medina et al. 2003; Alfaro-Fernández et al. 2010; Liu et al. 2011). Tampoco se pudieron encontrar partículas virales del STV, como ya había sido reportado (Sabanadzovic et al. 2009). A pesar de no observarse ningún efecto visible de la infección de STV, el análisis de RNAs de pequeño tamaño reveló que la presencia del virus provocaba cambios en la expresión diferencial de cinco miRNAs, cuatro de ellos nuevos en tomate. Estos miRNAs tenían como dianas de regulación genes involucrados en procesos de desarrollo, estrés o patogenicidad, por lo que pueden ser esenciales para la planta. La detección de miRNAs nuevos se ha relacionado con la infección por virus como el PVY, el PRSV y el RSV, así como a estrés abiótico como el estrés térmico (Guo et al. 2012; Pan et al. 2017; Prigigallo et al. 2019). Hasta el momento se desconoce cómo pueden afectar estos cambios en la regulación de miRNAs en las plantas de tomate infectadas con el STV. Los análisis de siRNA también revelaron bajas concentraciones de vsiRNAs del STV. Esto podría ser debido a que el genoma viral se encuentra protegido en la célula vegetal, siendo inaccesible a la maquinaria de silenciamiento génico de la planta. Los estudios de TEM no revelaron la presencia de viriones ni ninguna estructura que pudiera proteger al genoma viral. Alternativamente, el STV podría codificar un VSR, aunque los ensayos de expresión transitoria del p42 (hipotética Cp) del STV en plantas de *N. benthamiana* 16C mostró que

no tenía actividad VSR. Sin embargo, no se puede descartar que esta actividad pudiera estar en la otra proteína viral, la RdRp.

En el último capítulo de esta tesis se estudió la interacción del STV en plantas con infecciones múltiples con virus agudos importantes en el cultivo del tomate como el CMV y el PepMV. Como hemos mencionado anteriormente, el STV ha sido detectado con mucha frecuencia en infecciones múltiples con distintos virus agudos, entre los que se encuentran el CMV y el PepMV (Sabanadzovic et al. 2009; Candresse et al. 2015; Iacono et al. 2015; Padmanabhan et al. 2015b; Verbeek et al. 2015). Los resultados obtenidos mostraron complejas interacciones entre los diferentes virus que implicaban variaciones en la severidad de síntomas, en los niveles de acumulación viral y en las poblaciones de miRNAs y vsRNAs. Se comprobó que el STV establecía una interacción sinérgica en plantas coinfectadas con el CMV o el PepMV durante las primeras fases de la infección. En el caso de CMV, se producía un adelanto de los síntomas, así como un incremento de la severidad de los mismos y de la concentración de CMV a 10 dpi mientras que en el caso de PepMV sólo se producía un incremento de la severidad de los síntomas a este tiempo. Hasta la fecha han sido descritos numerosos sinergismos entre virus agudos, aunque esta es la primera descripción de una interacción sinérgica entre virus persistentes y virus agudos. El mecanismo que subyace en las interacciones sinérgicas no está del todo claro, aunque se ha reportado que el VSR de los potyvirus (HC-Pro) es capaz de suprimir el mecanismo de defensa basado en el PTGS de la planta, favoreciendo la replicación y acumulación del virus acompañante (Pacheco et al. 2012a; Syller 2012). En el caso de STV, hasta el momento no se ha descrito ninguna proteína viral con actividad VSR.

La coinfección del CMV y el PepMV resultó en una interacción antagónica, disminuyendo la acumulación del CMV y cambiando la sintomatología con respecto a la infección simple de ambos virus. Se han descrito antagonismos entre virus distintos como el CGMMV y el ToLCNDV, pero el mecanismo de la interacción sigue siendo desconocido (Crespo et al. 2020). La infección del STV en plantas infectadas con el CMV y el PepMV produjo la supresión del efecto antagónico que ocurre en infecciones dobles del CMV y el PepMV, restaurando la concentración viral del CMV y modificando nuevamente los síntomas. Esta es la primera descripción de un fenómeno en el que la presencia de un virus persistente, como el STV, modifica el tipo de interacción que se establece entre dos virus agudos, el CMV y el PepMV.

El análisis de RNAs de pequeño tamaño en los diferentes grupos de plantas reveló la expresión diferencial de 78 miRNAs, siendo 47 miRNAs nuevos en tomate. Estos miRNAs con expresión diferencial estaban mayoritariamente involucrados en procesos fundamentales en la planta como desarrollo, metabolismo, estrés abiótico y biótico, por lo que variaciones en su acumulación podrían implicar importantes cambios en la planta. El número de miRNAs expresados diferencialmente y su nivel de acumulación variaba dependiendo de la combinación de virus con el que la planta estuviese infectada. En este estudio se concluyó que la presencia del STV en los distintos grupos de plantas también era capaz de inducir cambios en la acumulación de miRNAs, tanto en número como en el nivel de expresión. Se han reportado numerosos casos en los que la infección por virus afecta la expresión diferencial de miRNAs endógenos. Como por ejemplo, el miR159/319 y miR172, que están relacionados con el enrollamiento de las hojas en tomate, y su acumulación se ve alterada por la infección con el ToLCNDV (Naqvi et al. 2010) y los miR163, miR164 y miR167 en *A. thaliana*, cuya acumulación se altera por la infección por el ToMV (Tagami et al. 2007).

También se identificaron vsiRNAs de origen viral, tanto de polaridad positiva como negativa, y su proporción variaba para cada virus y la combinación de virus. La cantidad de vsiRNAs generados en las plantas infectadas solo con el STV fue ínfima, pero se incrementaba notablemente con la presencia del PepMV y sobre todo con el CMV. Estos resultados son similares a los de otros autores que han reportado concentraciones bajas de vsiRNAs del STV en plantas infectadas solo con este virus, pero que se incrementaban con la presencia de otros (Niu et al. 2017; Turco et al. 2018; Fukuhara et al. 2019). También se han reportado pequeñas cantidades de vsiRNAs en los endornavirus, que también son virus persistentes (Fukuhara 2019).

Por otra parte, la infección del STV en plantas coinfectadas con el CMV o el PepMV variaba la cantidad de vsiRNAs del CMV y PepMV. En plantas coinfectadas con el CMV y el PepMV se produjo una disminución de la cantidad de vsiRNAs en CMV que se correlacionaba con la disminución en la acumulación del CMV. La formación de vsiRNAs puede alterar el desarrollo de las plantas ya que son capaces de mimetizar, por homología de secuencia, la acción de miRNAs endógenos. Existen evidencias experimentales de que algunos vsiRNAs del SCMV y del RSV pueden tener como diana ciertos genes en maíz y arroz, respectivamente, alterando su desarrollo (Huang et al. 2016). También hay evidencias de este fenómeno en vsiRNAs generados por el RNA

satélite Y del CMV en *N. tabacum* y por el TYLCV en tomate (Smith et al. 2011; Yang et al. 2019).

El estudio de la frecuencia de vsiRNAs en cada posición nucleotídica de los genomas virales, tanto de las cadenas positivas como negativas, mostró que la distribución de vsiRNAs no era uniforme en ninguno de los virus, detectándose regiones de acumulación con picos que no solían coincidir en las cadenas positivas y negativas. Estos patrones de distribución de vsiRNAs para cada virus no parecen estar influenciados por la coinfección de los otros virus. En otros estudios se ha encontrado patrones no uniformes en la distribución de las frecuencias de vsiRNAs del STV y del PepMV y también en otros virus (Chávez-Calvillo et al. 2016; Turco et al. 2018). También se ha encontrado coinfecciones de virus en una misma planta, como el PRSV y el PapMV que no alteran los patrones de frecuencias de acumulación de vsiRNAs respecto a las infecciones simples (Chávez-Calvillo et al. 2016).

En resumen, en esta tesis hemos demostrado que el STV es un virus muy estable genéticamente y que tiene incidencias altas en las regiones productoras de tomate estudiadas (Comunidad Valenciana e Islas Canarias). Esta alta incidencia podría explicarse por el elevado grado de infección de semillas y plántulas de tomate distribuidas por viveros. El STV parece no tener efectos fisiológicos evidentes en las plantas de tomate en infecciones simples, aunque si se han observado diferencias en la acumulación de algunos miRNAs en tomate. Sin embargo, el STV interacciona con otros virus como el CMV y el PepMV, alterando los síntomas y la concentración de estos virus, siendo más apreciable en el CMV. La presencia del STV en infecciones mixtas con el CMV y el PepMV modifica la expresión diferencial de miRNAs con respecto a las infecciones simples, así como el número de vsiRNAs del CMV y del PepMV. A su vez, la cantidad de vsiRNAs del STV también aumenta en las infecciones mixtas. Todo esto hace que la presencia del virus en el cultivo de tomate sea muy relevante desde el punto de vista fitopatológico y urge establecer medidas para controlar su dispersión en campo.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a partir de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de esta tesis doctoral son las siguientes:

1. Se puso a punto la detección del STV mediante RT-LAMP y RT-qPCR. La RT-LAMP mostró una sensibilidad equivalente a la RT-PCR convencional y fue 100 veces más sensible que la hibridación molecular. La RT-qPCR fue 100 veces más sensible que la RT-PCR convencional y RT-LAMP, y 10000 veces más sensible que la hibridación molecular.
2. Mediante RT-LAMP se detectó el STV a partir de extractos brutos sin procesar. La amplificación se visualizó directamente en el tubo de reacción sin necesidad de electroforesis, eliminando el proceso de post-PCR. Este método de diagnóstico permite procesar un elevado número de muestras de manera sencilla, barata y sin la necesidad de costosos equipamientos. Por tanto, la RT-LAMP es adecuada para el diagnóstico del STV en campo.
3. La cuantificación del STV mediante RT-qPCR reveló que el virus se acumula en mayor concentración en las raíces y hojas de la planta. Por tanto, estos tejidos son los que se deben utilizar en el diagnóstico del virus. El STV también se detectó en semillas individuales, siendo su concentración mayor en el embrión que en la cubierta. La presencia del STV en el embrión dificulta la aplicación de tratamientos de desinfección de semillas.
4. A diferencia de lo que ocurre en los virus agudos, cuya concentración varía en función del momento de la infección, la concentración del STV permaneció constante a lo largo del tiempo.
5. La incidencia del STV en las plantas de tomate analizadas en campo fue alta, del 51% de las plantas analizadas. La distribución del STV fue desigual en las dos zonas analizadas, siendo del 39% en la Comunidad Valenciana y del 92% en las islas Canarias. Además, en el 64% de los campos muestreados de la Comunidad Valenciana estaba presente el virus mientras que todos los campos analizados en las Islas Canarias tenían el STV.

6. La elevada incidencia de STV en campo podría deberse a que muchos viveros están distribuyendo plantas infectadas con el virus (87% de los viveros analizados) que tiene tasas de transmisión de hasta el 80%.
7. Los análisis de plantas de campo diferenciando variedades comerciales (semillas distribuidas por empresas) de las variedades locales (generadas por los propios agricultores) mostraron una mayor incidencia del STV en las primeras (59%) que en las segundas (28%). El análisis de plántulas de vivero también mostró una mayor incidencia del virus en las variedades comerciales (90%) que en las locales (71%). En cuanto a las semillas, el 100% de las variedades comerciales estaban infectadas mientras que en las variedades locales sólo fue del 28%.
8. El análisis de la secuencia de la p42 (hipotética Cp) de STV reveló que el virus tenía una baja diversidad genética, similar a la de otros virus persistentes y algunos virus agudos. Se determinó que el virus está sometido a una fuerte presión de selección negativa o purificadora y que no hay una correlación entre distancia genética y origen geográfico. Esto podría ser debido a una rápida dispersión del STV a través del comercio de semillas infectadas y/o a la fuerte presión de selección negativa a la que está sometido.
9. La infección por el STV no tuvo efecto alguno ni en la producción de tomate ni en la inducción de síntomas. El virus tampoco influyó en la conductividad estomática, fotosíntesis y peso de las plantas, tanto en condiciones normales como con estrés salino.
10. Los estudios al microscopio óptico y TEM de plantas de tomate infectadas con el STV no revelaron alteraciones ni a nivel tisular ni celular.
11. La secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño de plantas de tomate infectadas con STV reveló la sobreexpresión de cuatro miRNAs (stu-miR398-3p, stu-miR398-5p, stu-miR3627-3p y stu-miR319-3p) y la infraexpresión del miRNA sly-miR169e-3p. Cuatro de estos miRNAs (stu-miR398-3p, stu-miR398-

5p, stu-miR3627-3 y stu-miR319-3p) corresponden a miRNAs descritos por primera vez (nuevos) en tomate.

12. Todos los miRNAs con expresión diferencial asociada a la infección por el STV tenían como dianas genes de la planta implicados en funciones esenciales relacionadas con el metabolismo, respuesta al estrés, desarrollo, homeostasis celular, transporte intracelular, formación de vesículas o estructuración del ribosoma.
13. La secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño también reveló muy bajas cantidades de vsRNAs del STV en las plantas de tomate infectadas solo con este virus. Esto podría ser debido a la imposibilidad de acceso al genoma viral de la maquinaria celular del PTGS o también a su inhibición por VSRs virales.
14. La expresión transitoria de la proteína p42 del STV junto con GFP en plantas de *N. benthamiana* 16C que contienen el transgén de GFP reveló que esta proteína viral no tenía actividad de VSR. Por otra parte, la observación al TEM no reveló la presencia ni de estructuras celulares relacionadas con la infección que pudieran proteger el genoma ni partículas virales en las que la Cp protegiera al genoma.
15. El ensayo de infección con el STV, el CMV y el PepMV en tomate reveló complejas interacciones entre los virus que se tradujeron en variaciones en la severidad de síntomas, niveles de acumulación viral y de poblaciones de miRNAs y vsRNAs.
16. Se observó una interacción sinérgica entre el STV y el CMV en plantas de tomate coinfectadas con ambos virus que provocaba un adelanto de los síntomas y un aumento de la severidad de los mismos, así como un incremento de la concentración del CMV en los primeros días de la infección. Por el contrario, la concentración del STV no sufrió variación. Sin embargo, este sinergismo no se reflejó ni en el peso ni en la altura de las plantas, que eran similares en las plantas coinfectadas y las infectadas sólo con el CMV.

17. También se observó un sinergismo entre el STV y el PepMV que provocaba un incremento en la intensidad de los síntomas inducidos por el PepMV en las plantas coinfectadas en los primeros días de infección. La presencia del STV no indujo cambios en la concentración del PepMV, ni viceversa.
18. La infección con el PepMV inducía un aumento en el crecimiento de la planta, tanto en altura como en peso. La presencia del STV en las plantas coinfectadas con ambos virus provocaba un aumento significativo de la altura respecto a la infección simple con el PepMV, mientras que con el peso ocurría lo contrario, debido a un aumento en el grosor del tallo. Las concentraciones de los virus no sufrían variaciones en las plantas coinfectadas respecto a las infecciones simples.
19. El CMV y el PepMV establecieron una interacción antagónica en las plantas coinfectadas, disminuyendo notablemente la concentración del CMV y manteniéndose la del PepMV. El patrón de evolución en la severidad de síntomas fue diferente en las plantas coinfectadas respecto a las infecciones simples con cada uno de los virus. Las plantas coinfectadas tenían una altura y peso intermedia, pero con diferencias significativas a los de las plantas infectadas con el PepMV (más altas y pesadas) y con el CMV (menos altas y pesadas).
20. El STV provocaba la ruptura del antagonismo entre el CMV y el PepMV en la infección múltiple con los tres virus, aumentando la concentración del CMV hasta alcanzar unos niveles similares a los de la infección simple con el virus. El efecto en los síntomas foliares se tradujo en un retraso en la aparición de éstos y una reducción en su intensidad, así como una reducción del peso y altura en las plantas infectadas con los tres virus respecto a las coinfectadas con el CMV y el PepMV.
21. Los análisis de RNAs de pequeño tamaño en las plantas de tomate infectadas con las diferentes combinaciones de virus reveló la expresión diferencial de 78 miRNAs, de los cuales 47 miRNAs eran nuevos en tomate, respecto a las plantas sin infectar. El número de miRNAs expresados diferencialmente y su nivel de acumulación variaba con la presencia del STV, CMV y PepMV en infecciones simples o múltiples.

22. Estudios con diferentes herramientas bioinformáticas relacionaron 53 de los 78 miRNAs expresados diferencialmente con genes involucrados en procesos fundamentales en la planta como desarrollo, metabolismo, estrés abiótico y biótico. Por tanto, variaciones en su acumulación motivadas por la presencia de STV, CMV y PepMV, en infecciones simples y múltiples, podrían implicar importantes cambios fisiológicos en las plantas.
23. También se identificaron vsiRNAs de STV, CMV y PepMV (de polaridad positiva y negativa) cuya proporción variaba dependiendo del virus y de la combinación de éstos. En el caso del STV, la cantidad de vsiRNAs generados en las infecciones simples fue muy pequeña, aunque ésta se incrementaba notablemente con la presencia de otros virus. También se podía observar como el STV variaba las proporciones de vsiRNAs del CMV y PepMV en coinfección con estos virus. La coinfección del CMV y PepMV también tuvo efecto en la formación de vsiRNAs de ambos virus, aunque en el caso del CMV su disminución podía correlacionarse con la disminución de su concentración.
24. El estudio de la frecuencia de vsiRNAs por nucleótido, tanto de las cadenas positivas como negativas de los genomas virales, mostró que la distribución de vsiRNAs no era uniforme en STV, CMV y PepMV, detectándose regiones de acumulación con picos que no solían coincidir en las cadenas positivas y negativas. Sin embargo, los patrones de distribución de vsiRNAs para cada virus no parecían estar influenciados por la presencia de otros virus en las infecciones múltiples.

Materiales y Métodos

Material vegetal

La desinfección de semillas de tomate se realizó mediante un tratamiento químico con lejía (NaClO) al 30%. El exceso de lejía en las semillas se eliminó con agua desionizada. A continuación, las semillas se colocaron en una placa Petri con algodón húmedo para su germinación. Las semillas de *N. benthamiana* se plantaron y germinaron en macetas de 11x11 con sustrato (turba y vermiculita humedecida 1:2). Las plántulas de tomate y *N. benthamiana* se pasaron a macetas individuales de 7x7 que contenían el mismo sustrato y se mantuvieron en una cámara de cultivo con humedad y temperatura de 25°C constante y un fotoperiodo de 14/10h.

Para la separación de la cubierta y embrión de las semillas de tomate, éstas se dejaron germinar a 28°C durante 7-8 días en una placa Petri con papel de filtro húmedo. Cuando germinaron, el embrión se separó de la cubierta con un escarpelo estéril y cada una de las partes se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml para la extracción de RNA total (Ali and Kobayashi 2010).

Las plantas de tomate infectadas con el STV se obtuvieron a partir de semillas de distintas variedades que contenían el virus. Para la puesta a punto de RT-LAMP y RT-qPCR y para el ensayo de producción de tomate se utilizaron plantas de tomate de la var. Mariana. Los análisis de incidencia en campo, viveros y semillas se realizaron con distintas variedades comerciales y locales que se especifican en las Tablas 1.1 y 1.2. Se secuenciaron algunos aislados de estos campos para hacer el análisis de diversidad genética del STV. Para estudiar el efecto del STV en condiciones de estrés salino se utilizaron plantas de tomate de la var. Guindo. Finalmente, para los análisis por microscopia y de secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño y para el estudio de interacción del STV con otros virus se utilizaron plantas de tomate de la var. Roque. Todas las plantas se mantuvieron en cámara con humedad y temperatura controlada (25°C) a excepción de las plantas del ensayo de producción las cuales se mantuvieron en abrigo de malla anti-trip, pulgón y mosca blanca, y las plantas del ensayo de coinfecciones las cuales se mantuvieron en invernadero con ventilación.

Los aislados de PepMV y de CMV se recolectaron de plantaciones de tomate de la provincia de Valencia en los años 2015 y 2016, respectivamente. Se comprobó que estas muestras no estuvieran infectadas con otros virus frecuentes en la zona como el

ToMV, el TSWV y el PMoV (el primero mediante RT-PCR y los otros mediante ELISA) (Wijkamp and Peters 1993; YaoLiang et al. 2003; Galipienso et al. 2005; Kumar and Prakash 2016; Bald-Blume et al. 2017). Estos aislados se mantuvieron en plantas de *N. benthamiana*. Los aislados de CMV y PepMV fueron amplificados por RT-PCR convencional y secuenciados. Se determinó que la secuencia de CMV de 325 nts (1343-1668) tenía una identidad del 100% con el aislado Japonés CM95 (AB188236.1) y que la secuencia de PepMV de 545 nts (5702-6248) tenía una identidad del 100% con el aislado Europeo EU_CAHN8 (JQ314457.1). Las secuencias de CMV y PepMV obtenidas se han depositado en la base de datos *GenBank* (MT785769 y MT785770). La infección con el CMV y el PepMV en el ensayo del estudio de la interacción del STV con otros virus agudos se realizó mediante inoculación mecánica de plantas de tomate empleando tejidos de *N. benthamiana* previamente infectadas con los virus. La fuente de inóculo se trituró en un mortero con tampón de inoculación (0.01 M de Na₂HPO₄ y 0.01 M de NaH₂PO₄ con pH 7.2) y el extracto se aplicó con suavidad con un bastoncillo de oídos sobre las hojas de la planta previamente espolvoreadas con celita (abrasivo). Las plantas control (*Mock*) se inocularon únicamente con tampón de inoculación.

Extracción y purificación de ácidos nucleicos

Los extractos de RNA total de la planta obtuvieron siguiendo el método del fenol/cloroformo (Ferriol et al. 2011) o mediante el kit *Spectrum™ Plant total RNA* (Sigma, Missouri, USA). Éste último que se utilizó para la secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño (Capítulo 2). En ambos métodos, se homogenizaron en un *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) unos 200 mg de tejido vegetal congelado con N₂ líquido. En la extracción por el método de fenol/cloroformo, a la muestra homogenizada se le añadió 500 µl de tampón TCES (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, pH 7.5), 500 µl de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) y 2.5 µl de β-mercaptoetanol y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo, a la que se le añadió 450 µl de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 10 min. A continuación, se recogió la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron en 10⁻¹ volumen de 3 M de AcNa pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. El precipitado se recogió mediante

centrifugación a 13000 rpm durante 30 min, se limpió con 400 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 20 µl de agua estéril libre de RNAsas.

La preparación de extractos brutos se llevó a cabo homogeneizando el material vegetal como se ha descrito anteriormente, añadiendo 500 µl de tampón TCES (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA pH 7.5) y agitando 2 min. En el caso de la extracción de semillas, en los análisis de RT-LAMP se homogeneizaron grupos de cinco semillas mientras que en análisis de RT-qPCR se homogeneizaron semillas individuales.

Los productos de PCR se purificaron mediante el kit *Qiagen minElute PCR purification* (Qiagen, Hilden, Alemania) y los plásmidos con el kit *QIAprep spin miniprep kit*, (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Elaboración de las construcciones para los ensayos de expresión transitoria

Para los ensayos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* 16C, se elaboró una construcción con la secuencia nucleotídica que codifica para la p42 del STV en un plásmido binario pCambia-2300 que contiene dos promotores 35S del virus del mosaico de la coliflor (Cauliflower mosaic virus, CaMV), el terminador de la nopalina sintasa (t-Nos) y resistencia a Kanamicina (Comellas Serra 2009). Como controles se usaron las construcciones pBin-p19, pBin-GFP y pCambia-Ø (plásmido sin inserto) (amablemente cedidas por el Dr. Guerri). pBin es un plásmido equivalente al p-Cambia, pero con resistencia a Kanamicina y Tetraciclina.

Se amplificó mediante RT-PCR la región genómica de la p42 con unos cebadores flanqueantes a los que se añadió la diana de restricción *BamHI*. Una vez realizada la amplificación, se realizó la digestión con *BamHI* (Fermentas, Waltham, USA) tanto del producto de PCR como del plásmido y se trató el plásmido digerido con fosfatasa alcalina (Thermo Fisher, Waltham, USA). La ligación se realizó con la Ligasa T4 (Promega, WI, USA) en una proporción 1:2 de producto de PCR y plásmido, 5 U de T4 Ligasa y 1x tampón de ligación, y se incubó a T° ambiente durante 1 h seguido de 4°C *overnight* (O/N). A continuación, se transformaron células competentes (*Stellar*) de *E. coli* con el producto de ligación por choque térmico (20 min en hielo, 2 min a 42°C y 10 min en

hielo) y se sembraron en placas con LB y Kanamicina (50 mg/μl). Las colonias se cultivaron en un medio con LB y Kanamicina a 37°C O/N con agitación (200 rpm) y las construcciones se purificaron y se usaron para células competentes Cor308 de *Agrobacterium* con resistencia a Tetraciclina mediante electroporación (2500V durante 5s). El producto de la transformación se sembró en placas con LB con 50 mg/μl Kanamicina y 10 mg/μl Tetraciclina a 28°C durante dos días. El mismo proceso y cultivo se utilizó para las construcciones con pBin. Las colonias que contenían las construcciones se seleccionaron mediante PCR utilizando los cebadores 35S y t-Nos (Anexo: Material suplementario 7). Los cultivos con las distintas construcciones se conservaron a -80% en glicerol 50% (glicerizados).

Agroinfiltración

Los glicerizados con colonias de células de *A. tumefaciens* transformadas con las distintas construcciones (pCambia-p42, pBin-p19, pBin-GFP y pCambia-Ø) se cultivaron a 28°C, O/N con agitación (200 rpm) en medio LB con 50 mg/μl Kanamicina y 10 mg/μl Tetraciclina para la construcción pCambia-p42, pCambia-Ø, pBin-p19 y pBin-GFP (Carpino et al. 2020). A continuación, los cultivos (100 μl) se pasaron a medio de inducción (25 ml) que contenía LB, antibióticos, 10 mM de MES y 20 μM de acetosiringona, y se incubaron a 28°C, O/N con agitación (170 rpm). Cuando se alcanzó una densidad óptica (DO) de entre 0.6 y 0.8 los cultivos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min y se resuspendieron en tampón de agroinfiltración (agua esterilizada, 10 mM de MES, 150 μM de acetosiringona y 10 mM de MgCl₂). La DO de los cultivos se igualó a 1 con medio de inducción y se dejó con agitación suave a T° ambiente durante 2 h. A continuación, se hizo una mezcla de las células con las construcciones (pCambia-p42, pBin-p19 y pCambia-Ø) junto con pBin-GFP (1:1) y se agroinfiltraron en las hojas de *N. benthamiana* 16C aplicando con presión a través de jeringuillas con cuidado de no dañar el tejido.

Purificación de viriones

Se homogeneizaron aproximadamente 10 g de tejido de tomate en un mortero con N₂ líquido y se añadieron 30 ml de tampón de purificación (0.25 M de fosfato potásico, 0.1% de 2-mercaptoetanol, pH 7.0). El homogenizado se filtró con muselina, se añadió Tritón X-100 a una concentración final de 1% y se agitó en frío durante 30 min. A continuación, se centrifugó 8000 rpm a 4°C durante 10 min. Al sobrenadante se le añadió el 8% polietilenglicol (PEG 6000) y 1% cloruro sódico (NaCl) y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm a 4°C durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se ultracentrifugó en un colchón de 5 ml de sacarosa (15%) a 200000 rpm durante 2-3 h y 4°C. Finalmente, el precipitado obtenido se resuspendió en 2 ml de tampón de purificación. Las muestras se tizaron con acetato de uranilo al 1% y se examinaron por TEM con un Philips CM10 a 60 KV.

Análisis de tejidos de tomate mediante microscopía óptica y TEM

Se cogieron pequeñas secciones de hoja de plantas de tomate (0.1 x 1 cm) que se fijaron con 2.5% de glutaraldehído en tampón fosfato (0.1 M y pH 7.2) durante 16-24 h. Luego las secciones se lavaron con tampón fosfato durante 1 h y se fijaron con 2% tetraóxido de osmio (pH 7.2) durante 2 h. Los tejidos fijados se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol (30-100%). Finalmente, las secciones se introdujeron en resina y se procesaron en cortes finos y ultrafinos para la visualización por microscopía óptica y TEM, respectivamente. Los cortes finos se tiñeron con azul de Richardson y se examinaron con un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tokio, Japón) mientras que las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato uranilo al 1% y se examinaron por TEM con microscopio Philips CM10 (Philips, Ámsterdam, Holanda) a 60 KV.

ELISA

Los aislados de campo CMV y PepMV fueron analizados por ELISA para otros virus importantes en el cultivo de tomate como el ToMV, el PMoV y el TSWV (Wijkamp and Peters 1993; YaoLiang et al. 2003; Galipienso et al. 2005; Kumar and Prakash 2016; Bald-Blume et al. 2017). Por tanto, se emplearon dos tipos de ELISA, el indirecto y el tipo “sándwich”, ambos en placa de 96 pocillos. El extracto vegetal se preparó con 1 g de hojas frescas de planta de tomate trituradas con tampón de extracción/conjugación (0.13 M de NaCl, 0.02 M de NaHPO₄ x 12 H₂O, 1 mM de KH₂PO₄, 2 mM de KCl, 0.05% de Tween 20, 8 M de Polyvivil Pirrolidona y 0.03 M de albumina de suero bovino en agua a pH 7.4). En el ELISA indirecto se añadió el extracto vegetal a cada pocillo (100 µl/pocillo), luego se añadió el anticuerpo primario para el ToMV o el PMoV (100 µl/pocillo) en tampón de recubrimiento (15 mM de Na₂CO₃ y 0.03 M de NaHCO₃ en agua a pH 9.6) y posteriormente se añadió el anticuerpo secundario anti-conejo en tampón de conjugación (100 µl/pocillo). En el ELISA tipo “sandwich” se añadió el anticuerpo primario específico del CMV, el PepMV o el TSWV en tampón de recubrimiento, posteriormente se añadió el extracto vegetal (100 µl/pocillo) en tampón extracción/conjugación y finalmente se añadió el anticuerpo secundario específico del CMV, el PepMV o el TSWV en tampón de conjugación. La reacción se reveló con NCBI/BCPI midiendo la absorbancia a 405 nm transcurridas 1-2 h. Después de cada etapa (aplicación extracto, anticuerpo primario, secundario) se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (0.13 M de NaCl, 0.02 M de NaHPO₄ x 12 H₂O, 1 mM de KH₂PO₄, 2 mM de KCl y 0.05% de Tween 20, pH 7.2).

Hibridación molecular

Para realizar una hibridación *dot blot* se añadió 1 µl de RNA total a una membrana de Nylon+ (Roche, Basilea, Suiza) la cual se fijó con UV (250 mJ). En el caso del STV (dsRNA) el RNA total se desnaturalizó a 95°C con 50% de formamida durante 10 min, para el resto de los virus (ssRNA) la desnaturalizaron fue a 65°C durante 5 min. Para la hibridación *Northern blot* se realizó una primera electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante y se separó el RNA por tamaño, luego se transfirió el RNA desde el gel

de agarosa a una membrana de Nylon+ (Roche, Basilea, Suiza) mediante capilaridad. Esta membrana se fijó al UV (250 mJ). Las membranas fijadas se prehibridaron en tampón de prehibridación ULTRA-hyb (Thermo Fisher, Waltham, USA) a 68°C durante 2-3 h, luego se añadió la sonda de RNA y se dejó hibridando toda la noche a la misma temperatura. A continuación, se realizaron dos lavados con tampón 2x SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato de sodio, pH 7.0) y 0.1% de SDS y otros dos lavados con tampón 0.1x SSC y 0.1% de SDS a 68°C durante 15 min cada uno. Después se realizaron dos lavados a T° ambiente durante 5 min con Maleato-Tween (100 mM de ácido maleico, 150 mM de NaCl y 0.3% (v/v) Tween 20, pH 7.5) y Maleato (100 mM de ácido maleico y 150 mM de NaCl, pH 7.5). Tras los lavados, la membrana se incubó con tampón de bloqueo (100 mM de ácido maleico y 150 mM de NaCl, pH 7.5 y 2% (w/v) de Blocking Reagent (Roche, Basilea, Suiza) durante 1 h y posteriormente se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina, que lleva conjugada la enzima fosfatasa alcalina, durante 30 min. Finalmente, se realizaron dos lavados de 15 min con Maleato-Tween y Maleato, respectivamente, y finalmente la membrana se equilibró con tampón 100 mM Tris-HCl pH 9.5 durante 2 min. Para la visualización de la hibridación a la membrana se le añadió substrato quimioluminiscente CDPstar (Roche, Basilea, Suiza) durante 5 min y se expuso a una película radiográfica durante 20-40 min, transcurridos los cuales se reveló.

Diseño de cebadores y sondas

El diseño de cebadores de STV (RT-PCR convencional, RT-qPCR y RT-LAMP) se realizó en regiones conservadas del genoma consenso obtenido tras el alineamiento de las secuencias mediante el programa Clustal W (Larkin et al. 2007) de varios aislados del STV obtenidas de la base de datos *GenBank* (KJ174690.1, KT634055, KT852573, EF442780 y EU413670). En el caso del CMV (RT-qPCR) se utilizó la secuencia obtenida mediante RT-PCR convencional de una zona de la Cp (RNA 3) cuya homología era del 100% con el aislado CM95 (AB188236.1). En el caso del PepMV (RT-qPCR), se utilizaron cebadores y sonda TaqMan diseñados por Ling et al. 2007. La detección de ToMV se realizó mediante RT-PCR convencional empleando los cebadores reportados por Aramburu y Galipienso, 2005. Las sondas TaqMan utilizadas para RT-qPCR tenían el fluoróforo 6FAM en el extremo 5' y el reportero TAMRA en el extremo 3'. En el caso de la RT-LAMP se diseñaron 3 parejas de cebadores con *LAMP Designer 1.12 Software*

(Premier Biosoft, Palo Alto, CA). El diseño de cebadores para RT-PCR convencional y de cebadores y sondas para RT-qPCR se realizó mediante el programa *Primer Express* (Thermo Fisher, Walthman, USA). Los cebadores para clonar la región del STV que codifica para p42 se diseñaron manualmente, así como los cebadores utilizados para en análisis de variabilidad del STV. Todos los cebadores usados se muestran en el Anexo: material suplementario 7.

Retrotranscripción (RT)

Para la amplificación del material genético a partir de RNA total, se realizó una RT previa a la amplificación empleando la *SuperScript IV* (Invitrogen, Thermo Fisher, Walthman, USA) siguiendo las condiciones del fabricante. Se utilizaron cebadores específicos (Anexo: material suplementario 7) y cebadores aleatorios (secuencias de seis nts aleatorias). El extracto de RNA se desnaturalizó con una mezcla de 0.8 μM de los cebadores y 125 μM de dNTPs a 95°C durante 5 min. La reacción se realizó en un volumen de 20 μl que contenía 100 U de Superscript IV, 40 U de Ribolock Rnase inhibitor (Thermo Fisher, Walthman, USA), 10 mM de DTT y 1x del tampón de la Superscript IV. Las condiciones de la RT fueron: una incubación de 55°C durante 20 min y desnaturalización a 80°C durante 10 min.

PCR convencional

La PCR convencional se llevó a cabo con la *Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher, Walthman, USA). La reacción se realizó en un volumen de 20 μl que contenía 0.2 μl del producto de RT y una mezcla 1.5 mM de MgCl_2 , 125 μM de dNTPs, 0.5 μM de cada cebador (directo y reverso) y 1.5 U de Taq Polimerasa y 1x de tampón de la enzima. Las condiciones variaban en los distintos experimentos y se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la PCR convencional para los distintos virus.

Virus	35 ciclos de amplificación				
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
STV	94°C 5 min	94°C 30s	60°C 30s	72°C 50s	72°C 5 min
CMV	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 20s	72°C 5 min
PepMV	94°C 5 min	94°C 30s	56°C 30s	72°C 35s	72°C 5 min
ToMV	94°C 5 min	94°C 30s	55°C 30s	72°C 40s	72°C 5 min

Para la amplificación de la región que codifica para la p42 del STV en el estudio de diversidad genética y evolución del STV se utilizó la enzima *High Fidelity DNA polymerase* (Bio-rad, Hercules, California) que tiene actividad correctora de errores. La reacción se realizó en un volumen de 20 μ l que contenía 2 μ l del producto de RT y una mezcla 1.5 mM de MgCl₂, 125 μ M de dNTPs, 0.5 μ M de cada cebador (directo y reverso), 1.5 U de High Fidelity DNA polymerase y 1x de tampón de la enzima. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 98°C durante 30s, seguido de 35 ciclos de desnaturalización 98°C durante 8s, alineamiento 65°C durante 15s y extensión a 72°C durante 1 min y 20s, con una extensión final de 72°C durante 5 min.

RT-LAMP

La RT-LAMP se realizó en un único paso. Se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min 1.5 μ l de extracto de RNA total o de extracto bruto de plantas de tomate infectadas con el STV. La reacción de amplificación se realizó con el *WarmStart® LAMP Kit* (BioLabs, Massachusetts, USA) siguiendo las condiciones que establece el fabricante y utilizando los cebadores especificados en Anexo: Material suplementario 7. La reacción se realizó en un volumen de 20 μ l que contenía 1x tampón, 1.4 mM de dNTPs, 5 U de WarmStar RT, 8 U de Bst DNA polimerasa y las 3 parejas de cebadores correspondientes (0.2 μ M de F3-CP/B3-CP, 1.6 μ M de FIP-CP/BIP-CP y 0.4 μ M de LoopF-CP/LoopB-CP). Las condiciones de RT-LAMP fueron: incubación a 68°C durante 1 h y desnaturalización a 80°C durante 10 min.

RT-qPCR

La RT-qPCR se realizó con el kit *One Step PrimeScript RT-PCR* (TaKaRa) empleando un LightCycler 480 (Roche, Basilea, Suiza). Se siguió el protocolo descrito por el fabricante con unos pequeños cambios para optimizar la amplificación de cada virus (STV, CMV y PepMV). Se realizó una desnaturalización inicial del RNA viral (50 ng) junto con los cebadores (directo y reverso) a 95°C durante 5 min. Seguidamente, se completó la mezcla de reacción con 2 U de Ex Taq HS y 2 U de PrimeScript RT Enzyme Mix II junto con la sonda TaqMan para un volumen final de 20 µl. Las condiciones de la reacción fueron: RT del RNA a 42°C durante 15 min, desnaturalización a 95°C durante 10 min y 40 ciclos de amplificación con 95°C durante 5s y alineamiento y extensión a 60°C durante 20s para todos los virus. La concentración de los cebadores y la sonda se optimizaron usando las siguientes combinaciones: 0.2 µM de sonda y cebadores, 0.4 µM de sonda y cebadores, 0.2 µM de sonda y 0.4 µM de cebadores y 0.4 µM de sonda y 0.2 µM de cebadores.

Elaboración de transcritos y curva patrón para la cuantificación absoluta de virus

Se realizaron a partir de productos de PCR de las regiones RdRp/p42 del STV, Cp del CMV o TGB2 del PepMV obtenidos utilizando cebadores reversos a los que se le había añadido la secuencia de la T7 polimerasa en el extremo 5' (Anexo: Material suplementario 7). La síntesis del transcrito *in vitro* se llevó a cabo empleando el kit *Megascript T7* (Ambion, Walthman, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía 3 µl de muestra, 1x del tampón de la enzima, 10 µM de dNTP y 2 U de Megascript T7 en un volumen final de reacción de 20 µl. La mezcla se incubó a 37°C durante 4 h. El transcrito se trató dos veces con RNasa-free DNasa (Ambion, Walthman, USA) para eliminar los posibles restos de cDNA y se purificó mediante el protocolo de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico anteriormente descrito. La concentración final se determinó mediante espectrofotometría con el Nanodrop 1000 (Thermo Fisher, Walthman, USA).

La conversión de μg de ssRNA a pmoles se determinó usando el peso molecular medio de los ribonucleótidos (340) y el número de pares de bases del transcrito (Nb) usando la siguiente fórmula: $\text{pmol de ssRNA} = \mu\text{g de ssRNA} \times (106 \text{ pg}/1 \mu\text{g}) \times (1 \text{ pmol}/340 \text{ pg}) \times (1/\text{Nb})$. Se usó el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas mol^{-1}) para estimar el número de copias de RNA. Para obtener una curva estándar de la RT-qPCR se realizaron diluciones seriadas del transcrito diluyéndolo en extracto de RNA de material no infectado.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos correspondientes a concentración viral, peso, altura, número frutos y el peso de los mismos, conductividad estomática, fotosíntesis neta y eficacia del PhII se analizaron estadísticamente mediante el modelo PROC MIXED en el programa informático SAS Inst. 2003. Las plantas fueron incluidas como efectos aleatorios, mientras que los datos de tiempo, tejido, frutos, peso o altura se incluyeron como efecto fijo. Se realizó un test de Levene para determinar si los datos mostraban una distribución normal y se utilizó el análisis LSD (Least Square Difference) de comparación de medias. En todos los análisis se consideró un nivel de confianza del 95%. Los datos de lecturas obtenidos en la secuenciación masiva de RNAs pequeños se sometieron a un análisis de componentes principales (*Principal component analysis*, PCA) eliminándose los datos de las replicas biológicas que más se alejaban del agrupamiento. La expresión diferencial de miRNAs fue considerada para un $\text{FDR} < 0.05$ y un $\log_2\text{FoldChange} > 0.56$.

Análisis de diversidad genética y de evolución

Para el estudio de la variabilidad del STV se utilizaron secuencias obtenidas por RT-PCR y de secuencias previamente depositadas en la base de datos *GenBank* (Anexo: Material suplementario 1). En este análisis se utilizó el programa informático Clustal W 2.0 para el alineamiento de secuencias y el programa MEGA-X para el estudio de distancias genéticas (Larkin et al. 2007; Tamura et al. 2013). Con el programa MEGA-X se realizó un análisis filogenético con el modelo de *Tamura-Nei* y el método máxima

verosimilitud (*Maximum likelihood*) con un bootstrap > 50, y también se estudió la selección natural a nivel molecular analizando las sustituciones sinónimas por los sitios sinónimos (dS) y las sustituciones no sinónimas por los sitios no sinónimos (dN) según el método de *Pamilo-Bianchi-Li* (Pamilo and Bianchi 1993). Se estudió la selección sobre las distintas regiones genómicas estimando la tasa dN y dS en cada codón mediante el método de probabilidad de efectos fijos implementado en el servidor Datamonkey (<https://www.datamonkey.org/>). Finalmente, se hizo un estudio de evolución usando los test de neutralidad de Tajima's D, Fu y Li's D* y F* y se estimó la posible recombinación entre aislados del STV mediante el programa GARD del paquete Datamonkey y RDR v.4.97 (Tajima 1989; Pond and Frost 2005; Pond et al. 2006). Los análisis de diversidad genética de los otros virus se realizaron con secuencias de la Cp de más de 6 aislados diferentes y se intentó seleccionar aleatoriamente secuencias de diferentes regiones o países (Anexo: Material suplementario 1).

Análisis de transpiración y fotosíntesis

En los análisis de transpiración y fotosíntesis se midieron tres parámetros: la conductividad estomática, la fotosíntesis neta y la eficacia del fotosistema II. Para analizar la fotosíntesis neta (An) y conductividad estomática (gs) se realizaron tres mediciones de las concentraciones de CO₂ y H₂O con el equipo *LCi Portable Photosynthesis System* (ADC BioScientific, Herts, UK). Las mediciones se realizaron sobre ambas superficies de la hoja (siempre la misma) entre las 11:00 y las 14:00 horas y a 25°C. Para analizar la eficacia del fotosistema II, se realizaron tres mediciones en oscuridad durante 30 min de la clorofilfluorescencia mediante el aparato MINIPAM (Walz, Effeltrich, Alemania).

Secuenciación de ácidos nucleicos

La secuenciación de productos de PCR mediante la técnica de Sanger se llevó a cabo en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universitat Politècnica de València (UPV). La secuenciación masiva de RNAs de pequeño tamaño se realizó a partir de extracto de RNA total en el

servicio de secuenciación del Centro de Supercomputación y Bioinnovación (scbi) de la Universidad de Málaga (UMA).

Para la secuenciación masiva de RNAs pequeños, se analizaron tres réplicas biológicas, cada una de las cuales consistía en una mezcla de extractos RNA total de tres muestras. La concentración y pureza de cada réplica se obtuvo con el *Qubit® RNA kit* en un fluorómetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) y el espectrofotómetro NanoPhotometer® (IMPLEN, California, USA). Las librerías obtenidas se dieron de alta en la base de datos *GenBank* bajo los Bioprojects: PRJNA625104 y PRJNA574043. La integridad del RNA se analizó con el *kit RNA Nano 6000 Assay* (Agilent Technologies, California, USA) en un equipo Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, California, USA). El cDNA se obtuvo a partir de 1 µg de RNA total utilizando el kit *NEBNext® Multiplex Small RNA library Prep Set de Illumina®* (Sigma Aldrich, Missouri, USA) y fue secuenciado con un Illumina NextSeq550 (Illumina, California, USA). Las lecturas se limpiaron quitando los adaptadores de secuenciación y se eliminaron las secuencias de baja calidad usando el programa informático SeqTrimNext. La longitud de lecturas se restringió entre 20 y 24 nts y se realizó la identificación y cuantificación de miRNAs con el programa informático Oasis 2.0 (https://tools4mirs.org/software/precursor_prediction/oasis/): las lecturas fueron alineadas con el programa STAR en la base de datos RNAbase 2.1 (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/>), los miRNA detectados se cuantificaron con el programa FeatureCounts (<https://www.biostars.org/p/259542/>).

La predicción y la cuantificación de nuevos miRNAs se realizó con el programa miRDeep2: (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DESeq2/inst/doc/DESeq2.html>). La expresión diferencial de miRNAs se analizó con el algoritmo DESeq2 para un Log2Fold-Change ($|\log_2\text{FoldChange}| > 0.56$) con un valor significativo de FDR < 0.05. Los genes dianas en tomate (transcriptoma de *S. lycopersicum* v 3.2) de los miRNAs con expresión diferencial se identificaron con psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) y las funciones de estos se determinaron con Gene Ontology (GO) y con Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) junto con UniProtKB. A partir de las lecturas totales también se determinaron los vsiRNAs y sus frecuencias por nucleótido, alineándolas con la cadena positiva y negativa de los genomas del STV, el CMV y el PepMV (KJ174690.1, AB188234 y KJ018164).

Separación electroforética de ácidos nucleicos

La separación y visualización de los productos de amplificación (RT-PCR y RT-LAMP) y del RNA ribosómico se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE (1 M de Tris-base, 0.05% de ácido acético glacial y 0.5 M de EDTA pH 8.0) a 50-100 V hasta alcanzar 2/3 del gel. A las muestras se les añadió tampón de carga (60% de glicerol, 3 mM de azul de bromofenol y 3 mM de xileno cianol en agua) antes de ponerlas en el gel. Los geles se tiñeron con GelRed (Sigma-Aldrich, Misuri, USA) en tampón TAE durante 15-30 min, se visualizaron con un transiluminador UV en un equipo LMW-20 (VWR, Pensilvania, USA).

Para el análisis de *Northern blot* del mRNA de GFP se realizó una electroforesis en gel de agarosa desnaturizante al 0.9% en tampón 1x MOPS (5 mM de AcNa, 1 mM de Na₂EDTA y 20 mM de MOPS, pH 7.0). Previo a la electroforesis, los extractos de RNA total se desnaturizaron a 95°C durante 20 min con FBL (0.06% de 1x MOPS, 0.24% de formaldehído y 0.69% de formamida). La electroforesis se realizó a 80 V durante 1 h 30 min y a continuación el RNA se transfirió a una membrana de Nylon+ por capilaridad. Los siRNAs de GFP se separaron mediante una electroforesis desnaturizante en gel de 15% poliacrilamida y 7 M de urea. Previamente, las muestras se desnaturizaron a 95°C durante 5 min con 50% de formamida. La electroforesis se realizó a 200 V durante aproximadamente 3 h en tampón 0.5x TBE (89 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico y 2 mM de EDTA) y los siRNAs se transfirieron a una membrana de Nylon+ mediante electrotransferencia (200 mA, 25 V durante 1 h).

Bibliografía

- Acosta-Leal R, Duffy S, Xiong Z, et al (2011) Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopathology* 101:1136–1148 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-11-0017>.
- Adams MJ, Antoniw JF (2004) Codon usage bias amongst plant viruses. *Archives of Virology* 149:113–135 <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0186-6>.
- Aguilar JM, Hernandez-Gallardo MD, Cenis JL, et al (2002) Complete sequence of the pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology* 147:2009–2015 <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0848-9>.
- Akdogan G, Tufekci ED, Uranbey S, et al (2016) miRNA-based drought regulation in wheat. *Functional and Integrative Genomics* 16:221–233 <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0452-1>.
- Alcaide C, Rabadán MP, Juárez M, et al (2020) Long-term cocirculation of two strains of pepino mosaic virus in tomato crops and its effect on population genetic variability. *Phytopathology* 110:49–57 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0247-FI>.
- Alcala-Briseno RI, Coskan S, Londono MA, et al (2017) Genome sequence of southern tomato virus in asymptomatic tomato “Sweet Hearts”. *Genome Announcement* 5 <https://doi.org/10.1128/genomeA.01374-16>.
- Alfaro-Fernández A, Sánchez-Navarro JA, Landeira M, et al (2016) Evaluation of PCR and non-radioactive molecular hybridization techniques for the routine diagnosis of tomato leaf curl New Delhi virus, tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl Sardinia virus. *Journal of Plant Pathology* 98:245–254 <https://www.jstor.org/stable/44280443>.
- Alfaro-Fernández A, Medina V, Córdoba-Sellés M, et al (2010) Ultrastructural aspects of tomato leaves infected by tomato torrado virus (ToTV) and co-infected by other viruses. *Plant Pathology* 59:231–239 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02215.x>.
- Alhassan A, Thekiso OMM, Yokoyama N, et al (2007) Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmosis. *Veterinary Parasitology* 143:155–160 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.014>.

- Ali A, Kobayashi M (2010) Seed transmission of cucumber mosaic virus in pepper. *Journal of Virological Methods* 163:234–237 <https://doi.org/10.1080/19315260.2018.1487498>.
- Aramburu J, Galipienso L, Aparicio F, et al (2010) Mode of transmission of parietaria mottle virus. *Journal of Plant Pathology* 679–684 <https://www.jstor.org/stable/41998857>.
- Aramburu J, Galipienso L, Soler S, et al (2015) A severe symptom phenotype in pepper cultivars carrying the *Tsw* resistance gene is caused by a mixed infection between resistance-breaking and non-resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Phytoparasitica* 43:597–605 <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0482-1>.
- Arancibia RA, Valverde RA, Can F (1995) Properties of a cryptic virus from pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Pathology* ISSN 0032-0862.
- Aung K, Xin X, Mecey C, et al (2017) Subcellular localization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato effector proteins in plants. *Type 3 Secretion Systems* 141–153 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6649-3_12.
- Bald-Blume N, Bergervoet JHW, Maiss E (2017) Development of a molecular assay for the detection of cucumber mosaic virus and the discrimination of its subgroups I and II. *Journal of Virological Methods* 243:35–43 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.01.011>.
- Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews* 35:235-241.
- Bao X, Roossinck MJ (2013) A life history view of mutualistic viral symbioses: quantity or quality for cooperation? *Current Opinion in Microbiology* 16:514–518 <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.05.007>.
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363 <https://doi.org/10.1038/nature02874>.
- Bhat AI, Siljo A, Deeshma KP (2013) Rapid detection of piper yellow mottle virus and cucumber mosaic virus infecting black pepper (*Piper nigrum*) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of Virological Methods* 193:190–196 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.06.012>.

- Blanc S (2007) Virus transmission-getting out and in. *Viral transport in plants* 1–28. https://doi.org/10.1007/7089_2006_099.
- Blevins T, Rajeswaran R, Aregger M, et al (2011) Massive production of small RNAs from a non-coding region of cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Research* 39:5003–5014 <https://doi.org/10.1093/nar/gkr119>.
- Blystad DR, Van Der Vlugt R, Alfaro-Fernández A, et al (2015) Host range and symptomatology of pepino mosaic virus strains occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 143:43–56 <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0664-1>.
- Boccardo G, Lisa V, Luisoni E, et al (1987) Cryptic plant viruses. *Advances in Virus Research* ISBN 0-12-039832-X.
- Boonham N, Smith P, Walsh K, et al (2002) The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 101:37–48 [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00418-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9).
- Bruisson S, Lebel S, Walter B, et al (2017) Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan® RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods* 240:73–77 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.003>.
- Budziszewska M, Wieczorek P, Obrepalska-Stęplowska A (2016) One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of tomato torrado virus. *Archives of Virology* 161:1359–1364 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.063>.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al (2005) Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology* 34:597–601 <https://doi.org/34/3/597>.
- Campos KKD, Araújo GR, Martins TL, et al (2017) The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. *Journal of Nutritional Biochemistry* 48:9-20 <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.06.004>.
- Candresse T, Marais A, Faure C (2015) First report of southern tomato virus on tomatoes in southwest France. *Genome* ISSN 0191-2917.

- Cantanhêde LM, Fernandes FG, Ferreira GEM, et al (2018) New insights into the genetic diversity of Leishmania RNA Virus 1 and its species-specific relationship with Leishmania parasites. *PLoS One* 13 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198727>.
- Carpino C, Elvira-González L, Rubio L, et al (2019) A comparative study of viral infectivity, accumulation and symptoms induced by broad bean wilt virus 1 isolates. *Journal of Plant Pathology* 101:275–281 <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00198-y>.
- Carpino C, Ferriol I, Elvira-González L, et al (2020) RNA2-encoded VP37 protein of broad bean wilt virus 1 is a determinant of pathogenicity, host susceptibility, and a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Molecular of Plant Pathology* 21: 1421-1435 <https://doi.org/10.1111/mpp.12979>.
- Chaerle L, Van Caeneghem W, Messens E, et al (1999) Presymptomatic visualization of plant–virus interactions by thermography. *Nature Biotechnology* 17:813 <https://doi.org/10.1038/11765>.
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, et al (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes and Development* 18:1179–1186 <https://doi.org/10.1101/gad.1201204>.
- Chávez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, et al (2016) Antagonism or synergism between papaya ringspot virus and papaya mosaic virus in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology* 489:179–191 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.026>.
- Chaves SS, Fernandes-Brum CN, Silva GFF, et al (2015) New insights on Coffea miRNAs: features and evolutionary conservation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177:879–908 <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1785-x>.
- Chen L, Meng J, He XL, et al (2019a) *Solanum lycopersicum* microRNA1916 targets multiple target genes and negatively regulates the immune response in tomato. *Plant Cell and Environment* 42:1393–1407 <https://doi.org/10.1111/pce.13468>.
- Chen L, Meng J, Luan Y (2019b) miR1916 plays a role as a negative regulator in drought stress resistance in tomato and tobacco. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508:597–602 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.165>.

- Chi M, Liu C, Su Y, et al (2015) Bioinformatic prediction of upstream microRNAs of PPO and novel microRNAs in potato. *Canadian Journal of plant Science* 95:871–877 <https://doi.org/10.4141/cjps-2014-308>.
- Chia TF, Chan YS, Chua NH (1992) Detection and localization of viruses in orchids by tissue-print hybridization. *Plant Pathology* 41:355–361 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.026>.
- Chotiwan N, Brewster CD, Magalhaes T, et al (2017) Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. *Science Translational Medicine* 9:388 <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0538>.
- Comellas M (2009) Estudio de la interacción entre naranjo amargo y el virus de la tristeza de los cítricos. *Tesis doctoral (Universitat Politècnica de València)*.
- Córdoba-Sellés MC, García-Rández A, Alfaro-Fernández A, et al (2007) Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *The American Phytopathological Society* 91:1250–1254 <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1250>.
- Crespo O, Robles C, Ruiz L, et al (2020) Antagonism of cucumber green mottle mosaic virus against tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini and cucumber. *Annals of Applied Biology* 176:147–157 <https://doi.org/10.1111/aab.12535>.
- Cruz SS, Roberts AG, Prior DA, et al (1998) Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. *Plant Cell* 10:495–510 <https://doi.org/10.1105/tpc.10.4.495>.
- Csorba T, Bovi A, Dalmay T, et al (2007) The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of Virology* 81:11768–11780 <https://doi.org/JVI.01230-07>.
- Csorba T, Pantaleo V, Burgyán J (2009) RNA silencing: an antiviral mechanism. *Advances in Virus Research* 75:35–71 [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)07502-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)07502-2).

- Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM (2008) Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 151:264–270 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.04.011>.
- DaPalma T, Doonan BP, Trager NM, et al (2010) A systematic approach to virus–virus interactions. *Virus Research* 149:1–9 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.002>.
- Davino S, Bivona L, Iacono G, et al (2010) First report of tomato torrado virus infecting tomato in Italy. *Plant Disease* 94: 1172-1172 <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-9-1172A>.
- Davino S, Panno S, Rangel EA, et al (2012) Population genetics of cucumber mosaic virus infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology* 157:739–745 <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1216-4>.
- De Fitopatología SE (2016) Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides. *Bubok* ISBN 978-84-686-8985-2.
- De la Torre-Almaráz R, Pallás V, Sánchez-Navarro JA (2016) First report of cucumber mosaic virus (CMV) and CARNA-5 in Carnation in Mexico. *Plant Disease* 100:1509-1509 <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0110-PDN>.
- Debreczeni DE, Ruiz-Ruiz S, Aramburu J, et al (2011) Detection, discrimination and absolute quantitation of tomato spotted wilt virus isolates using real time RT-PCR with TaqMan® MGB probes. *Journal of Virological Methods* 176:32–37 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.027>.
- Deng F, Zhang X, Wang W, et al (2018) Identification of *Gossypium hirsutum* long non-coding RNAs (lncRNAs) under salt stress. *BMC Plant Biology* 18:23 <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1238-0>.
- Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, et al (2014) Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biological Science* 17:151–166 <https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.151.166>.

- Ding Y, Ma Y, Liu N, et al (2017) microRNAs involved in auxin signalling modulate male sterility under high-temperature stress in cotton (*Gossypium hirsutum*). *The Plant Journal* 91:977–994 <https://doi.org/10.1111/tpj.13620>.
- Dubey S, Saxena S, Chauhan AS, et al (2020) Identification and expression analysis of conserved microRNAs during short and prolonged chromium stress in rice (*Oryza sativa*). *Environmental Science and Pollution Research* 27:380–390 <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06760-0>.
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42:185 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>.
- Elena SF, Bedhomme S, Carrasco P, et al (2011) The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24:287–293 <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-10-0214>.
- Elvira-González L, Carpino C, Alfaro-Fernández A, et al (2018) A sensitive real-time RT-PCR reveals a high incidence of southern tomato virus (STV) in Spanish tomato crops. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16:1008 <https://doi.org/10.5424/sjar/2018163-12961>.
- Elvira-González L, Medina V, Rubio L, et al (2020) The persistent southern tomato virus modifies miRNA expression without inducing symptoms and cell ultra-structural changes. *European Journal of Plant Pathology* 156:615–622 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01911-y>.
- Elvira-González L, Puchades A V, Carpino C, et al (2017) Fast detection of southern tomato virus by one-step transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods* 241:11–14 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.004>.
- Erlendsdóttir E, Martinell E, Söhrman I (2017) De América a Europa. *Signo y Señal* ISSN 2314-2189.
- Farinati S, Forestan C, Canton M, et al (2020) microRNA regulation of fruit development. *Springer* ISBN 978-3-030-35772-6.

- Feng J, Liu S, Wang M, et al (2014) Identification of microRNAs and their targets in tomato infected with cucumber mosaic virus based on deep sequencing. *Planta* 240:1335–1352 <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2158-3>.
- Ferriol I, Ruiz-Ruiz S, Rubio L (2011) Detection and absolute quantitation of broad bean wilt virus 1 (BBWV-1) and BBWV-2 by real time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 177:202–205 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.08.003>.
- Filiz E, Cetin D, Akbudak MA (2019) Aromatic amino acids biosynthesis genes identification and expression analysis under salt and drought stresses in *Solanum lycopersicum* L. *Scientia Horticulturae* 250:127–137 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.044>.
- Fukuhara T (2019) Endornaviruses: persistent dsRNA viruses with symbiotic properties in diverse eukaryotes. *Virus Genes* 55:165–173 <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01635-5>.
- Fukuhara T, Tabara M, Koiwa H, et al (2019) Effect of asymptomatic infection with southern tomato virus on tomato plants. *Archives of Virology* 165:11–20 <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04436-1>.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, et al (2003a) Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. *Archives of Virology* 148:1713–1720 <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0134-5>.
- Fukuta S, Kato S, Yoshida K, et al (2003b) Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *Journal of Virological Methods* 112:35–40 [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00187-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00187-3).
- Fukuta S, Ohishi K, Yoshida K, et al (2004) Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum. *Journal of Virological Methods* 121:49–55 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.05.016>.
- Galipienso L, Herranz MC, Pallás V, et al (2005) Detection of a tomato strain of parietaria mottle virus (PMoV-T) by molecular hybridization and RT-PCR in field samples from north-eastern Spain. *Plant Pathology* 54:29–35 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01109.x>.

- Gandía M, Bernad L, Rubio L, et al (2007) Host effect on the molecular and biological properties of a citrus exocortis viroid isolate from *Vicia faba*. *Phytopathology* 97:1004–1010 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-8-1004>.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology* 39:157–186 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.157>.
- Gil-Salas FM, Colyer A, Boonham N, et al (2009) Resistance screening against cucumber vein yellowing virus using a real-time (Taqman®) RT-PCR assay in cucumber (*Cucumis sativus*). *Crop Protection* 28:109–112 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.09.005>.
- Gómez-Aix C, García-García M, Aranda MA, et al (2015) Melon necrotic spot virus replication occurs in association with altered mitochondria. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 28:387–397 <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0274-R>.
- Gómez P, Sempere RN, Amari K, et al (2010) Epidemics of tomato torrado virus, pepino mosaic virus and tomato chlorosis virus in tomato crops: do mixed infections contribute to torrado disease epidemiology? *Annals of Applied Biology* 156:401–410 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00397.x>.
- Gomez P, Sempere RN, Elena SF, et al (2009) Mixed infections of pepino mosaic virus strains modulate the evolutionary dynamics of this emergent virus. *Journal of Virology* 83:12378–12387 <https://doi.org/10.1128/JVI.01486-09>.
- Goswami K, Tripathi A, Sanan-Mishra N (2017) Comparative miRomics of salt-tolerant and salt-sensitive rice. *Journal of Integrative Bioinformatics* 14:1 <https://doi.org/10.1515/jib-2017-0002>.
- Goto K, Kobori T, Kosaka Y, et al (2007) Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant and cell Physiology* 48:1050–1060 <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm074>.
- Grenfell BT, Pybus OG, Gog JR, et al (2004) Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens. *Science* 303:327–332 <https://doi.org/10.1126/science.1090727>.

- Guo W, Wu G, Yan F, et al (2012) Identification of novel *Oryza sativa* miRNAs in deep sequencing-based small RNA libraries of rice infected with rice stripe virus. *PLoS One* 7 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046443>.
- Gutiérrez-Aguirre I, Mehle N, Delić D, et al (2009) Real-time quantitative PCR based sensitive detection and genotype discrimination of pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 162:46–55 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.07.008>.
- Guy PL, Gerard PJ (2016) White clover cryptic virus-1 in New Zealand and eastern Australia. *Annals of Applied Biology* 168:225–231 <https://doi.org/10.1111/aab.12258>.
- Hadas R, Pearlsman M, Gefen T, et al (2004) Indexing system for tomato mosaic virus (ToMV) in commercial tomato seed lots. *Phytoparasitica* 32:421–424 <https://doi.org/10.1007/BF02979856>.
- Hanssen IM, Gutiérrez-Aguirre I, Paeleman A, et al (2010a) Cross-protection or enhanced symptom display in greenhouse tomato co-infected with different pepino mosaic virus isolates. *Plant Pathology* 59:13–21 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02190.x>.
- Hanssen IM, Lapidot M, Thomma BP (2010b) Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 23:539–548 <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0539>.
- Hanssen IM, Mumford R, Blystad D-R, et al (2010c) Seed transmission of pepino mosaic virus in tomato. *European Journal of Plant Pathology* 126:145 <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9528-x>.
- Hayashida K, Kajino K, Hachaambwa L, et al (2015) Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003578>.
- He D, Wang Q, Wang K, et al (2015) Genome-wide dissection of the microRNA expression profile in rice embryo during early stages of seed germination. *PLoS One* 10 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145424>.
- Herrera-Vásquez JA, Puchades A V, Elvira-González L, et al (2017) Fast detection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the three begomovirus species

infecting tomato in Panama. *European Journal of Plant Pathology* 151:243–250
<https://doi.org/10.1007/s10658-017-1358-7>.

Hongyun C, Wenjun Z, Qinsheng G, et al (2008) Real time TaqMan RT-PCR assay for the detection of cucumber green mottle mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 149:326–329 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.02.006>.

Huang J, Yang M, Lu L, et al (2016) Diverse functions of small RNAs in different plant–pathogen communications. *Frontiers in Microbiology* 7:1552 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01552>.

Huguenot C, van den Dobbelsteen G, de Haan P, et al (1990) Detection of tomato spotted wilt virus using monoclonal antibodies and riboprobes. *Archives of Virology* 110:47–62 <https://doi.org/10.1007/BF01310702>.

Hull R (2001) Plant virology. *Gulf Professional Publishing* ISBN 0-12-361160-1.

Iacono G, Hernandez-Llopis D, Alfaro-Fernandez A, et al (2015) First report of southern tomato virus in tomato crops in Italy. *New Disease Reports* 32:27 <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.027>.

Ibáñez-Escribano A, Gómez-Barrio A (2017) *Trichomonas vaginalis*: la versatilidad de un parásito tenaz. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* ISSN 1697-4298.

Inoue-Nagata AK, Kormelink R, Nagata T, et al (1997) Effects of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. *Phytopathology* 87:1168–1173 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.11.1168>.

Jacquemond M (2012) Cucumber mosaic virus. *Advances in Virus Research* 84:439–504 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00013-0>.

Jin X, Jiang Z, Zhang K, et al (2018) Three-dimensional analysis of chloroplast structures associated with virus infection. *Plant Physiology* 176:282–294 <https://doi.org/10.1104/pp.17.00871>.

Jossey S, Hobbs HA, Domier LL (2013) Role of soybean mosaic virus-encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean. *Phytopathology* 103:941–948 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-12-0248-R>.

- Juarez M, Legua P, Mengual CM, et al (2013) Relative incidence, spatial distribution and genetic diversity of cucurbit viruses in eastern Spain. *Annals of Applied Biology* 162:362–370 <https://doi.org/10.1111/aab.12029>.
- Kantar M, Lucas SJ, Budak H (2011) miRNA expression patterns of *Triticum dicoccoides* in response to shock drought stress. *Planta* 233:471–484 <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1309-4>.
- Kataria S, Verma SK (2018) Salinity stress responses and adaptive mechanisms in major glycophytic crops: The story so far. In: Salinity responses and tolerance in plants, volume 1: targeting sensory, transport and signaling mechanisms. *Springer International Publishing* 1:1–39 https://doi.org/10.1007/978-3-319-75671-4_1.
- Kaye AC, Moyer JW, Parks EJ, et al (2011) Population genetic analysis of tomato spotted wilt virus on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101:147–153 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-10-0035>.
- Komatsu K (2013) Studies on molecular mechanisms underlying virus-induced systemic necrosis associated with host defense responses. *Journal of General Plant Pathology* 79:455–457 <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0486-y>.
- Kombrink E, Somssich IE (1995) Defense responses of plants to pathogens. *Advances in botanical research* 21:1–34 [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)60007-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)60007-5).
- Kondhare KR, Malankar NN, Devani RS, et al (2018) Genome-wide transcriptome analysis reveals small RNA profiles involved in early stages of stolon-to-tuber transitions in potato under photoperiodic conditions. *BMC Plant Biology* 18:1–19 <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1501-4>.
- Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV (2015) Plant viruses of the *Amalgaviridae* family evolved via recombination between viruses with double-stranded and negative-strand RNA genomes. *Biology Direct* 10:12–18 <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0047-8>.
- Kumar S, Prakash HS (2016) Detection of tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in pepper seeds by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Archives of Phytopathological and Plant Protection* 49:59–63 <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.658991>.

- Kurihara Y, Inaba N, Kutsuna N, et al (2007) Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *Journal of General Virology* 88:2347–2352 <https://doi.org/10.1099/vir.0.82994-0>.
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, et al (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO Journal* 25:2768–2780 <https://doi.org/7601164>.
- Landeo-Ríos Y, Navas-Castillo J, Moriones E, et al (2017) Supresion viral del silenciamiento por RNA en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana* ISSN 0187-7380.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Li F, Pignatta D, Bendix C, et al (2012) MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:1790–1795 <https://doi.org/10.1073/pnas.1118282109>.
- Li J, Wu L, Zheng W, et al (2015) Genome-wide identification of Micro RNAs responsive to high temperature in rice (*Oryza sativa*) by high-throughput deep sequencing. *Journal of Agronomy and Crop Science* 201:379–388 <https://doi.org/10.1111/jac.12114>.
- Li W, Lewandowski DJ, Hilf ME, et al (2009) Identification of domains of the tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390:110–121 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.04.027>.
- Li Y, Cui H, Cui X, et al (2016) The altered photosynthetic machinery during compatible virus infection. *Current Opinion in Virology* 17:19–24 <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.11.002>.
- Ling KS (2007) Molecular characterization of two pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes* 34:1–8 <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0003-x>.
- Ling KS (2008) Pepino mosaic virus on tomato seed: virus location and mechanical transmission. *Plant Disease* 92:1701–1705 <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-12-1701>.

- Ling KS, Wechter WP, Jordan R (2007) Development of a one-step immunocapture real-time TaqMan RT-PCR assay for the broad spectrum detection of pepino mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 144:65–72 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.03.022>.
- Liu C, Ye L, Lang G, et al (2011) The VP37 protein of broad bean wilt virus 2 induces tubule-like structures in both plant and insect cells. *Virus Research* 155:42–47 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.013>.
- Liu L, Chen X (2016) RNA quality control as a key to suppressing RNA silencing of endogenous genes in plants. *Molecular Plant* 9:826–836 <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.03.011>.
- Liu M, Yu H, Zhao G, et al (2018) Identification of drought-responsive microRNAs in tomato using high-throughput sequencing. *Functional and Integrative Genomics* 18:67–78 <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0575-7>.
- Liu SR, Zhou JJ, Hu CG, et al (2017) MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in Microbiology* 8:1801 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801>.
- Loebenstein G (2005) Natural resistance mechanisms of plants to viruses. *Acta Phytopathol Entomol Hungarica* ISBN 10-1-4020-3779-1.
- Logan J, Edwards KJ, Saunders NA (2009) Real-time PCR: current technology and applications. *Horizon Scientific Press* ISBN 9781904455394.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30:1292 <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>.
- MacKenzie TDB, Nie X, Singh M (2015) RT-PCR and real-time RT-PCR methods for the detection of potato virus Y in potato leaves and tubers. *Plant Virology Protocols New Approaches to Detect Viruses Host Responses* 1236:13–26 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_2.
- Maeda S, Sakazono S, Masuko-Suzuki H, et al (2016) Comparative analysis of microRNA profiles of rice anthers between cool-sensitive and cool-tolerant cultivars under cool-temperature stress. *Genes and Genetic Systems* 90:231-235 <https://doi.org/10.1266/ggs.15-00056>.

- Maroon-Lango CJ, Guaragna MA, Jordan RL, et al (2005) Two unique US isolates of pepino mosaic virus from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate. *Archives of Virology* 150:1187–1201 <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0495-z>.
- Marquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, et al (2007) A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315:513–515 <https://doi.org/315/5811/513>.
- Martin RR, Polashock JJ, Tzanetakis IE (2012) New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses* 4:2831–2852 <https://doi.org/10.3390/v4112831>.
- Martin RR, Zhou J, Tzanetakis IE (2011) Blueberry latent virus: an amalgam of the *Partitiviridae* and *Totiviridae*. *Virus Research* 155:175–180 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.09.020>.
- Martínez-Turiño S, Hernandez C (2009) Inhibition of RNA silencing by the coat protein of Pelargonium flower break virus: distinctions from closely related suppressors. *Journal of General Virology* 90:519–525 <https://doi.org/10.1099/vir.0.006098-0>.
- Mascia T, Gallitelli D (2016) Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Science* 252:176–192 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.015>.
- McClure BA, Guilfoyle TJ (1989) Tissue print hybridization. A simple technique for detecting organ-and tissue-specific gene expression. *Plant Molecular Biology* 12:517–524 <https://doi.org/10.1007/BF00036966>.
- Medina V, Rodrigo G, Tian T, et al (2003) Comparative cytopathology of Crinivirus infections in different plant hosts. *Annals of Applied Biology* 143:99–110 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00274.x>.
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, et al (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80:5747–5756 <https://doi.org/80/12/5747>.
- Mohorianu I, Schwach F, Jing R, et al (2011) Profiling of short RNAs during fleshy fruit development reveals stage-specific sRNAome expression patterns. *The Plant Journal* 67:232–246 <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04586.x>.

- Moissiard G, Voinnet O (2004) Viral suppression of RNA silencing in plants. *Molecular Plant Pathology* 5:71–82 <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00207.x>.
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, et al (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328:872–875 <https://doi.org/10.1126/science.1187959>.
- Montasser MS, Tousignant ME, Kaper JM (1998) Viral satellite RNAs for the prevention of cucumber mosaic virus (CMV) disease in field-grown pepper and melon plants. *Plant Disease* 82:1298–1303 <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1298>.
- Moreno-Delafuente A, Garzo E, Moreno A, et al (2013) A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS One* 8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061543>.
- Mori Y, Kanda H, Notomi T (2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19:404–411 <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0590-0>.
- Mori Y, Notomi T (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 15:62–69 <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>.
- 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 <https://doi.org/10.1099/vir.0.18922-0>.
- Moxon S, Jing R, Szittyá G, et al (2008) Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Research* 18:1602–1609 <https://doi.org/10.1101/gr.080127.108>.
- Moya A, Holmes EC, González-Candelas F (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Natural Review of Microbiology* 2:279–288 <https://doi.org/10.1038/nrmicro863>.
- Müller L, Caris-Veyrat C, Lowe G, et al (2016) Lycopene and its antioxidant role in the prevention of cardiovascular diseases—a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56:1868–1879 <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.801827>.

- Mumford RA, Metcalfe EJ (2001) The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru. *Archives of Virology* 146:2455–2460 <https://doi.org/10.1007/s007050170015>.
- Nakatsukasa-Akune M, Yamashita K, Shimoda Y, et al (2005) Suppression of root nodule formation by artificial expression of the TrEnodDR1 (coat protein of white clover cryptic virus 1) gene in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18:1069–1080 <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1069>.
- Naqvi AR, Haq QMR, Mukherjee SK (2010) MicroRNA profiling of tomato leaf curl new delhi virus (TOLCNDV) infected tomato leaves indicates that deregulation of mir159/319 and mir172 might be linked with leaf curl disease. *Virology Journal* 7:281 <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-281>.
- Natsuaki T, Yamashita S, Doi Y, et al (1983) Two seed-borne double-stranded RNA viruses, beet temperate virus and spinach temperate virus. *Japanese Journal of Phytopathology* 49:709–712 <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.49.709>.
- Nibert ML, Ghabrial SA, Maiss E, et al (2014) Taxonomic reorganization of family *Partitiviridae* and other recent progress in partitivirus research. *Virus Research* 188:128–141 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.007>.
- Nibert ML, Pyle JD, Firth AE (2016) A 1 ribosomal frameshifting motif prevalent among plant amalgaviruses. *Virology* 498:201–208 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.07.002>.
- Nie X (2005) Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. *Plant Disease* 89:605–610 <https://doi.org/10.1094/PD-89-0605>.
- Nikolaeva OV (2017) Nucleic acid hybridization methods in diagnosis of plant viruses and viroids. *Molecular Methods of Plant Pathology* ISBN 0-87371-877-1.
- Ning LH, Du W kai, Song HN, et al (2019) Identification of responsive miRNAs involved in combination stresses of phosphate starvation and salt stress in soybean root. *Environmental and Experimental Botany* 167:103823 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103823>.

- Niu D, Wang Z, Wang S, et al (2015) Profiling of small RNAs involved in plant–pathogen interactions. *Springer* 1287:61–79 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_4.
- Niu X, Sun Y, Chen Z, et al (2017) Using small RNA-seq data to detect siRNA duplexes induced by plant viruses. *Genes* 8:163 <https://doi.org/10.3390/genes8060163>.
- Nurul AB, Engku EAR, Ismail N, et al (2016) Development of multiplex loop mediated isothermal amplification (m-LAMP) label-based gold nanoparticles lateral flow dipstick biosensor for detection of pathogenic *Leptospira*. *Analytica Chimica Acta* 903:142–148 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.11.015>.
- Ogwok E, Alicai T, Rey MEC, et al (2015) Distribution and accumulation of cassava brown streak viruses within infected cassava (*Manihot esculenta*) plants. *Plant Pathology* 64:1235–1246 <https://doi.org/10.1111/ppa.12343>.
- Pacheco R, García-Marcos A, Barajas D, et al (2012a) PVX–potyvirus synergistic infections differentially alter microRNA accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research* 165:231–235 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.02.012>.
- Padmanabhan C, Zheng Y, Li R, et al (2015a) Complete genome sequence of southern tomato virus identified in China using next-generation sequencing. *Genome Announcement* 3:10 <https://doi.org/10.1128/genomeA.01226-15>.
- Padmanabhan C, Zheng Y, Li R, et al (2015b) Complete genome sequence of southern tomato virus naturally infecting tomatoes in Bangladesh. *Genome Announcement* 3:10 <https://doi.org/10.1128/genomeA.01522-15>.
- Pallas V, García JA (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology* 92:2691–2705 <https://doi.org/10.1099/vir.0.034603-0>.
- Pallás V, Sánchez-Navarro JA, James D (2018) Recent advances on the multiplex molecular detection of plant viruses and viroids. *Frontiers in Microbiology* 9:2087 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02087>.
- Pamilo P, Bianchi NO (1993) Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolution* 10:271–281 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040003>.

- Pan C, Ye L, Zheng Y, et al (2017) Identification and expression profiling of microRNAs involved in the stigma exertion under high-temperature stress in tomato. *BMC Genomics* 18:843 <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4238-9>.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, et al (2008) Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 18:407–421 <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
- Pentimone I, Lebrón R, Hackenberg M, et al (2018) Identification of tomato miRNAs responsive to root colonization by endophytic *Pochonia chlamydosporia*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:907–919 <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8608-7>.
- Perry KL, Zhang L, Palukaitis P (1998) Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *Virology* 242:204–210 <https://doi.org/10.1006/viro.1998.8991>.
- Pond SLK, Frost SDW (2005) Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21:2531–2533 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti320>.
- Pond SLK, Posada D, Gravenor MB, et al (2006) GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22:3096–3098 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl474>.
- Poon LL, Leung CS, Chan KH, et al (2005) Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 43:427–430 <https://doi.org/43/1/427>.
- Powell CA, Pelosi RR, Rundell PA, et al (2003) Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of citrus tristeza virus following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease* 87:1116–1118 <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.9.1116>.
- Pradhan B, Naqvi AR, Saraf S, et al (2015) Prediction and characterization of tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) responsive novel microRNAs in *Solanum*

lycopersicum. *Virus Research* 195:183–195 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.001>.

Prigigallo MI, Križnik M, De Paola D, et al (2019) Potato virus Y infection alters small RNA metabolism and immune response in tomato. *Viruses* 11:1100 <https://doi.org/10.3390/v11121100>.

Prins M, Goldbach R (1998) The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends in Microbiology* 6:31–35 [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01173-6](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01173-6).

Puchades A V, Carpino C, Alfaro-Fernandez A, et al (2017) Detection of southern tomato virus by molecular hybridisation. *Annals of Applied Biology* 171:172–178 <https://doi.org/10.1111/aab.12367>.

Qiao Y, Zhang J, Zhang J, et al (2017) Integrated RNA-seq and sRNA-seq analysis reveals miRNA effects on secondary metabolism in *Solanum tuberosum* L. *Molecular Genetics and Genomics* 292:37–52 <https://doi.org/10.1007/s00438-016-1253-5>.

Qu F, Morris TJ (2005) Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters* 579:5958–5964 <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.041>.

Rangel EA, Alfaro-Fernández A, Font-San-Ambrosio MI, et al (2011) Genetic variability and evolutionary analyses of the coat protein gene of tomato mosaic virus. *Virus Genes* 43:435 <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0651-3>.

Rast ATB (1975) Variability of tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistance breeding and cross protection. *Pudoc* ISBN 9789022005590 - 76.

Ratcliff FG, MacFarlane SA, Baulcombe DC (1999) Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207–1216 <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1207>.

Rey-Burusco MF, Daleo GR, Feldman ML (2019) Identification of potassium phosphite responsive miRNAs and their targets in potato. *PLoS One* 14 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222346>.

- Roossinck MJ (2010) Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Science* 365:1899–1905 <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0057>.
- Roossinck MJ (2015a) Plants, viruses and the environment: ecology and mutualism. *Virology* 479:271–277 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.041>.
- Roossinck MJ (2011) The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Review Microbiology* 9:99 <https://doi.org/10.1038/nrmicro2491>.
- Roossinck MJ (2015b) A new look at plant viruses and their potential beneficial roles in crops. *Molecular Plant Pathology* 16:331–333 <https://doi.org/10.1111/mpp.12241>.
- Roossinck MJ, Sabanadzovic S, Okada R, Valverde RA (2011) The remarkable evolutionary history of endornaviruses. *Journal of General Virology* 92:2674–2678 <https://doi.org/10.1099/vir.0.034702-0>.
- Rowles JL, Ranard KM, Smith JW, et al (2017) Increased dietary and circulating lycopene are associated with reduced prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer and Prostatic Disease* 20:361–377 <https://doi.org/10.1038/pcan.2017.25>.
- Roy A, Manjunath KL, Brlansky RH (2005) Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of citrus tristeza virus from India. *Virus Research* 113:132–142 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.023>.
- Rubio L, Galipienso L, Ferriol I (2020) Detection of plant viruses and disease management: relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in Plant Science* 11:1092 <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>.
- Rubio L, Guerri J, Moreno P (2013) Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Frontiers in Microbiology* 4:151 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00151>.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, et al (2007) A real-time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of citrus tristeza virus in different plant tissues. *Journal of Virological Methods* 145:96–105 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.05.011>.

- Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic NA, Valverde RA (2010) A novel monopartite dsRNA virus from rhododendron. *Archive of Virology* 155:1859–1863 <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0770-5>.
- Sabanadzovic S, Valverde RA (2011) Properties and detection of two cryptoviruses from pepper (*Capsicum annuum*). *Virus Genes* 43:307–312 <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0634-4>.
- Sabanadzovic S, Valverde RA, Brown JK, et al (2009) Southern tomato virus: the link between the families *Totiviridae* and *Partitiviridae*. *Virus Research* 140:130–137 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.11.018>.
- Sahlin E, Savage GP, Lister CE (2004) Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 17:635–647 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.003>.
- Sanahuja E (2017) Avances en la transmisión horizontal del virus meridional del tomate (STV) y su papel en el desarrollo de síntomas asociados al virus del mosaico del pepino dulce (PepMV). *Trabajo Fin de Carrera (Universitat Politècnica de València)*.
- Sánchez-Navarro JA, Aparicio F, Rowhani A, et al (1998) Comparative analysis of ELISA, nonradioactive molecular hybridization and PCR for the detection of prunus necrotic ringspot virus in herbaceous and Prunus hosts. *Plant Pathology* 47:780–786 <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.00301.x>.
- Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, et al (2010) Viral mutation rates. *Journal of Virology* 84:9733–9748 <https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10>.
- Sarkar D, Maji RK, Dey S, et al (2017) Integrated miRNA and mRNA expression profiling reveals the response regulators of a susceptible tomato cultivar to early blight disease. *DNA Research* 24:235–250 <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx003>.
- Sastry KS (2013a) Seed-borne plant virus diseases. *Springer Science & Business Media* ISBN 978-81-322-0812-9.
- Sastry KS (2013b) Methods of combating seed-transmitted virus diseases. *Springer Science & Business Media* ISBN 978-81-322-0813-6.

- Schnettler E, Hemmes H, Huisman R, et al (2010) Diverging affinity of tospovirus RNA silencing suppressor proteins, NSs, for various RNA duplex molecules. *Journal of Virology* 84:11542–11554 <https://doi.org/10.1128/JVI.00595-10>.
- Schwartz AR, Potnis N, Timilsina S, et al (2015) Phylogenomics of Xanthomonas field strains infecting pepper and tomato reveals diversity in effector repertoires and identifies determinants of host specificity. *Frontiers in Microbiology* 6:535 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00535>.
- Shen H, Zhong X, Zhao F, et al (2015) Overexpression of receptor-like kinase ERECTA improves thermotolerance in rice and tomato. *Nature Biotechnology* 33:996 <https://doi.org/10.1038/nbt.3321>.
- Shin S-J, Lee J-H, Kwon H-B (2017) Genome-wide identification and characterization of drought responsive MicroRNAs in *Solanum tuberosum* L. *Genes and Genomics* 39:1193–1203 <https://doi.org/10.1007/s13258-017-0586-8>.
- Simon-Mateo C, Garcia JA (2006) MicroRNA-guided processing impairs plum pox virus replication, but the virus readily evolves to escape this silencing mechanism. *Journal of Virology* 80:2429–2436 <https://doi.org/10.1128/JVI.02429-06>.
- Smith NA, Eamens AL, Wang M-B (2011) Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathogens* 7 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002022>.
- Soliman H, El-Matbouli M (2006) Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHS). *Veterinary Microbiology* 114:205–213 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.063>.
- Stafford CA, Walker GP, Ullman DE (2011) Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:9350–9355 <https://doi.org/10.1073/pnas.1100773108>.
- Stange C (2006) Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. *Ciencia e Investigación Agraria* 33:3-21.

- Stare T, Ramšak Ž, Križnik M, Gruden K (2019) Multiomics analysis of tolerant interaction of potato with potato virus Y. *Science data* 6:250 <https://doi.org/10.1038/s41597-019-0216-1>.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235–270 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.235>.
- Strange RN, Scott PR (2005) Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* 43:83–116 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>.
- Šutić DD, Sinclair JB (1991) Anatomy and physiology of diseased plants. *CRC press* ISBN 0849348064.
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, et al (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 203:32–43 <https://doi.org/10.1111/nph.12797>.
- Syller J (2012) Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13:204–216 <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00734.x>.
- Tagami Y, Inaba N, Kutsuna N, et al (2007) Specific enrichment of miRNAs in *Arabidopsis thaliana* infected with tobacco mosaic virus. *DNA Research* 14:227–233 <https://doi.org/10.1093/dnares/dsm022>.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* ISSN 1943-2631.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Tennant PF, Gonsalves C, Ling KS, et al (1994) Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathology* 84:1359–1365 <https://doi.org/10.1094/phyto-84-1359>

- Tollenaere C, Susi H, Laine A-L (2016) Evolutionary and epidemiological implications of multiple infection in plants. *Trends in Plant Science* 21:80–90 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.014>.
- Toussaint A, Kummert J, Maroquin C, et al (1993) Use of VIRAZOLE® to eradicate odontoglossum ringspot virus from in vitro cultures of *Cymbidium Sw.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32:303–309 <https://doi.org/10.1007/BF00042293>.
- Travezaño P, Patricia O (2016) Identificación de microARNs (miRNAs) asociados al estrés hídrico en *Solanum tuberosum* subsp andígena. *Tesis doctoral (Universidad Peruana Cayetano Heredia)*.
- Tripathi A, Goswami K, Tiwari M, et al (2018) Identification and comparative analysis of microRNAs from tomato varieties showing contrasting response to ToLCV infections. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24:185–202 <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0482-3>.
- Tromas N, Zwart MP, Lafforgue G, et al (2014) Within-host spatiotemporal dynamics of plant virus infection at the cellular level. *PLoS Genetic* 10 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004186>.
- Turco S, Golyaev V, Seguin J, et al (2018) Small RNA-omics for virome reconstruction and antiviral defense characterization in mixed infections of cultivated *Solanum* plants. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 31:707–723 <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0301-R>.
- Van Breusegem F, Dat JF (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141:384–390 <https://doi.org/10.1105/PP.107.3.384>.
- Van Etten JL, Lane LC, Dunigan DD (2010) DNA viruses: the really big ones (giruses). *Annual Review of Microbiology* 64:83–99 <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134338>.
- Van Loon LC, Bakker P, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review in Phytopathology* 36:453–483 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453>.

- Vasco KA (2012) Estandarización de la técnica de análisis de fusión de alta resolución para la detección de Babesia en garrapatas utilizando polimorfismos de nucleótidos. *Tesis doctoral (Universidad de Ecuador)*.
- Verbeek M, Dullemans AM, Espino A, et al (2015) First report of southern tomato virus in tomato in the Canary Islands, Spain. *Journal of Plant Pathology* 97:392-392 <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.V97I2.038>.
- Vlot AC, Klessig DF, Park SW (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* 11:436–442 <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.003>.
- Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Review Genetics* 6:206–220 <https://doi.org/10.1038/nrg1555>.
- Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136:669–687 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>.
- Walia JJ, Willemsen A, Elci E, et al (2014) Genetic variation and possible mechanisms driving the evolution of worldwide fig mosaic virus isolates. *Phytopathology* 104:108–114 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-13-0145-R>.
- Walkey DGA (1991) Production of virus-free plants. *Applied Plant Virology* ISBN 978-94-011-3090-5.
- Wang B, Dong M, Chen W, et al (2012) Microarray identification of conserved microRNAs in *Pinellia pedatisecta*. *Gene* 498:36–40 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.075>.
- Wang J, Meng F, Chen R, et al (2016) RT-PCR Differentiation, molecular and pathological characterization of andean and ordinary strains of potato virus S in potatoes in China. *Plant Disease* 100:1580–1585 <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1257-RE>.
- Wang MB, Masuta C, Smith NA, et al (2012) RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 25:1275–1285 <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR>.

- Wang T, Sun MY, Wang XS, et al (2016) Over-expression of GmG1a-Regulated Soybean miR172a confers early flowering in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* 17:645 <https://doi.org/10.3390/ijms17050645>.
- Wang YJ, Zhou Y, Li ZA, et al (2013) A RT-LAMP assay for detection of citrus tristeza virus. *Scientia Agricultura Sinica* 46:517–524 <https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2013.03.008>.
- Watters KE, Choudhary K, Aviran S, et al (2017) Probing of RNA structures in a positive sense RNA virus reveals selection pressures for structural elements. *Nucleic Acids Research* 46:2573–2584 <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1273>.
- Wee EJH, Lau HY, Botella JR, Trau M (2015) Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. *Chemical Communication* 51:5828–5831 <https://doi.org/10.1039/c4cc10068a>.
- Wei C, Kuang H, Li F, Chen J (2014) The I2 resistance gene homologues in *Solanum* have complex evolutionary patterns and are targeted by miRNAs. *BMC Genomics* 15:743 <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-743>.
- Wei L, Zhang D, Xiang F, et al (2009) Differentially expressed miRNAs potentially involved in the regulation of defense mechanism to drought stress in maize seedlings. *International Journal of Plant Sciences* 170:979–989 <https://doi.org/10.1086/605122>.
- Wijkamp I, Peters D (1993) Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology* 83:986–991 <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-986>.
- Wu J, Wang L, Wang S (2017) MicroRNAs associated with drought response in the pulse crop common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Gene* 628:78–86 <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.038>.
- Wu L, Yu J, Shen Q, et al (2018) Identification of microRNAs in response to aluminum stress in the roots of Tibetan wild barley and cultivated barley. *BMC Genomics* 19:1–14 <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4953-x>.
- Xu D, Mou G, Wang K, Zhou G (2014) MicroRNAs responding to southern rice black-streaked dwarf virus infection and their target genes associated with symptom

- development in rice. *Virus Research* 190:60–68 <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.007>.
- Xu P, Chen F, Mannas JP, et al (2008) Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist* 180:911–921 <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02627.x>.
- Xu S, Liu N, Mao W, et al (2016) Identification of chilling-responsive microRNAs and their targets in vegetable soybean (*Glycine max L.*). *Scientific Report* 6:26619 <https://doi.org/10.1038/srep26619>.
- Yadav CB, Muthamilarasan M, Pandey G, et al (2015) Identification, characterization and expression profiling of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in foxtail millet. *Plant Molecular Biology Report* 33:43–55 <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0736-y>.
- Yan F, Zhang H, Adams MJ, et al (2010) Characterization of siRNAs derived from rice stripe virus in infected rice plants by deep sequencing. *Archives of Virology* 155:935–940 <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0670-8>.
- Yang Y, Liu T, Shen D, et al (2019) Tomato yellow leaf curl virus intergenic siRNAs target a host long noncoding RNA to modulate disease symptoms. *PLoS Pathogens* 15 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007534>.
- Zhang YL, Shen ZJ, Zhong J, et al (2003) Preliminary characterization of pepino mosaic Virus shanghai isolate (PepMV-Sh) and its detection with ELISA. *Acta Agriculturae Shanghai* ISSN 1000-3924.
- Yin J, Liu M, Ma D, et al (2018) Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 136:90–98 <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.013>.
- Zeng J, Ye Z, He X, et al (2019) Identification of microRNAs and their targets responding to low-potassium stress in two barley genotypes differing in low-K tolerance. *Journal of Plant Physiology* 234–235:44–53 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.01.011>.
- Zhai J, Jeong DH, De Paoli E, et al (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes and Development* 25:2540–2553 <https://doi.org/10.1101/gad.177527.111>.

- Zhang H, Huang S, Tan J, et al (2020) MiRNAs profiling and degradome sequencing between the CMS-line N816S and its maintainer line Ning5m during anther development in pepper (*Capsicum annuum* L.). *BioRxiv* (Preprint) <https://doi.org/10.1101/2020.02.04.933473>.
- Zhang Q, Zhang Y, Wang S, et al (2019) Characterization of genome-wide microRNAs and their roles in development and biotic stress in pear. *Planta* 249:693–707 <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3027-2>.
- Zhang XF, Zhang S, Guo Q, et al (2018) A new mechanistic model for viral cross protection and superinfection exclusion. *Frontiers in Plant Science* 9:40 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00040>.
- Zhao G, Yu H, Liu M, et al (2017) Identification of salt-stress responsive microRNAs from *Solanum lycopersicum* and *Solanum pimpinellifolium*. *Plant Growth Regulation* 83:129–140 <https://doi.org/10.1007/s10725-017-0289-9>.
- Zhao J, Zhang X, Hong Y, et al (2016) Chloroplast in plant-virus interaction. *Frontiers in Microbiology* 7:1565 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01565>.
- Zhou SX, Zhu Y, Wang LF, et al (2019) Osa-miR1873 fine-tunes rice immunity against *Magnaporthe oryzae* and yield traits. *Journal of Integrative Plant Biology* 62:1213–1226 <https://doi.org/10.1111/jipb.12900>.
- Żywicki M, Gracz J, Karłowski W, et al (2015) Expression of miRNAs involved in phosphate homeostasis and senescence is altered in glyphosate-treated maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:1–10 <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2022-5>.

Agradecimientos

A la memoria de mi madre.

Agradecer a toda la gente que ha estado a mi alrededor aguantando esta etapa de mi vida. A los que están y a los que ya no están. A mi madre. A mi hermano. A toda mi familia que siempre están ahí. A todos mis amigos que me han soportado y me han apoyado siempre. A todas las personas especiales que han pasado por mi vida, aunque no haya sido para quedarse. Es imposible nombrarlos a todos, ellos saben quiénes son, simplemente gracias por tanto. Os quiero.

Agradecer también a todos los compañeros de laboratorio, más que compañeros amigos, a Andrés, Juan, Marian, Diana, Inma y especialmente a Caterina Carpino.

A Isabel Font y Ana Alfaro por su participación en este trabajo mediante el aporte de material vegetal y por la coordinación de algunos de los experimentos. A Karelia y Maru por su apoyo y por ayudarme con los problemas cotidianos del laboratorio, así como a Pepe Guerri.

A Vicente Medina por su participación en la parte correspondiente a la microscopia óptica y electrónica. A Pepi Gómez y a Rocío Bautista por su ayuda y por guiarme en el mundo de la secuenciación masiva y los miRNAs.

Agradecer finalmente a Rosa Peiró y Luis Rubio por los análisis, el apoyo y la paciencia, y a mi director de tesis Luis Galipienso por la oportunidad de realizar este trabajo de tesis doctoral y por el trabajo de laboratorio.

A los que nombro y a los que no, muchas gracias por estar siempre, porque todo esto no hubiera sido posible y no hubiera tenido sentido. GRACIAS

“Lo bueno de la ciencia, es que es cierta, creas o no en ella”

Neil deGrasse Tyson

ANEXOS

Material suplementario 1. Secuencias nucleotídicas utilizadas en el análisis de diversidad genética del virus meridional del tomate (STV) y otros virus (Capítulo 2).

Virus	Género/Familia	Hospedador	Área geográfica	Número de acceso
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	México	EF442780.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Corea del Sur	LC270272.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	China	KY228384.1, KT438549.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	República Dominicana	KX525266.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	UK	KY810783.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Suiza	MF422617.1, MF422618.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bangladesh	KT634055.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA: Carolina del Norte	KT852573.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA: Florida	KX949574.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA: Mississippi	EU413670.1
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	España: Gran Canarias	KJ174690.1, MK026638, MK026639, MK026640, MK026641
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	España: Valencia	MK026630, MK026631, MK026632, MK026637
Southern tomato virus (STV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	España: Alicante	MK026633, MK026634, MK026635, MK026636, MK026642, MK026643, MK026644
Blueberry latent virus (BBLV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	USA	HM756721.1, HM756723, HM756724.1, HM756725.1, HM756726.1, HM756727.1, HM756715.1, HM756716.1, HM756717.1, HM756718.1, HM756719.1, HM756720.1, HM756722.1, HM756708.1, HM756709.1, HM756710.1, HM756712.1, HM756713.1, HM756714.1, HM756711.1, HM756695.1, HM756696.1, HM756697.1, HM756698.1, HM756699.1, HM756700.1, HM756702.1, HM756701.1, HM756703.1, HM756704.1, HM756705.1, HM756706.1, HM756707.1, EF442779.2, HM029248.1, HM029247.1, HM029246.1
Blueberry latent virus (BBLV)	<i>Amalgavirus/ Amalgaviridae</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Japón	AB608991.1
Vicia cryptic virus (VCV)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Vicia faba</i>	Alemania	NC_007242.1, AY751738.1
Vicia cryptic virus (VCV)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Vicia faba</i>	China	EU605884.1

Vicia cryptic virus (VCV)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Vicia faba</i>	No especificado	EF173395.1, EF173393.1, EF173391.1, EF173390.1
White clover cryptic virus 1 (WCCV1)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Trifolium repens</i>	Nueva Zelanda	KT283005.1, KT283006.1, KT283008.1, KT283001.1, KT283003.1, KT283004.1, KT283009.1
White clover cryptic virus 1 (WCCV1)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Trifolium repens</i>	Australia	KT283007.1
White clover cryptic virus 1 (WCCV1)	<i>Alphapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Trifolium repens</i>	Francia	AY705785.1, NC_006276.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Turquía	MH311950.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón: Kushiro	LC085162.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón: Ashoro	LC085163.1, LC085165.1, LC085166.1, LC085167.1, LC085169.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón: Ishikari	LC085164.1, LC085171.1, LC085172.1, LC085173.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón: Iwate	LC085175.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón: Okinawa	LC085177.1
Cryptosporidium parvum virus 1 (CSpV1)	<i>Cryspovirus/ Partitiviridae</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Japón	LC085170.1
Pepper cryptic virus 1 (PCV1)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum L.</i>	USA	NC_037096.1
Pepper cryptic virus 1 (PCV1)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum L.</i>	Corea del Sur	KR676353.1, KT931617.1, KY923702.1
Pepper cryptic virus 1 (PCV1)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum L.</i>	China	KY978590.1, KX765306.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Corea del Sur	KR676354.1, KT931616.1, KY923704.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	República Dominicana	KX525269.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	USA	NC_034167.1, MG542618.1, MG542622.1, MG542621.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	México	MG542617.1, MG542619.1, MG542623.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Turquía	LC325818.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Ixeris dentata</i>	Corea del Sur	LC195295.1
Pepper cryptic virus 2 (PCV2)	<i>Deltapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Guatemala	MG542620.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	España	KJ786373.1, KJ786372.1, KJ786371.1, KJ786370.1, KJ786369.1, KJ786368.1, KJ786367.1, KJ786374.1, KJ786375.1, KJ786376.1, KJ786377.1, KJ786379.1, KJ786380.1, KJ786381.1, KJ786390.1, KJ786391.1, KJ786392.1, KJ786393.1, KJ786394.1, KJ786395.1, KJ786396.1, KJ786398.1, KJ786399.1, KJ786400.1,

				KJ786401.1, KJ786402.1, KJ786403.1, KJ786404.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Canadá	KJ786378.1, KJ786382.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Italia	KJ786383.1, KJ786388.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Serbia	KJ786384.1, KJ786385.1, KJ786387.1, KJ786389.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Montenegro	KJ786386.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Finlandia	KJ786397.1, KJ786408.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Canadá	KJ786405.1, KJ786406.1, KJ786407.1
Grammeniella abietina RNA virus (GaRV)	<i>Gammapartitivirus/ Partitiviridae</i>	<i>Gremmeniella abietina</i>	Turquía	KJ786409.1, KJ786410.1
Leishmania RNA virus 1 (LRV1)	<i>Leishmaniavirus/ Totiviridae</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>	Guinea Francesa	KY750630.1, KY750629.1, KY750628.1, KY750627.1, KY750626.1, KY750625.1, KY750624.1, KY750623.1, KY750622.1, KY750621.1, KY750620.1, KY750619.1, KY750618.1, KY750617.1, KY750616.1, KY750615.1, KY750614.1, KY750613.1, KY750612.1
Leishmania RNA virus 1 (LRV1)	<i>Leishmaniavirus/ Totiviridae</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>	Brasil	NC_003601.1
Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)	<i>Trichomonasvirus/ Totiviridae</i>	No especificado	USA	KM268108.1, HQ607523.1, HQ607521.1, HQ607517.1, HQ607516.1, HQ607513.1
Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)	<i>Trichomonasvirus/ Totiviridae</i>	No especificado	Cuba	JF436869.1
Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)	<i>Trichomonasvirus/ Totiviridae</i>	No especificado	China	DQ528812.1
Trichomonas vaginalis virus 1 (TVV1)	<i>Trichomonasvirus/ Totiviridae</i>	No especificado	No especificado	U57898.1, U08999.1
Rice grassy stunt tenuivirus (RGST)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	<i>Oryza sativa</i>	No especificado	AB000403
Rice grassy stunt tenuivirus (RGST)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	Filipinas	AB023779
Rice grassy stunt tenuivirus (RGST)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	China	AF290947
Rice grassy stunt tenuivirus (RGST)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	Vietnam	EU076534, EU076540, FR696600, GQ329709
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	<i>Laodelphax striatellus</i>	Japón	AB622856
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	<i>Laodelphax striatellus</i>	China	AB622861
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	<i>Oryza sativa</i>	Japón	AB622865
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	<i>Oryza sativa</i>	No especificado	EF141329
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	China	AF508912, AJ781026, DQ299158, DQ299161
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	Corea del Sur	FJ602676, FJ602677, FJ602681, FJ602683, FJ602685
Rice stripe tenuivirus (RSV)	<i>Tenuivirus/ Phenuiviridae</i>	No especificado	No especificado	AF220104, AF220107, AF220108, AY284862, AY286106, AY597384, AY597388

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	Indonesia	AB194531
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>N. benthamiana</i>	Corea del Sur	AB369274
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Francia	AJ429090
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Grecia	AJ459421
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Lagenaria siceraria</i>	India	AJ748352
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucurbita</i>	China	DQ997778
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Rusia	EF521882
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Lagenaria siceraria L.</i>	Taiwán	FJ654657
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	España	GQ411361
Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Israel	KF155229
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Corea del Sur	AB630368
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	China	HQ699080
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	India	JX173808
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum sp.</i>	España	FN594869
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Japón	AB062049
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	No especificado	AF525080
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Alemania	AJ429087
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Italia	AJ429089
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	China	AY632863
Pepper mild mottle virus (PMMoV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Israel	EF434393
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japón	AB083196
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Corea del Sur	AF260730
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Australia	AF332868
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Impatiens hawkeri</i>	Brasil	AY063743
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Eustoma russellianum</i>	Taiwán	AY383730
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Shanghái	DQ661035

Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	España	JF810426
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	China	JX982095
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	China	AF155507, AJ132845
Tomato mosaic virus (ToMV)	<i>Tobamovirus/ Virgaviridae</i>	No especificado	Alemania	AJ429083
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Francia	AJ438767
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	España: Murcia	AJ606359
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Perú	AJ606361
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungría	AM491606
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	AY509926, AY509927
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Chile	DQ000984, DQ000985
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Polonia	EF408821
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bélgica	FJ457096
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Países Bajos	FJ940224
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Siria	FN178521
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Italia	HQ663890
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Suráfrica	HQ872607
Pepino mosaic virus (PepMV)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Lituania	JQ979169
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	India	FJ643623
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Letonia	GQ496608
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Escocia	GU144347
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Australia	GU384727
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Bangladesh	JX273242
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	China	DQ315386
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	No especificado	AF260640
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	<i>Pisum sativum</i>	Irán	FJ461343
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	No especificado	Taiwán	AF272736
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	No especificado	Corea	AF373782
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	No especificado	China	EF063709
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	No especificado	Rusia	EU021215
Potato virus X (PVX)	<i>Potexvirus/ Alphaflexiviridae</i>	No especificado	No especificado	AB056718, AF528555

Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Musa sapientum</i>	Indonesia	AB069971
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Siria	AB448692
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>	No especificado	AJ511990
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Alstroemeria</i>	No especificado	AJ304398
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Lilum oriental</i>	Corea del Sur	AJ495841
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Lilum sp.</i>	Brasil	AY374328
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Australia	AJ585517
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	España: Barcelona	AM183116
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Países bajos	AJ810254
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Tailandia	AJ810259
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	India	AJ810260
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	China	AJ810261
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Broad bean</i>	Bulgaria	AJ810262
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Cucumis melo</i>	Australia	AJ585518
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Cucumis melo</i>	Grecia	AJ810265
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Irán	AY871070
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	No especificado	USA	AJ810255, AF523343
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	No especificado	USA: California	AF523346
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	No especificado	China	AF268599, AJ242585
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	No especificado	Corea del Sur	AB290151
Cucumber mosaic virus (CMV)	<i>Cucumovirus/Bromoviridae</i>	No especificado	No especificado	AF198103
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	<i>Chrysanthemum sp.</i>	USA: California	AY744470
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	USA: Carolina del Norte	AY744477
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Australia	AY818321, AY879109
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Italia	DQ376179
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	No especificado	Japón	AB088385
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	No especificado	No especificado	AB190819, AF020659
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	No especificado	Suráfrica	AJ296600
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	<i>Tospovirus/Bunyaviridae</i>	No especificado	Alemania	AJ297611
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Siria	AB295476

Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Japón	AB714134
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Polonia	AJ889866
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Alemania	AJ889868
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Francia	AJ890348
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	China	AY742724
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	Japón	AB042812, AB331545
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	Italia	AJ303093
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	Turquía	AJ303095
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	España	AJ303096
Potato virus Y (PVY)	<i>Potyvirus/Potyviridae</i>	No especificado	No especificado	AB025415
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Corea del Sur	JF704084
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	<i>Pogostemon cablin</i>	No especificado	AB011007
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	<i>Gentiana triflora</i>	Japón	AB746939
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	No especificado	Japón	AB076671
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	No especificado	Corea	AF104335
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	No especificado	Singapur	AF225954
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	No especificado	China	AJ132844
Broad bean wilt virus 2 (BBWV-2)	<i>Fabavirus/Comoviridae</i>	No especificado	No especificado	AB013616, AB018698, AB032403

Material suplementario 2. Predicción de genes diana de los miRNA expresados diferencialmente en plantas infectadas con el virus meridional del tomate (STV) y sin infectar empleando las bases de datos *Uni-ProtK*, *Gene Ontology (GO)* y *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*. El nombre de las especies donde se ha identificado el miRNA se muestra entre paréntesis.

miRNA	Nº de acceso	Nombre del gen diana	Función
stu-miR398a-3p (<i>Solanum tuberosum</i>)	Solyc11g064980.1.1	Dominio carboxy-terminal de la RNA polimerasa II, Polipeptido pequeño A fosfatasa 1	Actividad fosfatasa
	Solyc08g081220.1.1	Citocromo P450	Unión a grupos hemo, unión de iones de hierro, actividad de monooxigenasa, actividad de oxidoreductasa y reducción de oxígeno molecular
	Solyc08g083210.3.1	Endo-1,4-beta-glucanasa	Actividad de la celulasa implicada en el proceso metabólico de los carbohidratos
	Solyc05g005460.3.1	Proteína de la familia de dominios C1 rica en cisteína / histidina	
	Solyc06g009530.3.1	Proteína de pliegue similar a la de unión a carbohidratos	Unión a carbohidratos
	Solyc02g083410.3.1	Receptor-tipo proteína quinasa TESEO 1	Unión a ATP y proteína con actividad serina / treonina quinasa
	Solyc05g016040.1.1	Mediador de la subunidad de transcripción de RNA polimerasa II	
	Solyc04g014950.3.1	Proteína de la familia alfa 1,4-glicosiltransferasa	Actividad transferasa
	Solyc12g056170.2.1	Segregación cromosómica en la meiosis 3	
	Solyc02g068780.3.1	Proteína de dominio DCD (desarrollo y muerte celular)	
	Solyc01g088505.1.1	Dinamina	Unión de GTP y actividad de GTPasa
	Solyc11g062440.2.1	L-ascorbato oxidasa	
	Solyc10g008450.1.1	Proteína que contiene el dominio de interacción asociada a la caja F	
	Solyc01g106280.3.1	PSTVd proteína que se une a RNA	
	Solyc01g108010.3.1	Endonucleasa o glicosil hidrolasa	Regulación de la expresión génica
	Solyc07g066030.3.1	Subunidad activadora del proteasoma 4	Unión a histona acetilada a lisina, actividad activadora de peptidasa y unión a proteasoma
	Solyc01g109980.3.1	Proteína homeótica relacionada con BEL1 30	Unión a DNA y regulación de la transcripción.
	Solyc07g008140.3.1	Proteína de cobre azul	Transferencia de electrones
	stu-miR398a-5p (<i>Solanum tuberosum</i>)	Solyc10g005150.2.1	Proteína familiar relacionada con la purina permeasa
Solyc07g045290.3.1		Cadena larga de acil-CoA sintetasa	Actividad de la cadena larga del ácido graso-CoA ligasa
Solyc11g064980.1.1		Polipéptido de RNA polimerasa II de dominio carboxi-terminal A fosfatasa pequeña 1	Actividad fosfatasa

	Solyc12g005670.2.1	HAK5	Transportador transmembrana de iones Na ⁺ y K ⁺
	Solyc09g083400.3.1	Familia de proteínas TPX2 (proteína dirigida a Xklp2)	
	Solyc12g049380.2.1	UDP-N-acetilglucosaminoglucosaminidasa reductasa	
	Solyc06g052100.2.1	Proteína de la familia de unión a RNA	Unión a RNA
	Solyc11g005550.2.1	Transducina /proteína de la superfamilia con repetición WD40	
	Solyc06g072407.1.1	Tipo I inositol-1,4,5-trisfosfato 5-fosfatasa CVP2	Defosforilación de fosfatidilinositol
	Solyc11g028340.2.1	DNA topoisomerasa VI, subunidad B	Unión a ATP, unión a DNA y topoisomerasa de DNA tipo II implicadas en el cambio topológico de DNA
	Solyc01g091000.3.1	Proteína de la familia del factor de transcripción PLATZ	
	Solyc03g095250.3.1	Proteína de tipo COP1	
	Solyc12g017480.2.1	Proteína que contiene repeticiones ricas en leucina	
	Solyc08g066670.3.1	Proteína de la familia de exostosina	Glucosilación de proteínas
	Solyc12g017830.2.1	Factor de transcripción GATA 19	Factor de transcripción de unión a DNA regulador de la floración.
	Solyc12g056440.2.1	Proteína con dominio SPX	Transporte transmembrana
	Solyc06g082190.3.1	Proteína quinasa	Unión a ATP y proteína tirosina quinasa no de membrana.
	Solyc02g082100.3.1	Proteína de la superfamilia RING/U-box	Regulación de la muerte celular programada
stu-miR3627-3p (<i>Solanum tuberosum</i>)	Solyc07g008290.3.1	Proteína de la familia O-fucosiltransferasa	Proceso biosintético de la pectina de la pared celular, el proceso metabólico de la fucosa y el proceso metabólico de mannan.
	Solyc07g042660.1.1	Proteína que contiene el dominio SNF2	Unión de ATP y unión de iones metálicos
	Solyc09g090870.3.1	Reparación de DNA proteína 1	Reparación del DNA
	Solyc03g083143.1.1	Radiación gamma y proteína inducida por mitomicina C	
	Solyc03g083140.3.1	Proteína de inserción de membrana, OxaA / YidC con proteína que contiene el dominio de repetición de tetratricopeptido	
	Solyc02g062270.3.1	Proteína de unión a RNA	Unión a RNA
	Solyc02g088200.3.1	Activador de la señal cointegrada 1 subunidad compleja 1	Unión a RNA
	Solyc03g119420.3.1	Anamorsin homóloga	
	Solyc11g007550.1.1	Proteína de la superfamilia de metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-metionina	Metilación de proteínas
	Solyc02g067670.3.1	Flap endonucleasa 1	Reparación de DNA
	Solyc11g065160.2.1	Subunidad del factor de remodelación de nucleosomas BPTF	Unión a iones metálicos
	Solyc10g050170.2.1	Proteína de la superfamilia RING/U-box	Desarrollo de la floración y meristemas.
	Solyc02g065690.3.1	Biogénesis de orgánulos relacionados con lisosomas complejo 1 subunidad 2	
	Solyc03g063390.1.1	Proteína de la familia del factor de terminación de la transcripción mitocondrial	Regulación de la transcripción
	Solyc03g031660.1.1	Homer proteína isoforma 2	
	Solyc10g084930.2.1	Protein quinasa	Unión a ATP y actividad serina / treonina quinasa de proteínas implicadas en el

			ensamblaje del autofagosoma, la autofosforilación de proteínas y la regulación de la autofagia
	Solyc12g056130.2.1	Proteína de la familia con dominio BTB / POZ	
	Solyc07g066110.1.1	Proteína que contiene repetición de pentatricopeptido	
	Solyc06g072300.3.1	Argonauta 1	Silenciamiento génico
	Solyc01g104970.3.1	Receptor-tipo quinasa	Unión a ATP, unión del receptor de señalización y actividad transmembrana de la serina / treonina quinasa
sly-miR169e-3p (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Solyc06g082560.2.1	Chaperona	Unión a ATP implicada en el proceso metabólico de proteínas
	Solyc00g016470.1.1	Proteína transmembrana	
	Solyc01g087830.1.1	Subtilisina-tipo proteasa	Homodimerización de proteínas, respuesta de defensa de diferente tipo
	Solyc08g075860.3.1	Proteína B-box con dedo de zinc	Respuesta de defensa frente a bacterias
	Solyc03g124010.3.1	Bucle P que contiene la proteína de la superfamilia de nucleósidos trifosfato hidrolasas	Actividad hidrolasa
	Solyc06g074150.3.1	Familia de proteínas quinasa similares a receptores repetidos ricos en leucina	Actividad quinasa
	Solyc07g049165.1.1	Proteína de la familia ribonucleasa 3	Producción de siRNA a partir de dsRNA
	Solyc03g119540.3.1	Proteína tipo CONSTANS con dedos de zinc	Regulación de la transcripción
	Solyc11g067110.2.1	Subunidad catalítica de la DNA polimerasa épsilon	Unión a 4 grupos de hierro y 4 grupos Replicación y reparación de DNA.
	Solyc02g072240.3.1	Proteína de la familia de celulosa sintasa	Celulosa sintasa y unión a iones metálicos implicados en la organización de la pared celular, el proceso biosintético de la celulosa, la respuesta de defensa, respuesta al estrés osmótico y respuesta a la privación de agua.
	Solyc12g016180.1.1	Proteína tipo AGAMOUS con MADS-box	Factor de transcripción implicado en la regulación positiva de la transcripción por la RNA polimerasa II
	Solyc05g010360.1.1	Proteína de la superfamilia F-box/RNI	
	Solyc11g005450.2.1	Proteína de la familia del factor de alargamiento de la transcripción (TFIIS)	Regulación de la traducción de RNA en proteínas
	Solyc05g054570.3.1	Proteína de la familia del factor citosólico SEC14 / proteína de la familia de transferencia de fosfoglicéridos	
stu-miR319-3p (<i>Solanum tuberosum</i>)	Solyc08g048370.3.1	Factor de transcripción TCP 29	Factor de transcripción, regulación de la transición de la fase vegetativa a la reproductiva
	Solyc01g100650.3.1	Proteína de la familia de la hidrolasa de tipo haloácido deshalogenasa	
	Solyc07g062680.2.1	Lanceolate	Factor de transcripción
	Solyc12g014140.2.1	SITCP3	Actividad del factor de transcripción de unión al DNA

Solyc07g053410.3.1	Factor de transcripción TCP 10	Factor de transcripción implicados en la diferenciación celular y el desarrollo de la hoja
Solyc01g005775.1.1	Proteína de la familia quinasa con dominio repetido rico en leucina	
Solyc05g045670.3.1	Translocador de glucosa-6-fosfato / fosfato	Transportador transmembrana
Solyc07g063780.2.1	Proteína Serina/treonina kinasa	Unión a ATP y actividad de serina / treonina quinasa implicadas en el reconocimiento del polen
Solyc12g013870.2.1	Proteína que contiene el dominio S4 de unión a RNA	Unión a RNA
Solyc03g119020.2.1	Proteína reguladora (NPR1)	Respuesta de defensa a bacterias y hongos, señalización extracelular de ATP, resistencia sistémica inducida, regulación de la respuesta hipersensible, ubiquitinación de proteínas, regulación del ácido salicílico, ácido jasmónico, resistencia adquirida
Solyc12g040470.2.1	Fosfolipasa C2 no específica	Fosfatasa ácida implicada en el proceso catabólico de fosfolípidos
Solyc10g008780.1.1	Factor de transcripción TCP 30	Factor de transcripción
Solyc05g012840.1.1	Factor de transcripción TCP 1	Factor de transcripción implicado en el desarrollo de la floración y brotación
Solyc01g088160.3.1	citoquinina oxidasa 2	Unión a FAD y actividad de citoquinina deshidrogenasa implicadas en el proceso metabólico de citoquinina
Solyc09g072830.3.1	Proteína de la familia del factor de transcripción tipo Myb	Unión a DNA
Solyc08g078520.3.1	Transportador de electrones	
Solyc06g069080.3.1	Proteína 7A con tetrapéptido repetido	

Material suplementario 3. Comparativa de los miRNAs con expresión diferencial en plantas de tomate infectadas sólo con el virus del mosaico del pepino (CMV) y en coinfección con el virus meridional del tomate (STV) (grupo STV + CMV). Las funciones de los diferentes miRNAs estaban descritas en la bibliografía o se infirieron empleando el programa informático online psRNAtarget (solo se han tenido en cuenta los genes diana con una identidad del 100% con la secuencia del miRNA).

miRNA	Hospedador	Acumulación		Función	Referencia
		CMV	STV + CMV		
stu-miR393-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	5.79	5.62	Estrés abiótico y desarrollo	(Ding et al. 2017; Li et al. 2019; Zhang et al. 2020)
sly-miR168a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	4.00	3.66	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018)
stu-miR408b-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	7.03	6.72	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019)
sly-miR9470-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	4.57	3.41	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Prigigallo et al. 2019; Zhao et al. 2017)
stu-miR8031*	<i>Solanum tuberosum</i>	-3.19	-0.97	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR403-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	2.21	2.64	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Prigigallo et al. 2019)
stu-miR167b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	4.48	4.40	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9479-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	3.96	2.62	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9475-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.88	-1.68	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR169e-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-5.69	-5.08	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR156e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.62	-2.26	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Kataria y Verma, 2018; M. Liu et al. 2018; Zhao et al. 2017)
gma-miR6300	<i>Glycine max</i>	3.44	3.15	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9476-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.65	1.29	Estrés abiótico, respuesta contra patógenos, transporte de electrones y señalización celular	(Filiz et al. 2019; Prigigallo et al. 2019)
sly-miR9474-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-4.91	-3.30	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)
mtr-miR166b	<i>Medicago truncatula</i>	-2.56	-2.87	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR6024-5p*	<i>Solanum tuberosum</i>	4.10	5.04	Resistencia contra patógenos	(Wei et al. 2014)

bta-miR-2478*	<i>Bos taurus</i>	1.97	1.28	-	Programa informático online psRNAtarget
gma-miR396e*	<i>Glycine max</i>	-3.17	-1.76	-	Programa informático online psRNAtarget
zma-miR166i-5p	<i>Zea mays</i>	4.19	-	Defensa contra patógenos	(Yadav et al. 2015)
sly-miR167b-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.04	-1.58	Estrés abiótico	(Rey-Burusco et al. 2019)
stu-miR7988*	<i>Solanum tuberosum</i>	3.44	3.27	-	Programa informático online psRNAtarget
mtr-miR172c-5p*	<i>Medicago truncatula</i>	3.77	4.73	Estrés abiótico	(Long et al. 2020)
sly-miR9471b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.36	-1.25	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR9476-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.32	1.11	Defensa contra patógenos	(Tripathi et al. 2018)
sly-miR477-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-3.44	-3.63	Estrés abiótico	(Filiz et al. 2019; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
ath-miR165a-5p*	<i>A. thaliana</i>	3.27	2.40	Estrés abiótico	(Yang et al. 2019)
stu-miR6026-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.01	2.38	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR7983-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.99	-	Estrés abiótico y desarrollo	(Kondhare et al. 2018)
stu-miR482e-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.27	-	Defensa contra patógenos	(Chi et al. 2015)
stu-miR398a-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.98	3.23	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019; Travezaño y Patricia, 2016)
bdi-miR7782-3p	<i>Brachypodium distachyon</i>	-1.78	-1.72	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9478-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	2.71	2.43	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
ppe-miR858	<i>Prunus persica</i>	-1.37	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR398a-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.82	-1.97	Estrés abiótico y protección contra estrés oxidativo	(Qiao et al. 2017; Sarkar et al. 2017; Shin et al. 2017)
sly-miR166c-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-3.23	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR164b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-4.00	Estrés abiótico y desarrollo	(Liu et al. 2017; Yin et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR482e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.08	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR9470-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.55	Defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018)
ppe-miR396a	<i>Prunus persica</i>	-	-3.69	Desarrollo	(Farinati et al. 2020)
sly-miR9473-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.76	Defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018)
mmu-miR-466i-5p	<i>Mus musculus</i>	-	4.06	Desarrollo	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR156d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-2.11	Estrés abiótico	(Shin et al. 2017)

stu-miR8025-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	3.59	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR319-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-2.01	Desarrollo	(Chaves et al. 2015; Kondhare et al. 2018)
stu-miR396-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.12	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR3627-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	3.61	-	Programa informático online psRNAtarget
osa-miR162b	<i>Oryza sativa</i>	-	-1.97	Estrés abiótico	(Goswami et al. 2017; Li et al. 2015)
stu-miR167d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-1.13	Estrés abiótico y desarrollo	(Zhang et al. 2019)
gma-miR172k	<i>Glycine max</i>	-	2.42	Estrés abiótico y desarrollo	(Akdogan et al. 2016; C. Liu et al. 2018; Wang et al. 2016; Wu et al. 2017)
mdm-miR396a	<i>Malus domestica</i>	-	-1.53	Desarrollo	(Farinati et al. 2020)
bdi-miR845	<i>Brachypodium distacyon</i>	-		Multifunción (reparación de DNA y regulación de la transcripción)	(W. Liu et al. 2018)
sly-miR482d-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.03	Defensa contra patógenos	(Tripathi et al. 2018)
sly-miR403-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	0.79	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR1916	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.30	Estrés abiótico, desarrollo y defensa frente a patógenos	(Chen et al. 2019b, 2019a; Feng et al. 2014; Mohorianu et al. 2011; Moxon et al. 2008; Pentimone et al. 2018)
ptc-miR6478	<i>Populus trichocarpa</i>	-	-3.13	Estrés abiótico y Desarrollo	(He et al. 2015; Zeng et al. 2019; Żywicki et al. 2015)
sly-miR4376	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.21	Defensa contra patógenos	(Feng et al. 2014; Pradhan et al. 2015; Tripathi et al. 2018)
sly-miR9471b-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.67	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Tripathi et al. 2018)
osa-miR166g-5p	<i>Oryza sativa</i>	-	-1.62	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9472-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.55	Estrés abiótico, defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018)
sly-miR164a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.02	Estrés abiótico	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018)
ath-miR8175	<i>A. thaliana</i>	-	1.10	Estrés abiótico	(Wu et al. 2018; Zeng et al. 2019)
sly-miR164a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.02	Estrés abiótico	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018)

* miRNAs con diferencias de expresión entre los grupos CMV y STV + CMV ($\log_2\text{FoldChange} > 0.56$).

Material suplementario 4. Comparativa de los miRNAs con expresión diferencial en plantas de tomate infectadas sólo con el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) y en coinfección con el virus meridional de tomate (grupo STV + PepMV). Las funciones de los diferentes miRNAs estaban descritas en la bibliografía o se infirieron empleando el programa informático online psRNAtarget (solo se han tenido en cuenta los genes diana con una identidad del 100% con la secuencia del miRNA).

miRNA	Hospedador	Acumulación		Función	Referencia
		PepMV	STV + PepMV		
stu-miR398a-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	3.46	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019; Travezaño y Patricia, 2016)
sly-miR169e-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.68	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR319-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.72	-1.92	Desarrollo	(Chaves et al. 2015; Kondhare et al. 2018)
stu-miR393-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.47	-	Estrés abiótico y desarrollo	(Ding et al. 2017; Li et al. 2019; Zhang et al. 2020)
stu-miR408b-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	3.00	3.32	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019)
sly-miR9470-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	4.89	5.73	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Prigigallo et al. 2019; Zhao et al. 2017)
stu-miR8031	<i>Solanum tuberosum</i>	-0.97	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9479-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	2.13	2.36	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9475-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.01	-2.09	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR156e-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.55	-1.55	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Kataria y Verma, 2018; M. Liu et al. 2018; Zhao et al. 2017)
gma-miR6300	<i>Glycine max</i>	2.78	3.30	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9476-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.87	1.74	Estrés abiótico, respuesta contra patógenos, transporte de electrones y señalización celular	(Filiz et al. 2019; Prigigallo et al. 2019)
sly-miR9474-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.58	-5.17	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)

mtr-miR166b	<i>Medicago truncatula</i>	-1.39	-1.54	-	Programa informático online psRNAtarget (Wei et al. 2014)
stu-miR6024-5p*	<i>Solanum tuberosum</i>	2.71	1.42	Resistencia contra patógenos	
bta-miR-2478*	<i>Bos taurus</i>	1.98	2.56	-	Programa informático online psRNAtarget
gma-miR396e	<i>Glycine max</i>	-2.10	-1.97	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR167b-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.80	-1.72	Estrés abiótico	(Rey-Burusco et al. 2019)
sly-miR9471b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.68	-1.47	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR477-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.94	-	Estrés abiótico	(Filiz et al. 2019; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
bdi-miR7782-3p	<i>Brachypodium distachyon</i>	-1.35	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR167d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.71	1.30	Estrés abiótico y desarrollo	(Zhang et al. 2019)
ptc-miR6478	<i>Populus trichocarpa</i>	1.33	1.77	Estrés abiótico y desarrollo	(He et al. 2015; Zeng et al. 2019; Żywicki et al. 2015)
stu-miR396-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.40	1.00	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR164b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.13	-2.59	Estrés abiótico y desarrollo	(Liu et al. 2017; Yin et al. 2018; Zhao et al. 2017)
osa-miR162b	<i>Oryza sativa</i>	-3.13	-2.82	Estrés abiótico	(Goswami et al. 2017; Li et al. 2015)
stu-miR166d-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.51	2.32	Estrés abiótico	(Deng et al. 2018)
ppe-miR396a	<i>Prunus persica</i>	-2.33	-2.91	Desarrollo	(Farinati et al. 2020)
stu-miR167c-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.62	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR482e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.07	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR156d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.46	-1.33	Estrés abiótico	(Shin et al. 2017)
sly-miR5300	<i>Solanum lycopersicum</i>	0.98	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)

stu-miR7980b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.53	1.66	-	Programa informático online psRNAtarget
ath-miR8175	<i>A. thaliana</i>	1.43	1.86	Estrés abiótico	(Wu et al. 2018; Zeng et al. 2019)
sly-miR6024	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0.92	-1.33	Defensa contra patógenos	(Filiz et al. 2019; Niu et al. 2015; Wei et al. 2014)
bdi-miR845	<i>Brachypodium distacyon</i>	-2.40	-	Multifunción (reparación de DNA y regulación de la transcripción)	(W. Liu et al. 2018)
bdi-miR162	<i>Brachypodium distacyon</i>	-1.89	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9471a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-0.77	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)
mmu-miR-8117*	<i>Mus musculus</i>	1.15	2.32	-	Programa informático online psRNAtarget
zma-miR396g-3p	<i>Zea mays</i>	2.21	-	-	Programa informático online psRNAtarget
osa-miR1873	<i>Oryza sativa</i>	-2.29	-	Defensa contra patógenos	(Zhou et al. 2019)
sly-miR9470-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.13	Defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018)
stu-miR3627-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	3.27	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR403-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-0.93	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR1916	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.38	Estrés abiótico, desarrollo y defensa contra patógenos	(Chen et al. 2019b, 2019a; Feng et al. 2014; Mohorianu et al. 2011; Moxon et al. 2008; Pentimone et al. 2018)
sly-miR164a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.29	Estrés abiótico	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018)
ppt-miR894	<i>Physcomitrella patens</i>	-	1.35	Estrés abiótico y desarrollo	(Kantar et al. 2011; Li et al. 2009; Wei et al. 2009)
osa-miR5072	<i>Oryza sativa</i>	-	2.02	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Dubey et al. 2020; Maeda et al. 2016; Xu et al. 2014)
vvi-miR3630-3p	<i>Vitis vinifera</i>	-	1.94	-	Programa informático online psRNAtarget

* miRNAs con diferencias de expresión entre los grupos PepMV y STV + PepMV (log2FoldChange > 0.56).

Material suplementario 5. Comparativa de los miRNAs con expresión diferencial en plantas coinfectadas con el virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) (grupo CMV + PepMV) con la infección múltiple incluyendo el virus meridional del tomate (STV) (grupo STV + CMV + PepMV). Las funciones de los diferentes miRNAs estaban descritas en la bibliografía o se infirieron empleando el programa informático online psRNAtarget (solo se han tenido en cuenta los genes diana con una identidad del 100% con la secuencia del miRNA).

miRNA	Hospedador	Acumulación		Función	Referencia
		CMV + PepMV	STV + CMV + PepMV		
stu-miR398a-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-2.10	-	Estrés abiótico y protección contra estrés oxidativo	(Qiao et al. 2017; Sarkar et al. 2017; Shin et al. 2017)
stu-miR398a-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-2.98	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019; Travezaño y Patricia, 2016)
sly-miR169e-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-3.64	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR319-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-2.59	-	Desarrollo	(Chaves et al. 2015; Kondhare et al. 2018)
stu-miR393-3p*	<i>Solanum tuberosum</i>	2.18	-3.84	Estrés abiótico y desarrollo	(Ding et al. 2017; Li et al. 2019; Zhang et al. 2020)
sly-miR168a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-3.04	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018)
stu-miR408b-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-6.11	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019)
sly-miR9470-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	5.75	0.57	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Prigigallo et al. 2019; Zhao et al. 2017)
stu-miR8031	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.31	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR403-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.73	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Prigigallo et al. 2019)
stu-miR167b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-2.47	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9475-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.90	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR156e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.03	-	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Kataria y Verma, 2018; M. Liu et al. 2018; Zhao et al. 2017)
gma-miR6300	<i>Glycine max</i>	3.63	-	-	-
sly-miR9474-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-3.72	-	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)

mtr-miR166b	<i>Medicago truncatula</i>	-	1.09	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR6024-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-3.80	Resistencia contra patógenos	(Wei et al. 2014)
bta-miR-2478	<i>Bos taurus</i>	1.84	1.33	-	Programa informático online psRNAtarget
gma-miR396e	<i>Glycine max</i>	-1.63	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR167b-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.78	-	Estrés abiótico	(Rey-Burusco et al. 2019)
mtr-miR172c-5p	<i>Medicago truncatula</i>	-	-2.75	Estrés abiótico	(Long et al. 2020)
sly-miR9471b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.10	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR477-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.24	-	Estrés abiótico	(Filiz et al. 2019; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR6026-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-2.45	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR167d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.41	-	Estrés abiótico y desarrollo	(Zhang et al. 2019)
ptc-miR6478	<i>Populus trichocarpa</i>	-	0.62	Estrés abiótico y desarrollo	(He et al. 2015; Zeng et al. 2019; Żywicki et al. 2015)
stu-miR396-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	0.87	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR7980b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	1.64	-	-	Programa informático online psRNAtarget
ath-miR8175	<i>A. thaliana</i>	1.23	1.09	Estrés abiótico	(Wu et al. 2018; Zeng et al. 2019)
sly-miR6024	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.14	-	Defensa contra patógenos	(Filiz et al. 2019; Niu et al. 2015; Wei et al. 2014)
bdi-miR162	<i>Brachypodium distachyon</i>	-1.94	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9471a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.06	-0.79	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR166c-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.42	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR9470-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.08	Defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018)
sly-miR9473-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.42	Defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018)
stu-miR3627-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	4.06	-	-	Programa informático online psRNAtarget
mdm-miR396a	<i>Malus domestica</i>	-	1.58	Desarrollo	(Farinati et al. 2020)
sly-miR403-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.68	-	Programa informático online psRNAtarget

sly-miR4376	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-1.17	Defensa contra patógenos	(Feng et al. 2014; Pradhan et al. 2015; Tripathi et al. 2018)
ppt-miR894	<i>Physcomitrella patens</i>	1.34	1.16	Estrés abiótico y desarrollo	(Kantar et al. 2011; Li et al. 2009; Wei et al. 2009)
sly-miR9475-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.76	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR4376-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-1.04	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Rey-Burusco et al. 2019; Stare et al. 2019)
sly-miR167b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-0.84	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Feng et al. 2014; Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)

* miRNAs con diferencias de expresión entre los grupos CMV + PepMV y STV + CMV + PepMV (log2FoldChange > 0.56).

Material suplementario 6. Comparativa de los miRNAs con expresión diferencial en plantas infectadas solo con el virus del mosaico del pepino (CMV) y del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) (grupos CMV y PepMV, respectivamente) con la infección de ambos (grupo CMV + PepMV). Las funciones de los diferentes miRNAs estaban descritas en la bibliografía o se infirieron empleando el programa informático online psRNAtarget (solo se han tenido en cuenta los genes diana con una identidad del 100% con la secuencia del miRNA).

miRNA	Hospedador	Acumulación			Función	Referencia
		CMV	PepMV	CMV + PepMV		
stu-miR393-3p*	<i>Solanum tuberosum</i>	5.79	1.47	2.18	Estrés abiótico y desarrollo	(Ding et al. 2017; Li et al. 2019; Zhang et al. 2020)
sly-miR168a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	4.00	-	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018)
stu-miR408b-5p*	<i>Solanum tuberosum</i>	7.03	3.00	-	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019)
sly-miR9470-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	4.57	4.89	5.75	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Prigigallo et al. 2019; Zhao et al. 2017)
stu-miR8031*	<i>Solanum tuberosum</i>	-3.19	-0.97	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR403-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	2.21	-	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Prigigallo et al. 2019)
stu-miR167b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	4.48	-	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9479-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	3.96	2.13	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9475-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.88	-2.01	-2.90	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR169e-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-5.69	-	-3.64	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR156e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.62	-2.55	-2.03	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Kataria y Verma, 2018; M. Liu et al. 2018; Zhao et al. 2017)
gma-miR6300*	<i>Glycine max</i>	3.44	2.78	3.63	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9476-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.65	1.87	-	Estrés abiótico, respuesta contra patógenos, transporte de electrones y señalización celular.	(Filiz et al. 2019; Prigigallo et al. 2019)
sly-miR9474-5p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-4.91	-2.58	-3.72	Estrés abiótico	(Dong et al. 2020; Liu et al. 2017; M. Liu et al. 2018; Pentimone

						et al. 2018; Zhao et al. 2017)
mtr-miR166b*	<i>Medicago truncatula</i>	-2.56	-1.39	-	-	Programa informático online psRNAtarget (Wei et al. 2014)
stu-miR6024-5p*	<i>Solanum tuberosum</i>	4.10	2.71	-	Resistencia contra patógenos	
bta-miR-2478	<i>Bos taurus</i>	1.97	1.98	1.84	-	Programa informático online psRNAtarget
gma-miR396e*	<i>Glycine max</i>	-3.17	-2.10	-1.63	-	Programa informático online psRNAtarget (Yadav et al. 2015)
zma-miR166i-5p	<i>Zea mays</i>	4.19	-	-	Defensa contra patógenos	
sly-miR167b-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-2.04	-1.80	-1.78	Estrés abiótico	(Rey-Burusco et al. 2019)
stu-miR7988	<i>Solanum tuberosum</i>	3.44	-	-	-	Programa informático online psRNAtarget
mtr-miR172c-5p	<i>Medicago truncatula</i>	3.77	-	-	Estrés abiótico	(Long et al. 2020)
sly-miR9471b-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-1.36	-1.68	-1.10	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
sly-miR9476-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	1.32	-	-	Defensa contra patógenos	(Tripathi et al. 2018)
sly-miR477-3p*	<i>Solanum lycopersicum</i>	-3.44	-1.94	-2.24	Estrés abiótico	(Filiz et al. 2019; M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
ath-miR165a-5p	<i>A. thaliana</i>	3.27	-	-	Estrés abiótico	(Yang et al. 2019)
stu-miR6026-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.01	-	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR7983-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.99	-	-	Estrés abiótico y desarrollo	(Kondhare et al. 2018)
stu-miR482e-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.27	-	-	Defensa contra patógenos	(Chi et al. 2015)
stu-miR398a-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	2.98	-	-	Defensa contra patógenos	(Stare et al. 2019; Travezaño y Patricia, 2016)
bdi-miR7782-3p	<i>Brachypodium distachyon</i>	-1.78	-1.35	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9478-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	2.71	-	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
ppe-miR858	<i>Prunus persica</i>	-1.37	-	-	-	Programa informático online psRNAtarget
stu-miR398a-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-1.82	-	-2.10	Estrés abiótico y protección contra estrés oxidativo	(Qiao et al. 2017; Sarkar et al. 2017; Shin et al. 2017)
stu-miR319-3p*	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-1.72	-2.59	Desarrollo	(Chaves et al. 2015; Kondhare et al. 2018)
stu-miR167d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.71	1.41	Estrés abiótico y desarrollo	(Zhang et al. 2019)
ptc-miR6478	<i>Populus trichocarpa</i>	-	1.33	-	Estrés abiótico y desarrollo	(He et al. 2015; Zeng et al. 2019; Żywicki et al. 2015)

stu-miR396-3p*	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.40	0.87	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR164b-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-2.13	-	Estrés abiótico y desarrollo	(Liu et al. 2017; Yin et al. 2018; Zhao et al. 2017)
osa-miR162b	<i>Oryza sativa</i>	-	-3.13	-	Estrés abiótico	(Goswami et al. 2017; Li et al. 2015)
stu-miR166d-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	2.51	-	Estrés abiótico	(Deng et al. 2018)
ppe-miR396a	<i>Prunus persica</i>	-	-2.33	-	Desarrollo	(Farinati et al. 2020)
stu-miR167c-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.62	-	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR482e-5p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	1.07	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Liu et al. 2017; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR156d-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-1.46	-	Estrés abiótico	(Shin et al. 2017)
sly-miR5300	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	0.98	-	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(Pentimone et al. 2018; Tripathi et al. 2018; Zhao et al. 2017)
stu-miR7980b-3p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1.53	1.64	-	Programa informático online psRNAtarget
ath-miR8175	<i>A. thaliana</i>	-	1.43	1.23	Estrés abiótico	(Wu et al. 2018; Zeng et al. 2019)
sly-miR6024	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-0.92	-1.14	Defensa contra patógenos	(Filiz et al. 2019; Niu et al. 2015; Wei et al. 2014)
bdi-miR845	<i>Brachypodium distachyon</i>	-	-2.40	-	Multifunción (reparación de DNA y regulación de la transcripción)	(W. Liu et al. 2018)
bdi-miR162	<i>Brachypodium distachyon</i>	-	-1.89	-1.94	-	Programa informático online psRNAtarget
sly-miR9471a-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-0.77	-1.06	Estrés abiótico y defensa contra patógenos	(M. Liu et al. 2018; Pentimone et al. 2018; Zhao et al. 2017)
mmu-miR-8117	<i>Mus musculus</i>	-	1.15	-	-	Programa informático online psRNAtarget
zma-miR396g-3p	<i>Zea mays</i>	-	2.21	-	-	Programa informático online psRNAtarget
osa-miR1873	<i>Oryza sativa</i>	-	-2.29	-	Defensa contra patógenos	(Zhou et al. 2019)
stu-miR3627-5p	<i>Solanum tuberosum</i>	-	-	4.06	-	Programa informático online psRNAtarget
ppt-miR894	<i>Physcomitrella patens</i>	-	-	1.34	Estrés abiótico y desarrollo	(Kantar et al. 2011; Li et al. 2009; Wei et al. 2009)
sly-miR9475-3p	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	-2.76	-	Programa informático online psRNAtarget

* miRNAs con diferencias de expresión entre los grupos CMV o PepMV y CMV + PepMV (log2FoldChange > 0.56).

Material suplementario 7. Cebadores y sondas utilizados en este trabajo. En **negrita** se señala la secuencia del promotor T7 y en **minúscula y cursiva** la diana de restricción de *BamHI*.

Virus	Nombre	Secuencia (5'- 3')	Posición (nt)	Región genómica	Diseño	Aplicación
STV	F3-CP	GAG ACT CAG AGG AAT GAC ATG	581-602	RpRd / p42	LAMP Designer 1.12 Software	RT-LAMP
STV	B3-CP	CCT CCT TGA CTT GCT TCC	835-852			
STV	FIP-CP	TTG GTT GCG ATC AAG TCC TCC GAG GAG GAG ATC GCT GAT	692-712/ 636-653			
STV	BIP-CP	GAG CCT GTT AGC CGG TAT GTG GGG TTG AAC TGC TGG TAA A	723-749/ 784-796			
STV	LoopF-CP	CGC TTG ACA ATC TTA CGC TG	657-676			
STV	LoopB-CP	TGA GTG ACT ACG AGT TGA ACT G	748-769			
STV	STV_F	TGC CTC CCC AGC TGT CA	1189-1206	RpRd / p42	Primer Express	RT-qPCR
STV	STV_R	TGC GTT GGG ATA GAG GAG TGA	1236-1257			
STV	STV_probe	6FAM-CGC AAC AGA GGT AGA GGC AGA GGC C- TAMRA	1209-1234			
STV	STV_RT7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCA GGG TGC GTT GGG ATA GAG GAG TGA	1236-1257	RpRd / p42	Diseño manual	Retrotranscripción
STV	P42_F STV	GTC AGA TTT CTC GTC GTT GCT T	69-90	RpRd / p42	Diseño manual	Diversidad genética
STV	P42_R STV	CGT GAC CGC GAG AAT GGA ATA G	1289-1311			
STV	STV-F-RT-PCR	CGT TAT CTT AGG CGT CAG CT	993-1012	RdRp / p42	Primer Express	RT-PCR convencional
STV	STV-R-RT-PCR	GGA GTT TGA TTG CAT CAG CG	1413-1432			
STV	STV-BamHI_F	TCC <i>Agg atc</i> CAT GGC TGG TGT C	138-149	RpRd / p42	Diseño manual	Expresión transitoria
STV	STV-BamHI-R	TCG <i>Ggg atc</i> CTC AAC CTC TAT C	1260-1271			
CMV	CMV_F_rtqcr	TGA TTC AGT CAC GGA GTT CGA T	1533-1555	Cp	Primer Express	RT-qPCR
CMV	CMV_R_rtqcr	TCA AAT TTC GGC AAA GGA TTA AC	1587-1610			
CMV	CMV_probe	AAG CTT GTT TCG CGC ATT CAA ATT CG	1559- 1585			
CMV	T7-CMV_R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCA GGG TCA AAT TTC GGC AAA GGA TTA AC	1587-1610	Cp	Diseño manual	Retrotranscripción

CMV	CMV_F	CGC CTC CTC CTC CTC GGA TG	1323-1343	Cp	Primer Express	RT-PCR convencional
CMV	CMV_R	CAT CTC TGC TAT GTT CGC GG	1668-1687			
PepMV	PepMV_F	ACT CCT AGA GCT GAT CTT AC	5126-5145	TGB2	Ling et al. 2007	RT-qPCR
PepMV	PepMV_R	TCA CCT GCA ACT GGT TGA TA	5232-5213			
PepMV	PepMV_probe	TGT CAG CTT GCA TTT ACT TCC AAA A	5180-5204			
PepMV	T7-PepMV_R	TAA TAC GAC TCA CTA TAG TCA GGG TCT CCA GCA ACA GGT TGG TA	5232-5213	TGB2	Diseño manual	Retrotranscripción
PepMV	PepMV_F1	CCA AAG ATG CTG GTG CCA AAG C	5681-5702	TGB3	Primer Express	RT-PCR convencional
PepMV	PepMV_R1	CCA CAG GTA ATT ATA TTA CCA	6248-6268			
ToMV	ToMV_1F	TGC AGC AAA GGT AAT AGT AG	1841-1860	RdRp	Aramburu y Galipienso, 2005	RT-PCR Convencional
ToMV	ToMV_1R	CCG AAC TTT TGA CGA GTT TC	2280-2289			
CaMV	35S	GCC TCT GCC GAC AGT GGT	8559-8576/ 9002-9019	Promotor 35S	Comellas, 2009	RT-PCR convencional. Expresión transitoria
Agrobacterium	TNOS	AAA CAT TTG GCA ATA AAG TT	9279-9298	Terminador- TNOS		

