



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

La modificación N6-metiladenosina (m6A) del RNA como
mecanismo regulador en la biología de los virus RNA de
plantas.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Porcel Jiménez, María Mercedes

Tutor/a: Aparicio Herrero, Frederic

Cotutor/a externo: PALLAS BENET, VICENTE

Director/a Experimental: MARTINEZ PEREZ, MIREYA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Trabajo Final de Máster

La modificación N⁶-metiladenosina (m⁶A) del RNA como mecanismo regulador en la biología de los virus RNA de plantas

María Mercedes Porcel Jiménez

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de plantas

Curso 2021/2022



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Dirigido por: Mireya Martínez Pérez

Frederic Aparicio Herrero

Vicente Pallás Benet

Resumen

La modificación *N*-6-metiladenosina (m^6A) del RNA es la más abundante en mRNAs de eucariotas. Esta modificación está regulada por proteínas que incorporan el grupo metilo (metiltransferasas, conocidas como *escritoras*), proteínas que lo eliminan (desmetilasas, conocidas como *borradoras*) y proteínas que lo reconocen (conocidas como lectoras). La modificación m^6A ejerce su función al ser reconocida por estas proteínas lectoras, que poseen un dominio de unión a m^6A , y mediante la alteración indirecta de la estructura del RNA. En estudios recientes se ha puesto de manifiesto que esta modificación se realiza también sobre virus de RNA y que el estado de metilación del genoma viral repercute en gran medida sobre el ciclo infectivo del virus. Sin embargo, el conocimiento sobre los mecanismos de actuación de la maquinaria de m^6A frente a infecciones virales en plantas son aún muy limitados. Entender la relevancia biológica de esta modificación sobre la patogenicidad, resultaría de gran importancia para permitir el desarrollo de estrategias de control de virus de plantas, dado que estos representan una grave amenaza para la economía y la seguridad alimentaria. Por lo tanto, en este Trabajo Final de Máster se ha pretendido ampliar el estudio de la modificación m^6A en virus de plantas que no se habían analizado antes, como TRV, TCV y TuMV; también se ha comprobado si m^6A es un mecanismo regulador universal y se ha estudiado el papel de las desmetilasas ALKBH9B, ALKBH10B y las proteínas lectoras ECT2/ECT5. Por último, se ha modificado una sección del genoma de AMV, insertando una etiqueta HA, para permitir su posterior detección y la identificación de nuevos factores que participen en la interacción virus-huésped.

Palabras clave: virus de plantas; modificación m^6A del RNA; desmetilasa ALKBH9B; desmetilasa ALKBH10B; lectoras ECT2/ECT3/ECT5; TRV; TCV; TuMV; AMV.

Lista de abreviaturas:

AMV: virus del mosaico de la alfalfa

ECT: REGIÓN C-TERMINAL EVOLUTIVAMENTE CONSERVADA

m^6A : modificación *N*-6-metiladenosina

mRNA: RNA mensajero

ORF: marco abierto de lectura

TCV: virus del arrugamiento del nabo

TRV: virus del cascabeleo del tabaco

TuMV: virus del mosaico del nabo

WT: fenotipo silvestre

Abstract

The *N*-6-methyladenosine (m⁶A) modification of RNA is the most abundant in eukaryotic mRNAs. This modification is regulated by proteins that incorporate the methyl group (methyltransferases, known as writers), proteins that remove it (demethylases, known as erasers) and proteins that recognize it (known as readers). The m⁶A modification exerts its function by being recognized by these reader proteins, which possess an m⁶A-binding domain, and by indirectly altering the RNA structure. Recent studies have shown that this modification is also carried out on RNA viruses and that the methylation status of the viral genome has a major impact on the infectious cycle of the virus. However, knowledge about the mechanisms of action of the m⁶A machinery against viral infections in plants is still very limited. Understanding the biological relevance of this modification on pathogenicity would be of great importance to enable the development of plant virus control strategies, given that plant viruses represent a serious threat to the economy and food security. Therefore, in this Master's thesis we have aimed to extend the study of the m⁶A modification in plant viruses that had not been analyzed before, such as TRV, TCV and TuMV; we have also tested whether m⁶A is a universal regulatory mechanism and we have studied the role of the demethylases ALKBH9B, ALKBH10B and the ECT2/ECT5 reader proteins. Finally, a section of the AMV genome has been modified by inserting an HA tag to allow its subsequent detection and the identification of new factors involved in virus-host interaction.

Keywords: plant viruses; m⁶A RNA modification; ALKBH9B demethylase; ALKBH10B demethylase; ECT2/ECT3/ECT5 readers; TRV; TCV; TuMV; AMV.

List of abbreviations:

AMV: Alfalfa Mosaic Virus

ECT: EVOLUTIONARILY CONSERVED C-TERMINAL REGION

m⁶A: Modification *N*-6-methyladenosine

mRNA: messenger RNA

ORF: Open Reading Frame

TCV: Turnip Crinkle Virus

TRV: Tobacco Rattle Virus

TuMV: Turnip Mosaic Virus

WT: Wild-Type phenotype

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Concepto de virus.....	1
1.2. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV, del inglés <i>Tobacco rattle virus</i>)	1
1.2.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico	1
1.2.2. Transmisión y sintomatología.....	2
1.2.3. Organización del genoma	3
1.3. Virus del mosaico del nabo (TuMV, del inglés <i>Turnip Mosaic Virus</i>).....	4
1.3.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico	4
1.3.2. Transmisión y sintomatología.....	4
1.3.3. Organización del genoma	5
1.4. Virus del arrugamiento del nabo (TCV, del inglés <i>Turnip crinkle virus</i>)	5
1.4.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico	5
1.4.2. Transmisión y sintomatología.....	6
1.4.3. Organización del genoma	6
1.5. Virus del mosaico de la alfalfa (AMV, del inglés <i>Alfalfa Mosaic Virus</i>)	7
1.5.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico	7
1.5.2. Transmisión y sintomatología.....	8
1.5.3. Organización del genoma	8
1.6. Modificaciones en el RNA: N6-metiadenosina (m ⁶ A)	9
1.7. Maquinaria de m ⁶ A	10
1.7.1. Proteínas escritoras	10
1.7.2. Proteínas borradoras	11
1.7.3. Proteínas lectoras	11
1.8. Función de m ⁶ A en infecciones virales	12
2. Objetivos.....	15
3. Materiales y metodología	16
3.1. Siembra de las líneas alkbh9b, alkbh10b y ect2/5 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.2. RT-PCR del mRNA de <i>ALKBH10B</i>	16
3.3. Purificación de viriones.....	17
3.4. Inoculación mecánica	18
3.5. Recogida de las plantas y homogeneización con nitrógeno líquido	18
3.6. Extracción de RNA	18
3.7. Preparación de las sondas para la hibridación molecular	19
3.8. Detección del virus mediante hibridación molecular no radioactiva.....	19

3.9. Inserción del epítipo HA por triplicado en la proteína P2 de AMV en un plásmido binario para agroinfiltración	21
3.9.1. Purificación del producto de PCR del gel de agarosa.....	22
3.9.2. Digestión del plásmido y ligación	23
3.9.3. Transformación, purificación y secuenciación	23
3.9.4. Introducción del casete de expresión en pMOG	24
3.10. Agroinfiltración de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	24
3.11. Detección del epítipo HA insertado en la P2 mediante western blot	24
4. Resultados y discusión	26
4.1. Análisis de la implicación de la desmetilasa de <i>Arabidopsis</i> ALKBH10B en el proceso infeccioso del AMV.....	26
4.2. Estudio de la implicación del mecanismo m ⁶ A en la respuesta antiviral en plantas...	27
4.2.1. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV)	28
4.2.2. Virus del arrugamiento del nabo (TCV)	30
4.2.3. Virus del mosaico del nabo (TuMV).....	32
4.3. Construcción de una versión del genoma del AMV que contiene el epítipo HA en la subunidad de la replicasa viral P2.	33
5. Conclusiones	37
6. Referencias bibliográficas	38
ANEXO I	43
ANEXO II	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Concepto de virus

Se considera que la virología se inició a finales del siglo XIX, cuando los investigadores Ivanoski y Beijerinck identificaron por separado un nuevo agente infeccioso causante de la enfermedad del mosaico del tabaco al que denominaron virus (Lecoq, 2001; Pallas, 2007). Los virus son parásitos biótrofos obligados, es decir, requieren de un organismo vivo para su perpetuación; infectan células vivas y secuestran la maquinaria celular para su propia reproducción. A nivel molecular, los genomas virales están compuestos por moléculas de DNA o RNA que a su vez pueden ser de cadena simple o doble, lineales o circulares, segmentadas y tener polaridad positiva o negativa. Los ácidos nucleicos se encuentran rodeados por una proteína de cubierta o cápside y en algunos virus se observan capas de proteínas adicionales y/o una envoltura lipídica (Hull, 2013).

Los genomas de virus de plantas contienen información sobre tres funciones esenciales en su ciclo infeccioso: la protección, la replicación y la translocación de su genoma. A nivel global los virus son responsables de alrededor del 50% de las enfermedades de las plantas, provocando pérdidas económicas superiores a 30.000 millones de euros (Jones y Naidu, 2019). Por consiguiente, los virus representan una amenaza para la seguridad alimentaria y la conservación de la biodiversidad, problemas que se han agravado por el cambio climático y la forma en que se cultiva. El monocultivo no solo es un riesgo para la pérdida de biodiversidad, sino que también, debido a la nula o escasa variabilidad genotípica entre plantas, aumenta la susceptibilidad a virus y otros patógenos. Además, la globalización agrícola y el comercio internacional también pueden empeorar esta situación si no se toman las medidas de bioseguridad adecuadas. Por lo tanto, es de crucial importancia estudiar las interacciones entre los virus y sus plantas huéspedes para poder combatirlos exitosamente, preservando así la biodiversidad vegetal y la seguridad alimentaria a nivel global.

A continuación, se describen de manera muy esquemática las principales características de los virus que se han utilizado en este trabajo.

1.2. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV, del inglés *Tobacco rattle virus*)

1.2.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico

El TRV fue descubierto en Alemania en 1931 por el científico Böning, aunque la enfermedad que origina en las plantas de tabaco se describió unos años antes, en 1899, por Behrens, y fue finalmente caracterizado por Quajer en 1943 (Xenophontos y Robinson, 1998).

Actualmente, se encuentra distribuido por todos los continentes y presenta una amplia gama de huéspedes, pudiendo infectar a más de 50 familias de monocotiledóneas y dicotiledóneas, en las que se incluyen hasta 400 plantas susceptibles (Otulak *et al.*, 2014). La enfermedad en la que provoca un mayor impacto económico es en la mancha anular corchosa de la patata, dado que causa pérdidas de hasta la mitad de la cosecha recolectada, debido a la inviabilidad comercial por los síntomas en el tubérculo (Hafez y Sundararaj, 2009). Además, los tubérculos no siempre presentan síntomas en la planta, pero pueden mostrarlos al tiempo de la postcosecha, pudiendo afectar a la venta.

1.2.2. Transmisión y sintomatología

El TRV se transmite mediante nemátodos del género *Trichodorus sp* que habitan en el suelo, por lo que en algunos casos la infección se encuentra limitada a las raíces y/o tubérculos. Las malas hierbas representan un reservorio para el virus dado que también pueden dispersarlo con sus semillas. Asimismo, tanto el material vegetal infectado como las herramientas de poda pueden ayudar a su propagación, por lo que es necesario emplear prácticas sanitarias estrictas al trabajar con plantas susceptibles a TRV.

La sintomatología característica de TRV consiste en manchas cloróticas amarillas o marrones, arcos necróticos, moteado del tallo, distorsión de las hojas y necrosis de las venas (Locatelli *et al.*, 1978). Por el contrario, en la patata no suelen aparecer síntomas en las hojas, sino un moteado severo en los tallos. Como se ha comentado previamente, en este cultivo la infección por TRV da lugar a la enfermedad de la mancha anular corchosa, caracterizada por profundos arcos necróticos en el tubérculo (Fig. 1).

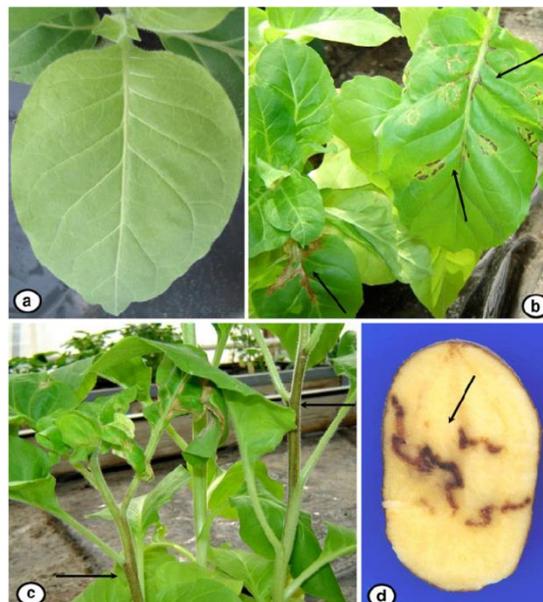


Figura 1. Síntomas característicos de TRV en distintos cultivos. A) Control de *Nicotiana benthamiana*. B y C) Plantas de *N. benthamiana* infectadas por TRV. D) Síntomas de la mancha anular

corchosa de la patata causados por el TRV. Se observan los arcos necróticos en la patata. Fuente: Garbaczewska *et al.* (2012).

1.2.3. Organización del genoma

El TRV pertenece a la familia *Virgaviridae* (género tobnavirus) y posee un genoma bipartito de RNA de cadena simple y sentido positivo, que se encapsida individualmente en partículas cilíndricas (Fig. 2). Los viriones varían en tamaño: partículas largas (L) de 180-197 nm y partículas cortas (S) de 55-114 nm (Harrison y Nixon, 1959). El RNA 1 (partícula L) tiene un tamaño de 6,8 Kb, mientras que el RNA 2 (partícula S) puede variar entre 1,8-4,5 Kb (Fig. 2) (Adams *et al.*, 2011). Ambos segmentos de RNA presentan la caperuza en el extremo 5' y una estructura tipo tRNA en el 3', la cual puede ser adenilada pero no aminocilada (Adams *et al.*, 2011). El RNA 1 codifica las dos subunidades que conforman la replicasa viral en las que la proteína de 194 kDa contiene un motivo helicasa y uno de unión a nucleótidos, una proteína de movimiento de 29 kDa (p1a) una proteína de 16 kDa que participa en la supresión del silenciamiento (p1b) El RNA 2 contiene 3 ORFs que codifican: la proteína de la cubierta (CP) y dos proteínas de transmisión al nemátodo (P2b, P2c) (Fig. 2) (Otulak *et al.*, 2014).

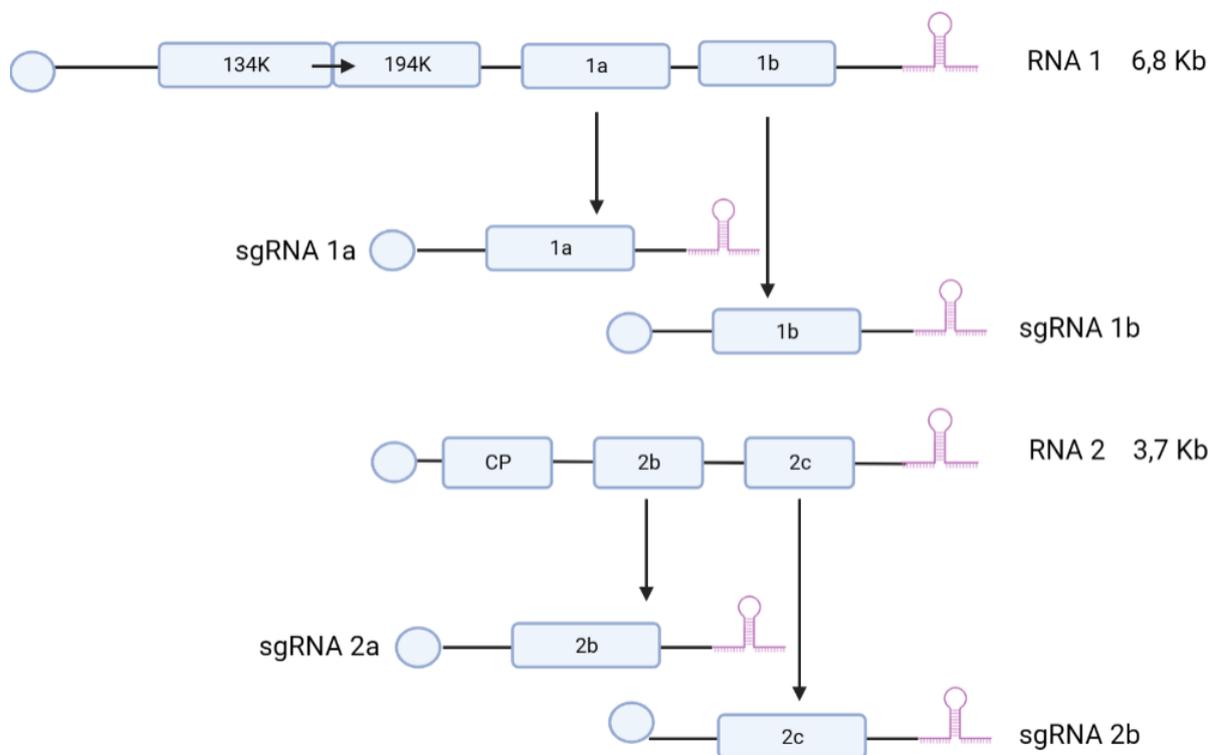


Figura 2. Representación esquemática del genoma bipartito del TRV (RNA 1 y RNA 2). Las dos ORFs 5'-proximales en el RNA 1 se traducen directamente para producir los componentes virales del complejo replicasa p134 y p194. La proteína p194 se traduce mediante el denominado mecanismo de eliminación de la terminación (del inglés suppression of termination or stop codon readthrough). La CP se traduce directamente del RNA 2 mientras que el resto de proteínas virales se traducen desde RNAs subgenomicos tal y como muestra la figura. El primer círculo representa la caperuza en 5' y el bucle en 3' representa una estructura UTR similar al tRNA.

1.3. Virus del mosaico del nabo (TuMV, del inglés *Turnip Mosaic Virus*)

1.3.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico

El TuMV pertenece a la familia *Potyviridae* (género *potyvirus*) y fue descrito en 1921 en USA, en plantas de *Brassica olearacea* (Schultz, 1921). Está distribuido a nivel mundial, y se ha identificado incluso en Islandia (Kegler *et al.*, 1998). Es el potyvirus con el mayor número de huéspedes. Puede infectar alrededor de 318 especies en 156 géneros de 43 familias diferentes (Kawakubo *et al.*, 2021). Las mayores pérdidas económicas causadas por TuMV son en colza (*Brassica napus*), nabo (*B. rapa*), col (*B. oleracea var. Capitata*), coliflor (*B. oleracea var. Botrytis*) y berza (*B. oleracea var. Viridis*), y distintas zonas de Asia, Europa y América del sur son las más afectadas (Walsh y Jenner, 2002).

1.3.2. Transmisión y sintomatología

El TuMV se transmite principalmente de manera no persistente por áfidos de la especie *Myzus persicae* y *Brevicoryne brassicae*, aunque se han descrito hasta 50 especies capaces de transmitirlo (Sylvester, 1953). La transmisión por semilla es dependiente del huésped y en las especies del género *Brassica* puede llegar a alcanzar una frecuencia de transmisión del 40% (Zubareva *et al.*, 2013). Los síntomas más característicos incluyen moteado clorótico, aclaramiento de las venas, mosaico, necrosis, distorsión de la hoja, retraso en el crecimiento y, en algunos casos, muerte de la planta (Fig. 3) (Nellist *et al.*, 2022).

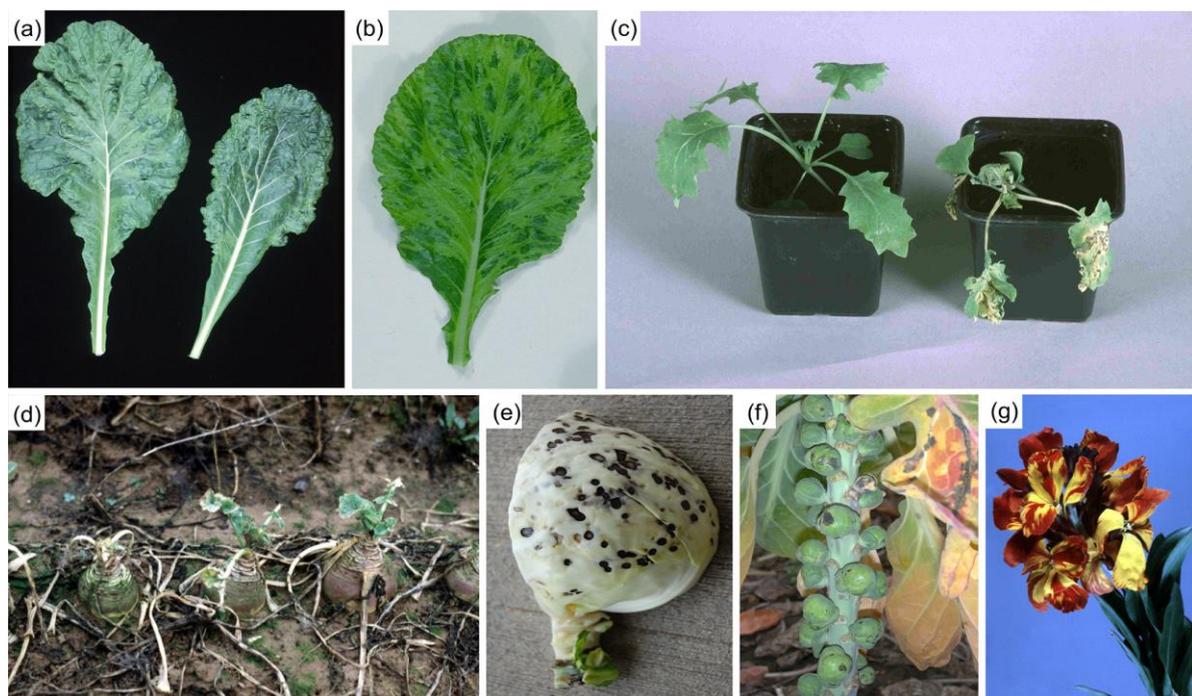


Figura 3. Síntomas característicos del TuMV en distintos cultivos. (a) Síntomas de distorsión foliar y de mosaico (b) en *Brassica rapa ssp. perviridis*. (c) Síntomas de necrosis grave en *Brassica napus* (derecha); planta control no inoculada (izquierda). (d) Muerte de la planta en *B. napus*. (e) Manchas necróticas internas en *Brassica oleracea*. (f) Manchas necróticas en botones de *B. oleracea* (col de Bruselas). (g) Síntomas de rotura de flores en *Erysimum sp.* Fuente: Nellist *et al.*, (2022).

1.3.3. Organización del genoma

El TuMV consiste en una molécula de RNA de simple cadena y polaridad positiva de 9.8 Kb (Sánchez *et al.*, 1998) que contiene una sola pauta de lectura abierta (ORF, del inglés Open Reading Frame) flanqueada por dos regiones no traducibles (UTR) en los extremos 5' y 3' (5'UTR y 3'UTR). La ORF se traduce en una poliproteína procesada por proteasas del virus. El extremo 5' presenta una proteína viral (VPg) unida covalentemente y el extremo 3' contiene una cola de poli A de longitud variable. La poliproteína es procesada en P1 (proteína 1), HC-Pro (helper-component protein), P3 (proteína 3), 6K1 (6kDa puede unirse a P3), CI (inclusión citoplasmática cilíndrica), 6K2, VPg (*virus-encoded genome linked protein*), NIa-Pro (proteína de inclusión nuclear que puede unirse a VPg), NIb (proteína de inclusión nuclear b) y CP (Walsh y Jenner, 2002; Figura 4). Los viriones son helicoidales y flexibles, de 135 Å de ancho y 720 nm de largo (Nellist *et al.*, 2022).

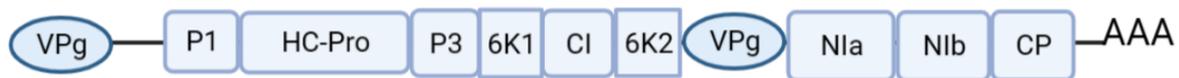


Figura 4. Representación esquemática del genoma del TuMV. El virus presenta una sola ORF que codifica una poliproteína. Se muestra la cola poli A en el extremo 3' y la proteína VPg en el extremo 5'.

1.4. Virus del arrugamiento del nabo (TCV, del inglés *Turnip crinkle virus*)

1.4.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico

El TCV pertenece a la familia *Tombusviridae*, (género *Betacarmovirus*). Fue inicialmente aislado de la planta *Brassica campestris*, a la cual le debe su nombre por los síntomas que presentaba (Carrington *et al.*, 1989). Actualmente, este virus solo se ha detectado en Europa, concretamente en Yugoslavia, Alemania y el Reino Unido (Gaafar *et al.*, 2019). En cuanto al impacto económico, en un experimento realizado en plantas de nabo y remolacha control e infestadas, no se obtuvieron pérdidas significativas en la cosecha, por lo tanto, debido a su bajo potencial de daño en los cultivos, TCV no supone un riesgo fitosanitario ni económico (Lister, 1958).

1.4.2. Transmisión y sintomatología

El TCV puede ser transmitido por nueve especies de escarabajos *Phyllotreta spp.* y dos especies de *Psylloids spp.* de manera no persistente (Sastry *et al.*, 2019). Adicionalmente, puede ser transmitido por la savia y el contacto entre tejidos de las plantas infectadas, como injertos o utilización de material de campo o poda infectado con TCV. Los síntomas se caracterizan por el arrugamiento de las hojas y la aparición de manchas amarillas y quebradizas (Fig. 5). Con el tiempo los parches amarillos se vuelven necróticos y el crecimiento de la planta se paraliza (Verma y Varma, 1959). Los huéspedes principales de TCV son el nabo y otros tipos de *Brassica rapa*.



Figura 5. Síntomas de TCV en plantas de nabo. A la izquierda un control sin infectar. Fuente: Blake *et al.* (2007).

1.4.3. Organización del genoma

El genoma del TCV consiste en una molécula de RNA de cadena simple y polaridad positiva de 4 Kb que codifica cinco proteínas: p28 y p88 (replicación), p8 y p9 (movimiento) y CP (Navarro y Pallas, 2017). Las tres últimas son sintetizadas desde dos RNAs subgenómicos (sgRNAs). El genoma viral presenta una región 3' UTR de tipo horquilla (Fig. 6) (Simon, 2015). Los viriones de TCV son isométricos, de alrededor de 30 nm de diámetro y muestran una simetría icosaédrica $T = 3$ (Li y Simon 1990).

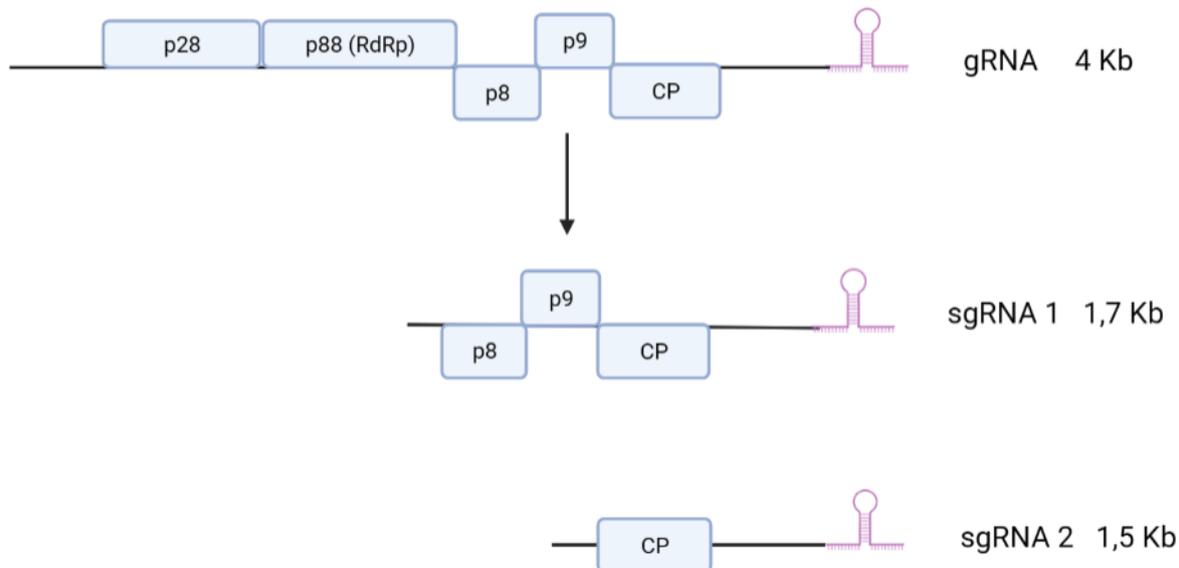


Figura 6. Representación esquemática del genoma del TCV. Las dos ORFs 5'-proximales se traducen directamente para producir los componentes virales del complejo replicasa p28 y P88. La proteína p88 se traduce mediante el denominado mecanismo de eliminación de la terminación (del inglés suppression of termination or stop codon readthrough). Las proteínas p8, p9 y CP se traducen a partir de los RNAs subgenómicos sgRNA 1 y sgRNA2.

1.5. Virus del mosaico de la alfalfa (AMV, del inglés *Alfalfa Mosaic Virus*)

1.5.1. Origen, distribución geográfica e impacto económico

El AMV es el único miembro del género Alfamovirus, el cual pertenece a la familia *Bromoviridae* (Bujarski *et al.*, 2019). Se descubrió en un cultivo de alfalfa (*Medicago Sativa*) en Estados Unidos en 1931 y es el virus que más afecta a dicho cultivo (Weimer, 1931). Actualmente, este patógeno afecta a la producción global de alfalfa, encontrándose distribuido por Europa, América y Oceanía. Su amplia dispersión se debe a la distribución inicial de plantas de alfalfa infectadas con el virus (Escriu *et al.*, 2011). Cabe destacar que España es el segundo mayor productor de alfalfa del mundo, por detrás de Estados Unidos, y exporta más de la mitad de su campaña, por lo que es de gran importancia la calidad del producto para mantener la exitosa exportación.

Además de a alfalfa, este virus infecta a más de 600 especies pertenecientes a 70 familias (Bol, 2008). Los cultivos en los que la infección por AMV causa un mayor impacto económico son *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum* y *Lens culinaris*.

1.5.2. Transmisión y sintomatología

El AMV puede ser transmitido mediante semillas y polen, por inoculación mecánica, al podar o realizar injertos con material infectado, y de manera no persistente por al menos 14 especies de áfidos (Moreno y Fereres, 2012).

El síntoma más característico ocasionado por AMV es la aparición en las hojas de un mosaico amarillo, que, en algunos casos, se acompaña de enanismo, malformaciones, arrugamiento y necrosis (Fig. 7). En *Medicago Sativa*, además de estos síntomas, afecta a la formación de nódulos en las raíces y, por ende, a la fijación de nitrógeno, reduciendo considerablemente la síntesis de proteínas y la productividad de la planta (Escriu *et al.*, 2011). Adicionalmente, la infección por AMV incrementa la susceptibilidad de las plantas frente a otros tipos de estreses bióticos y abióticos.



Figura 7. Síntomas de AMV en distintos cultivos. Mosaico amarillo en alfalfa (A), pimiento (B), patata (C) y manchas necróticas en tomate. Fuente: Goldberg (2012).

1.5.3. Organización del genoma

El AMV presenta un genoma tripartito de RNA de simple cadena y polaridad positiva que contiene una estructura CAP en el extremo 5' y carece de cola poli A en el extremo 3' (Fig. 8). En su lugar, esta región 3'UTR puede adoptar dos conformaciones mutuamente excluyentes que actuarían como un interruptor del inicio de la traducción o de la replicación (Pallas *et al.*, 2013; Aparicio *et al.*, 2003). El RNA 1 es de 3,6 Kb y codifica la proteína P1 que contiene un dominio metiltransferasa en el extremo N-terminal y un dominio helicasa en el C-terminal. El RNA 2 (2,6 Kb) codifica la proteína P2 que contiene un dominio polimerasa. Ambas proteínas, P1 y P2, forman la RNA polimerasa. El RNA 3 (2,1 Kb) es bicistrónico y codifica la proteína de movimiento (MP) y la CP, aunque esta última se expresa mediante un RNA subgenómico, sgRNA 4, de 0,88 Kb (Figura 8; Bol, 2008). Los RNAs virales se encapsidan por separado en partículas baciliformes que presentan un diámetro constante de 18 nm y una longitud variable de entre 30-56 nm, dependiendo de la molécula encapsidada (Makkouk *et al.*, 2012).

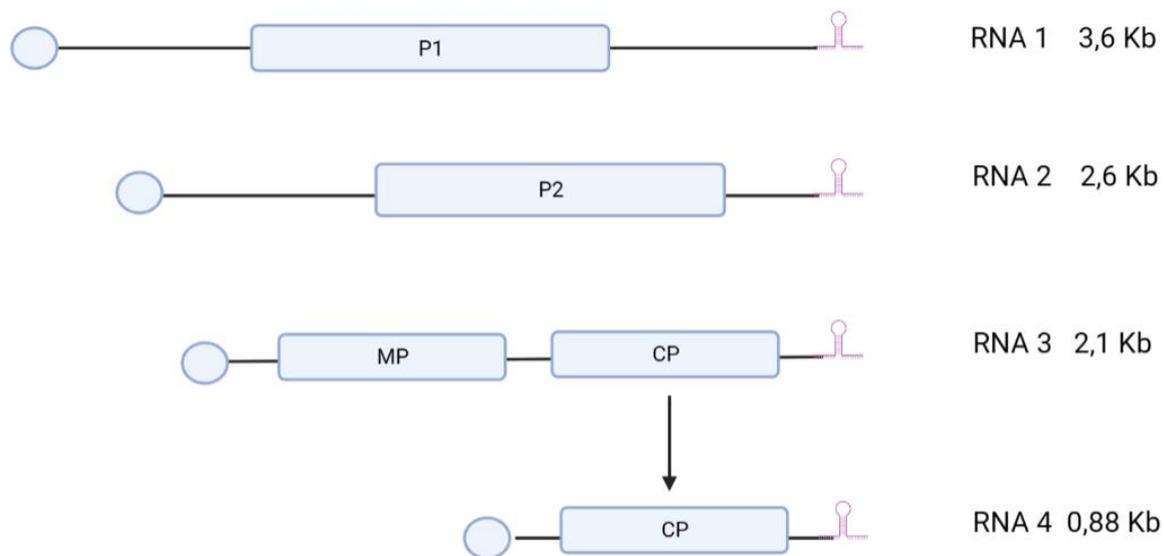


Figura 8. Representación esquemática del genoma del AMV mostrando los tres RNAs genómicos (RNA1 RNA 2 y RNA 3) y el RNA subgenómico (RNA 4) desde el que se traduce la CP (RNA). Los círculos en el extremo 5' representan la estructura CAP.

1.6. Modificaciones en el RNA: *N*6-metiladenosina (m^6A)

El RNA es la molécula encargada de transmitir toda la información a partir del DNA, por lo que su regulación y correcto funcionamiento es esencial para la supervivencia celular. Hasta ahora se han descrito alrededor de 163 modificaciones post transcripcionales (Boccaletto *et al.*, 2018). La metilación del nitrógeno en la posición 6 de la adenina (m^6A) representa una de las modificaciones del RNA predominantes en eucariotas, encontrándose en rRNAs (RNA ribosómico), mRNAs (RNA mensajero), tRNAs (RNA de transferencia), miRNAs (microRNAs) y lncRNAs (long non coding RNAs) (Duan *et al.*, 2019).

La primera descripción de m^6A en RNAs en mamíferos se remonta a 1974. Poco después se describió en RNAs de origen viral y, en 1981, en la planta del maíz (Desrosiers *et al.*, 1974; Krug *et al.*, 1975; Nichols y Welder, 1981). Es una modificación selectiva y altamente conservada, que está enriquecida en la región 3'UTR y cuya secuencia consenso de metilación es DRACH (D=A/G/U; R=A/G; H=U>A>C) (Shen *et al.*, 2016; Arribas-Hernández *et al.*, 2020a; Li *et al.*, 2022). No obstante, no todas las adenosinas en un contexto DRACH se encuentran metiladas, dado que el nivel de m^6A en el RNA de una célula es muy inferior al número de repeticiones de la secuencia consenso, por lo que los mecanismos exactos que regulan la metilación aún están por dilucidar totalmente (Liu *et al.*, 2015). En animales la prevalencia de m^6A en el mRNA es de 1 a 3 residuos por molécula, y en Arabidopsis de 0,7 a 1, mientras que en algunos virus se ha observado una frecuencia de 1 a 15 residuos de m^6A por molécula (Zhao *et al.*, 2017; Linder *et al.*, 2015).

A nivel molecular, m⁶A regula varias facetas del procesamiento de mRNAs, en las que se incluyen el corte y empalme alternativo, el procesado de 3' UTR, la estructura y estabilidad, la exportación y la traducción. Además, se ha visto que es importante en el proceso de maduración de los micro RNAs (miRNAs) (Fig. 9), Yue *et al.*, 2022).

En mamíferos y en levaduras los genes que se encuentran enriquecidos en m⁶A están involucrados en el desarrollo y en respuestas a cambios en la homeostasis, mientras que los genes constitutivos apenas se encuentran metilados (Ke *et al.*, 2017). Por el contrario, en *Arabidopsis* muchos mRNA que contienen m⁶A codifican proteínas ribosómicas y relacionadas con la fotosíntesis, factores de transporte de electrones mitocondriales y otras enzimas metabólicas básicas (Luo *et al.*, 2014; revisado en Arribas-Hernandez y Brodersen, 2020a; Anderson *et al.*, 2018).

En plantas, m⁶A es esencial para el desarrollo embrionario y afecta a la tasa de crecimiento, de modo que la desregulación de esta metilación causa severas alteraciones en el desarrollo de las hojas y raíces, además de cambios en el tiempo del desarrollo reproductivo (Reichel *et al.*, 2019; Arribas-Hernández *et al.*, 2020b). Asimismo, este mecanismo es crítico en las respuestas al estrés, tanto abiótico como biótico (Zhou *et al.*, 2022; Amara *et al.*, 2022; Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2021a).

1.7. Maquinaria de m⁶A

El descubrimiento de las desmetilasas m⁶A sugería que esta modificación era reversible y, quizás, dinámica. Desde entonces, se han descubierto una serie de proteínas involucradas en esta ruta de metilación: proteínas escritoras, borradoras y lectoras (Fig. 9).

1.7.1. Proteínas escritoras

El complejo de metiltransferasas dependiente de S-adenosil-L-metionina está altamente conservado en eucariotas (Meyer y Jaffrey, 2017). En animales la maquinaria de metilación está formada por la enzima catalítica *Methyltransferase-Like* (METTL3), el activador alostérico METTL14, y algunos factores que asisten a la metilación, como *Wilms' Tumor-Associating Protein* (WTAP) (Ping *et al.*, 2014), la proteína *Vir-like m⁶A methyltransferase associated protein* (VIRMA), la proteína E3 ubiquitina ligasa CBLL1 o HAKAI (Yue *et al.*, 2018), la proteína 15 con motivo de unión al RNA (RBM15) y la proteína 13 de dedos de zinc con dominio CCCH (ZC3H13) (Patil *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2018).

En plantas se han descubierto varias de las proteínas homólogas a las de mamíferos: MTA (Metiltransferasa A, homóloga de METTL3), MTB (homóloga de METTL14), FIP37 (FKBP12 INTERACTING PROTEIN, homóloga de WTAP), VIRILIZER, HAKAI (E3 ubiquitina ligasa) y

HAKAI-INTERACTING Zn-FINGER2 (HIZ2) (Zhong *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2016; Růžička *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2022) (Fig. 9).

1.7.2. Proteínas borradoras

Las proteínas borradoras descritas hasta la fecha son homólogas de la proteína Alkylation B (AlkB) de *Escherichia coli* y forman parte de la familia de 2-oxoglutarato y oxigenasas dependientes de Fe (II) (Aravind & Koonin, 2001). Estas proteínas eliminan grupos alquilo de los ácidos nucleicos como m⁶A o 5-metilcitosina (m⁵C) y pueden tener preferencia por RNA, DNA y/o proteínas (Fedele *et al.*, 2015). En mamíferos hay 9 proteínas homólogas de AlkB descritas, ALKBH1-8 y Fat mass and obesity associated protein (FTO), aunque solo en dos de ellas se ha detectado actividad desmetilasa, en ALKBH5 y en FTO (Zheng *et al.*, 2013). En el genoma de *Arabidopsis* se han descubierto 14 proteínas de la familia AlkB y se ha estudiado la localización subcelular de 13 de ellas (Kawai *et al.*, 2014; Mielecki *et al.*, 2012). Sin embargo, solo dos de ellas se han descrito como desmetilasas m⁶A, ALKBH9B Y ALKBH10B (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; Duan *et al.*, 2017); y evidencias recientes sugieren también esta actividad en la proteína ALKBH9C (Amara *et al.*, 2022) (Fig. 9). ALKBH9B se localiza en el citoplasma y se acumula en gránulos citoplasmáticos que colocalizan con cuerpos de pequeños RNA de interferencia y se asocian con cuerpos de procesamiento de RNAs (p-bodies), lo que sugiere que su actividad podría estar implicada en procesos de silenciamiento o degradación de RNAs (Martínez-Pérez *et al.*, 2017). A diferencia del mutante *knockout alkbh9b*, *alkbh10b* presenta niveles superiores de m⁶A en mRNAs, los cuales se han asociado a una menor estabilidad de los transcritos. Como consecuencia, a nivel fisiológico, *alkbh10b* se caracteriza por un retraso en la floración y una reducción del crecimiento vegetativo (Duan *et al.*, 2017).

En tomate se ha descubierto una demetilasa SlALKBH2 que se localiza en el retículo endoplasmático y que participa en la maduración del fruto (Zhou *et al.*, 2019).

1.7.3. Proteínas lectoras

Los residuos de m⁶A son detectados por proteínas lectoras para mediar distintos efectos regulatorios post transcripcionales. Las proteínas lectoras mejor caracterizadas en eucariotas poseen un dominio YTH521-B (YTH) y se clasifican en 2 clases: las denominadas YTHDC, que se localizan en el núcleo, y las YTHDF, localizadas en el citoplasma. El dominio YTH es responsable de la especificidad de unión a m⁶A mediante un bolsillo hidrofóbico de aminoácidos aromáticos (Scutenaire *et al.*, 2018; Arribas-Hernández *et al.*, 2018). En mamíferos hay 5 proteínas descritas con el dominio YTH: YTHDC1-2 y YTHDF1-3 (Park *et al.*, 2019), mientras que el genoma de *Arabidopsis* contiene 13 proteínas con el dominio YTH: EVOLUTIONARILY CONSERVED C-TERMINAL REGION (ECT) 1-11 (grupo DF),

AT4G11970 y CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR 30 (CPSF30). Las dos últimas pertenecen al grupo DC (Arribas-Hernández *et al.*, 2018) (Fig. 9). En *Arabidopsis*, ECT2, ECT3 y ECT4 poseen funciones parcialmente redundantes sobre el control del desarrollo y la morfogénesis de la hoja (Arribas-Hernández *et al.*, 2018; 2020). Estas proteínas son citoplasmáticas, pero, bajo ciertos estreses, forman gránulos, que en el caso de ECT2 se han identificado como gránulos de estrés (SGs) (Scutenaire *et al.*, 2017; Arribas-Hernández *et al.*, 2018).

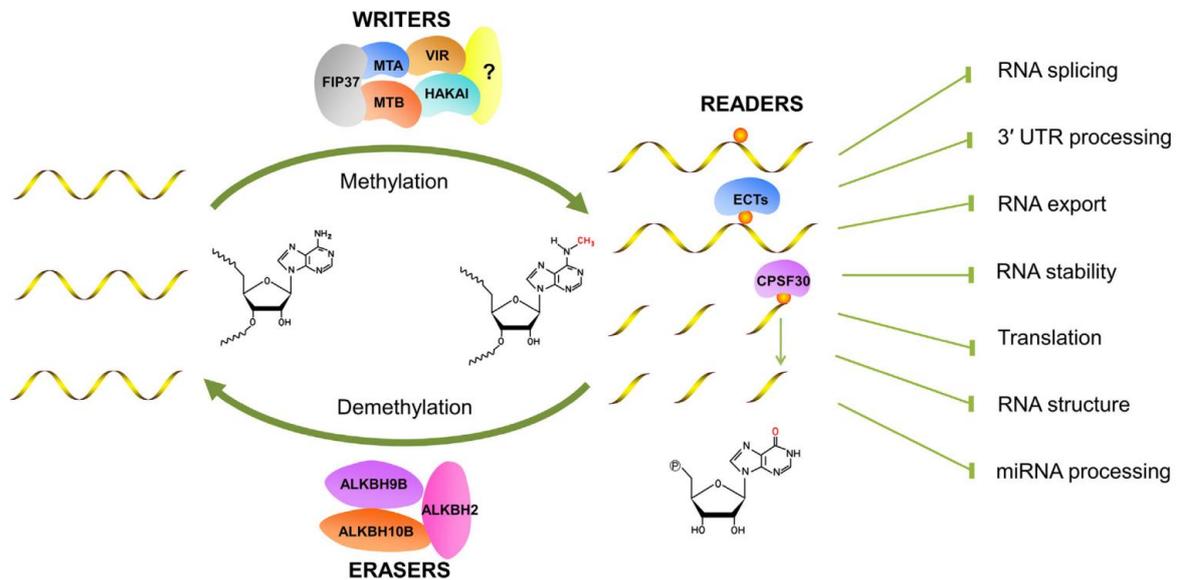


Figura 9. Esquema de la maquinaria principal de m⁶A en plantas y de los posibles efectos de la modificación sobre el destino de los RNAs. Fuente: Zheng *et al.* (2020).

1.8. Función de m⁶A en infecciones virales

La modificación m⁶A fue descubierta en 1975 en el genoma del virus simio 40 (SV40), y desde entonces se ha descubierto en el RNA viral (vRNA) de virus de mamíferos y de plantas (Dang *et al.*, 2019; Yue *et al.*, 2022). Además, se han descrito interacciones entre la maquinaria de m⁶A y los virus que resultan ser pro-virales o antivirales en función del binomio virus/huésped estudiado, de la localización de la modificación y/o de la fase del ciclo infectivo. Por ejemplo, en el virus influenza tipo A, la inhibición de METTL3 dio lugar a una reducción en la acumulación de los vRNAs, mientras que la sobreexpresión de YTHDF2 produjo un aumento (Courtney *et al.*, 2017). En SV40, m⁶A promueve la expresión de la proteína de la cápside, favoreciendo la replicación del virus (Tsai *et al.*, 2018). En el enterovirus 71 se ha observado que la polimerasa viral interacciona con METTL3 promoviendo la replicación del vRNA (Hao *et al.*, 2019). Sin embargo, en otros virus la presencia de m⁶A produce el efecto contrario. Así, la reducción de METTL3 y METTL14 o de proteínas lectoras da lugar a un aumento en la producción de vRNAs del virus de la hepatitis C y del virus de zika, (Gokhale *et al.*, 2016; Lichinchi *et al.*, 2016b). En el virus de la hepatitis B, la presencia de m⁶A incrementa el número

de transcritos en la región 5' UTR, mientras que desestabiliza los vRNAs en la región 3' UTR (Imam *et al.*, 2018). Los autores del estudio sugirieron que tal desestabilización se debe a la acción de las proteínas lectoras, dado que en el mutante sin YTH se observó un aumento en la expresión de proteínas.

Desafortunadamente, en virus de plantas se han descrito menos interacciones entre la modificación m⁶A y las infecciones virales. Actualmente los mecanismos exactos de este tipo de regulación durante una infección vírica están por resolver, pero existen algunos datos experimentales que podrían ayudar a esclarecerlos. En plantas de sandía y tabaco, los niveles de m⁶A en los RNAs del huésped se reducen bajo la infección por CGMMV (virus del mosaico verde jaspeado del pepino) y TMV (virus del mosaico del tabaco), respectivamente (Li *et al.*, 2018; He *et al.*, 2021). Por el contrario, en arroz, los niveles de m⁶A aumentan en respuesta al virus del enanismo rayado negro del arroz (RBSDV) y al virus de la raya del arroz (RSV) (Zhang *et al.*, 2021b). En un análisis del transcriptoma m⁶A de dos variedades de trigo resistentes y susceptibles al virus del mosaico amarillo del trigo (WYMV), se observaron niveles de m⁶A significativamente diferentes en los transcritos de genes relacionados con la defensa de la planta (Zhang *et al.*, 2021c).

Por otro lado, se han descubierto dominios ALKB en 22 virus de (+) ssRNA (RNA de cadena simple), lo que apunta a un posible mecanismo de defensa ejecutado por el virus (Kondo *et al.*, 2013; van den Born *et al.*, 2008; McGaving *et al.*, 2010). Estudios del dominio ALKB en virus han determinado funciones como reparación del daño causado por la metilación, mantenimiento de la estabilidad y protección frente a RNAs dañinos (Yue *et al.*, 2022). Por ejemplo, se ha identificado un dominio AlkB en el ORF de genes de la replicasa, que *in vitro* eran capaces de eliminar m¹A y m³C del RNA (van der Born *et al.*, 2008).

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se observó que el RNA del AMV se metila durante la infección en *Arabidopsis*. Además, los niveles de m⁶A en los RNAs de este virus están regulados por la desmetilasa ALKBH9B, puesto que son mayores en mutantes *alkbh9b*, donde la carga viral sistémica es menor y el movimiento vascular del virus está prácticamente bloqueado (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; Martínez-Pérez *et al.*, 2021). De la misma forma, en los virus de la Sharka (PPV) y en el virus Y de la patata (PVY), la regulación a la baja de *NbALKB1* y *NbALKB2* en *Nicotiana benthamiana* dio lugar a una reducción en los niveles de vRNAs (Yue *et al.*, 2022). En la misma línea, la reducción en los niveles de ECT2 junto a ECT3 o ECT5 da lugar a un aumento de la acumulación del AMV a nivel sistémico (Martínez-Pérez *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que m⁶A puede ser una estrategia de la planta para regular a los virus de RNA que se replican en el citoplasma. No obstante, es necesario llevar a cabo nuevos estudios sobre la presencia de residuos m⁶A en los RNAs de otros virus y su implicación en las infecciones virales de plantas para saber si se

trata de un mecanismo antiviral generalizado o, por el contrario, es una estrategia específica de AMV. La hipótesis más aceptada es una doble interacción específica entre el virus y la maquinaria m^6A de la planta (Figura 10). Por un lado, la planta emplearía el sistema m^6A como un mecanismo de defensa frente a RNAs foráneos para así evitar la invasión del virus (Yue *et al.*, 2020). La modificación m^6A sobre el vRNA podría inhibir su replicación, afectar a la traducción, a la estabilidad y la encapsidación. Por otro lado, el vRNA podría desencadenar un desequilibrio en el estado de metilación m^6A de la propia planta, alterando la regulación de la expresión de los genes del huésped. Como consecuencia, ciertos genes relacionados con la defensa de la planta, entre otros, podrían verse afectados, suponiendo una ventaja para el virus e influyendo considerablemente en la infección viral. Sin embargo, los mecanismos moleculares que rigen estas interacciones virus-huésped mediada por m^6A son todavía desconocidos.

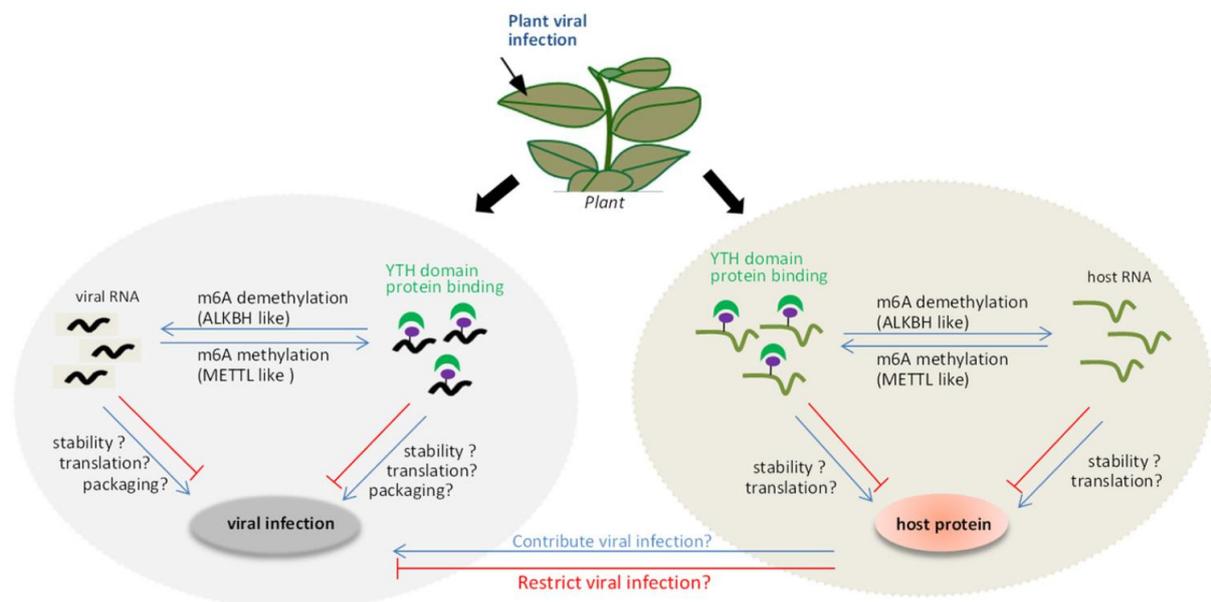


Figura 10. Esquema de la regulación de m^6A inducida por virus. Fuente: Yue *et al.* (2022).

2. OBJETIVOS

En trabajos previos realizados en el laboratorio se determinó que algunas proteínas involucradas en el mecanismo de regulación de mRNAs conocido como m⁶A desempeñan un papel regulador en el ciclo infectivo del AMV en Arabidopsis. En el presente TFM, por un lado, se analiza la posible función de otros factores del mecanismo m⁶A en la infección por AMV, y, por otro, se estudia cómo de general es este mecanismo como respuesta antiviral en plantas. Para ello se han abordado los siguientes subobjetivos:

- 1- Análisis de la implicación de la desmetilasa ALKBH10B en el proceso infectivo del AMV en Arabidopsis.
- 2- Estudio de la implicación del mecanismo m⁶A en la respuesta antiviral en plantas, en concreto frente a los virus TRV, TCV y TuMV.
- 3- Construcción de una versión del genoma del AMV que contiene el epítipo HA en la subunidad de la replicasa viral P2 como posible futura herramienta en la identificación de nuevos factores implicados en la modificación m⁶A.

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. Siembra de las líneas *alkbh9b*, *alkbh10b* y *ect2/5* de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* columbia-0 (col-0) silvestres y transgénicas se sembraron en una mezcla de turba/vermiculita/perlita en macetas de 6 cm de diámetro en cámaras de crecimiento con un fotoperiodo de 25°C-16 h luz/20°C-8 h oscuridad. Los mutantes *alkbh9b* y *ect2/ect5* (*ect2-1/ect5-2* y *ect2-1/ect5-3*) fueron descritos en trabajos previos (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2022).

3.2. RT-PCR del mRNA de *ALKBH10B*

La RT-PCR para amplificar el mRNA de *ALKBH10B* se realizó utilizando cebadores específicos del inicio y fin de la ORF (TCC CTC TCA TCA CCA ACA AAG y ATG CCA TAG CCA TGA AGA TTG) mediante el el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen). La mezcla de los reactivos se muestra en la tabla 1. Las condiciones de la RT-PCR se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1. Reactivos de la RT-PCR: SuperScript™, One-Step RT-PCR Kit.

Mix 2X	2,5 µl
Inhibidor de RNAasas	0,05 µl
Oligonucleótidos sentido y antisentido	0,125 µl
Taq High Fidelity DNA Polymerase	0,25 µl
RNA	0,4 µl
PVP	0,5 µl
H ₂ O	Hasta 5 µl

Tabla 2. Condiciones de las RT-PCRs para comprobar los mutantes *alkbh10b* de *Arabidopsis*.

	T°C	Tiempo	Nº de ciclos
Retrotranscripción	50	30'	1
Desnaturalización	94	2'	1
Desnaturalización	94	15''	
Anillamiento	52	30''	40
Amplificación	68	1,5'	
Extensión final	68	5'	1

3.3. Purificación de viriones

Para la purificación de TRV se añadieron 2 volúmenes del tampón K_2HPO_4 100 mM al tejido vegetal triturado y se filtró para retirar restos de tejido vegetal. Seguidamente se añadió a la disolución cloroformo:butanol (0,5 por ml de tampón). Posteriormente, se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 15 minutos. El sobrenadante se traspasó a nuevos tubos 'eppendorfs' y se mezcló con $\frac{1}{5}$ de Polietilenglicol (PEG) 6000 al 30%. PEG provoca la precipitación de las partículas víricas. Se incubó en hielo durante 10 minutos y centrifugó a 6000 r.p.m. otros 10 minutos. Por último, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en tampón Na_3PO_4 10 mM a pH 7.

En la purificación de TCV se añadieron 2 volúmenes de tampón Na_3PO_4 50 mM al tejido vegetal previamente homogeneizado y se congeló a -70°C durante 2 semanas. Pasados los días se filtró y centrifugó a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C . Todas las centrifugaciones se realizaron en frío. Después se añadió PEG 6000 al 10% (w/v) y NaCl 2% (w/v) a temperatura ambiente para favorecer la disolución del PEG y se mantuvo en agitación 3 horas a 4°C . Posteriormente, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 20 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de tampón Na_3PO_4 30 mM. Seguidamente, se añadió un volumen igual de cloroformo:butanol 1:1 y se recolectó la parte superior tras su centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos. Como último paso se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 4 horas a 18°C , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

En la purificación de TuMV primero se homogeneizó el tejido con fosfato de sodio 1/1,2 (w/v) al 0,5 M (pH 7,5), Na-EDTA al 0,01 M y ácido ascórbico al 0,3%. Tras filtrarlo se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo 'Falcon' y se añadió Triton X-100 al 1%, PEG al 4% y NaCl 0,1M. Tras removerlo a temperatura ambiente 2,5 horas, se centrifugó a 10000 r.p.m. durante 15 minutos. Seguidamente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en tampón fosfato 0,01 M a pH 7,5 y con MgCl_2 0,01M. entonces, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se traspasó y se centrifugó a 24000 r.p.m. durante 90 minutos. Tras retirar el sobrenadante se resuspendió el pellet en tampón fosfato 0,5 M a pH 7,5 y con MgCl_2 0,01M. Finalmente, se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se analizó mediante la técnica dot blot, pero no se obtuvieron resultados positivos.

Todos los viriones purificados se preservaron a -70°C .

3.4. Inoculación mecánica

La inoculación mecánica en *Arabidopsis thaliana* se llevó a cabo en plantas de 17 días usando carborundum y viriones purificados (1 mg/mL) de AMV (aislado PV0196, Plant Virus Collection, DSMZ) en PE buffer (30 mM fosfato de sodio, pH 8), TRV, TCV o TuMV. En primer lugar, se marcan las 2 hojas de la planta que se van a infectar. Después, se espolvorea carborundum (mineral abrasivo) y se añaden 3 µl de cada solución de viriones. Seguidamente, se presiona suavemente con una espátula para esparcir los viriones y producir microroturas en las hojas por la abrasión del carborundum.

Para el estudio a 4 días post-inoculación de TRV, se empleó tejido fresco de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas. Para ello se agroinfiltró *Agrobacterium* C58 transformada con los plásmidos que contenían el genoma de TRV. Puesto que el plásmido confiere resistencia a kanamicina y la bacteria presenta resistencia a rifampicina, las bacterias se crecieron en cultivo líquido (LB) con rifampicina y kanamicina en agitación durante 24 h a 28°C). Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 4500 r.p.m. durante 14 minutos, y, después de eliminar el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron en 3 ml de tampón de agroinfiltración. Se agroinfiltraron 4 plantas de *Nicotiana benthamiana* a una densidad óptica (OD) de 0,5 y 0,25. A ambas concentraciones las plantas de *Nicotiana* mostraron síntomas de TRV, por lo que se podían utilizar las dos indistintamente como inóculo. Pasados 6 días tras la agroinfiltración, se machacaron las hojas que presentaban síntomas con 0,5 ml de tampón fosfato a 30 mM y se inocularon las plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizando carborundum como se describió anteriormente.

3.5. Recogida de las plantas y homogeneización con nitrógeno líquido

Las plantas inoculadas se recogieron a 4, 7, 10 o 16 días post-inoculación (dpi).

Tras eliminar las hojas inoculadas, se selecciona la parte aérea de la planta y se machaca en un mortero con nitrógeno líquido, para así evitar la acción de las ribonucleasas. Las muestras de tejido se almacenan a -70°C hasta que se extrae el RNA.

3.6. Extracción de RNA

Se añadió 1 ml de extrazol de la casa comercial EM300 (Birt DNA) por cada 100 mg de tejido y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de extrazol (200 µl). Pasados tres minutos se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. Después, se traspasaron aproximadamente 400 µl a nuevos tubos 'ependorfs' y se añadió el mismo volumen de isopropanol 1:1. Tras 10 minutos de incubación a 4°C se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con 700 µl de etanol al 70%. Tras un vórtex para soltar el pellet, se centrifugó a 14000

r.p.m. durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió acetato de sodio 3 M al 10% más 250 µl de etanol absoluto. Se incubaron a -20°C 2 horas mínimo para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 minutos y tras retirar el sobrenadante, se realizó un último lavado con etanol al 70%. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió en agua estéril y se conservó a -20°C.

3.7. Preparación de las sondas para la hibridación molecular

Para realizar la detección del vRNA mediante la técnica northern blot, se sintetizaron sondas específicas para los virus a estudio. Para la detección de cada virus se emplea una sonda complementaria a su secuencia de nucleótidos de unos 150-300 pares de bases aproximadamente. Durante la síntesis de la sonda se utilizan nucleótidos de uracilo marcados con digoxigenina (Dig-UTP), para su posterior detección con un anticuerpo marcado frente a la digoxigenina (Pallas *et al.*, 1998). Para las síntesis de las sondas, se incubó el plásmido correspondiente (conteniendo un fragmento del genoma viral) previamente linearizado con un inhibidor de ribonucleasas, la polimerasa T7 y una mezcla de los 4 nucleótidos marcados con digoxigenina más el Dig-UTP (siguiendo las recomendaciones del fabricante, Roche). La solución se incubó a 37°C durante 2 horas. El producto de la reacción se analiza mediante electroforesis en geles de agarosa (TAE 1X, 1% Agarosa).

3.8. Detección del virus mediante hibridación molecular no radioactiva

La técnica northern blot consta de cuatro etapas fundamentales: separación de los RNAs en gel de agarosa desnaturizante, transferencia y fijación de los RNAs, hibridación de la sonda y detección de los RNAs. Para implementar el protocolo se utilizó una sonda específica y complementaria al RNA viral a estudio.

Primero se esterilizó el material a emplear para la separación electroforética de los ácidos nucleicos con agua oxigenada al 3,3%, para evitar la acción de ribonucleasas. El gel se preparó al 1,5 % de agarosa, con 1X MOPS (Ácido 4-morfolina-propanosulfónico) y 2% de formaldehído. A los RNAs extraídos se les añadió un volumen de tampón de desnaturalización (formaldehído, formamida, bromuro de etidio y xilencianol-bromofenol), y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. La formamida previene la degradación del RNA a altas temperaturas y reduce la temperatura requerida para la interacción RNA-sonda. El formaldehído desnaturaliza el RNA, evitando estructuras secundarias. Los geles para AMV, TRV y TCV fueron corridos a 75 voltios durante 75 minutos, mientras que para TuMV se corrieron al mismo voltaje durante 120 minutos.

Para la transferencia se empleó 10X SSC (tampón de citrato de sodio y solución salina). La transferencia se logra por capilaridad y gracias a que la membrana de nylon posee carga

positiva, por lo que los RNAs establecen interacciones electrostáticas con ella. La transferencia transcurre en torno a las 8 horas aproximadamente.

Una vez han sido transferidos los RNAs a la membrana, estos han de fijarse para su posterior detección, por lo que se produce su unión covalente a la membrana mediante un transiluminador de luz ultravioleta. Seguidamente, la membrana se introdujo en un tubo de hibridación y se bloqueó con solución de hibridación a 68°C en un horno con rotación suave. Pasadas 2 horas se retiró la solución y se añadió la sonda específica. Para preparar la sonda se mezclan en un tubo 'eppendorf' 50 µl de la solución de hibridación y 1 µl de la sonda recién sintetizada (procedimiento descrito anteriormente) y se incuba a 65°C durante 10 minutos. Esta mezcla se añade a 10 ml de solución de hibridación a una concentración final de 20 ng/ml. La membrana se incuba con la mezcla de hibridación con la sonda durante toda la noche a 68°C en el horno con rotación.

Posteriormente, se retira la sonda y se mantiene a -20°C hasta su posterior uso y comienzan los lavados de la membrana, para retirar el exceso de sonda y que no haya hibridación inespecífica. Se realizaron dos lavados a temperatura ambiente de 5 minutos con tampón 2X SSC (dodecil sulfato de sodio) y 0,1% SDS y otros dos de 15 minutos a 68°C con el tampón 0,1X SSC y 0,1% SDS.

El proceso de revelado se realizó a temperatura ambiente en el mismo tubo de hibridación. Comenzó con 1 lavado con tampón 1 (NaCl 0,8%, A. maleico 1,16%, pH 7,5) + 0,3% de Tween 20 (SIGMA P-1379) durante 10 minutos. Posteriormente se bloqueó la membrana añadiendo agente bloqueante 1X al mismo tampón. Pasados 30 minutos se añadió a la misma solución el anticuerpo Anti-Digoxigenina-AP a dilución 1:10000. Tras 30 minutos se realizaron lavados con Tween 0,3% + el tampón 1 para retirar el exceso de anticuerpo que no se hubiera unido a la sonda. El último lavado se realizó con el tampón 3 (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) para equilibrar la membrana. Finalmente, se añadió a la membrana el sustrato quimioluminiscente CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo decan}-4-yl)phenyl phosphate), el cual es degradado por la fosfatasa alcalina dando lugar al fenómeno de quimioluminiscencia. que permite la detección rápida y sensible del anticuerpo unido a la sonda. Para la detección de la quimioluminiscencia, se utilizó el equipo Image Reader LAS-3000 (FUJIFILM) o mediante exposición fotográfica utilizando películas reveladoras (Hyperfilm™ ECL™ Amersham)

La cuantificación y el tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante los programas Image Gauge, Image J (gel de RNAs) y Statgraphics. Una vez obtenidas las imágenes, se procede a su cuantificación y a su normalización frente al rRNA1. En Statgraphics se empleó la prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar si hay diferencia significativa en los niveles de infección entre los mutantes y las plantas silvestres.

3.9. Inserción del epítipo HA por triplicado en la proteína P2 de AMV en un plásmido binario para agroinfiltración

El objetivo final fue insertar del epítipo HA por triplicado (3HA) en el inicio de la ORF de la P2 del AMV para su expresión en hojas mediante agroinfiltración. El proceso seguido se muestra en la Figura 11. La inserción de la secuencia del epítipo 3HA se realizó mediante una reacción de PCR utilizando como molde un plásmido bacteriano (pSK/cDNA2) que contiene un casete de expresión mediante agroinfiltración de plásmidos binarios. Este casete consta de la secuencia por duplicado correspondiente al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, seguido de la secuencia completa del RNA2 del AMV (5UTR-ORF P2-3UTR) y el terminador Popit (Alvarado-Marchena *et al.*, 2022) (Figura 11. Plásmido, pSK/cDNA2. Imagen superior izquierda). Los reactivos empleados para la PCR se muestran en la tabla 3. El programa de PCR se realizó en 2 pasos (Tabla 4) y los cebadores utilizados se diseñaron de modo que cada uno de ellos incluye parte de la etiqueta 3HA (Tabla 5).

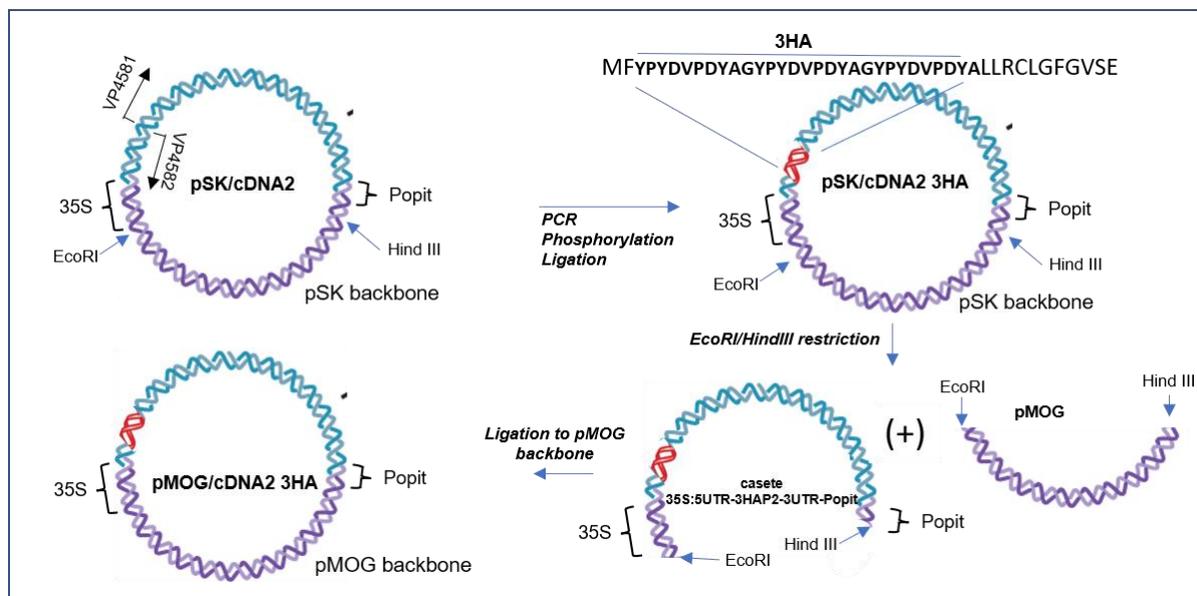


Figura 11. Esquema del proceso de construcción del plásmido binario pMOG/cDNA2 3HA conteniendo el epítipo 3HA al inicio de la ORF de la P2 a partir del plásmido pSK/cDNA2. Se indican los nombres de los plásmidos utilizados y generados. En rojo se indica la posición del epítipo 3HA y en el plásmido mostrado en la parte superior derecha se presenta en minúscula la secuencia de aminoácidos correspondiente al epítipo. Se muestra la posición del promotor 35S y del terminador Popit.

Tabla 3. Reactivos empleados para la PCR.

5X Prime Star™ Buffer	5 µl
dNTP Mix	2 µl
Oligonucleótidos sentido y antisentido	0,625 µl
Prime Star™ HS DNA Polymerase	0,3 µl
DNA (100 ng)	1 µl
H ₂ O	Hasta 25 µl

Tabla 4. Condiciones de la PCR para amplificar el casete 35S:RNA2 (3HA:P2):Rz:Popit.

	T°C	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización	98	2'	
Desnaturalización	98	10''	30
Anillamiento y amplificación	68	7'	
Amplificación	68	6'	
Extensión final	25	∞	1

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados para introducir el epítipo 3HA al inicio de la ORF de la P2. En cursiva se muestran los nucleótidos correspondientes a la secuencia del genoma viral.

(VP4851) gttcctgattatgcgggatatccatcacgatgttcctgattatgcgactctttgagatgtcttgattg
(VP4852) ggaacatcgatggatagcctgcataatcagggacatcgtaagggtagaacatattgaaaaqattaaac

El producto de PCR esperado correspondería a la versión linearizada del plásmido pSK/cDNA2 3HA (Figura 11. Imagen superior derecha). Para obtener este plásmido ya circularizado se realizaron los siguientes pasos:

3.9.1. Purificación del producto de PCR del gel de agarosa

La comprobación de la PCR se realizó mediante electroforesis en gel al 1% agarosa. Se analizaron 2 µl de producto de PCR, 3 µl H₂O y 1 µl de tampón de carga. Tras comprobar que el producto amplificado era el esperado, se purificó a partir del gel cargando el total de la reacción (50 µl) y corriéndolo a 90V durante 50 minutos. Seguidamente se cortaron las bandas correspondientes y se empleó el kit de purificación por columna GeneJet siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se cortó la banda del gel y se añadió tampón de unión a concentración 1:1. Después, se incubó a 65°C durante 5-10 minutos, hasta la completa disolución de la agarosa. Tras un vórtex, se transfirieron 800 µl de la solución a la columna de purificación. Se centrifugó 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 700 µl de tampón de lavado a la columna y se centrifugó durante 1 minuto. Tras la eliminación del sobrenadante se repitió la centrifugación con la columna vacía 1 minuto, para la eliminación de posibles residuos de etanol, que pueden inhibir posteriores reacciones enzimáticas. Seguidamente, la columna se transfirió a un nuevo tubo 'eppendorf' de 1,5 ml en el que se añadió 50 µl de tampón de elución y se centrifugó 1 minuto. Finalmente, se desechó la columna y se conservó el tubo a -20°C con el DNA purificado.

3.9.2. Digestión del plásmido y ligación

Posteriormente se realizó una digestión con las enzimas DpnI, y la polinucleótido quinasa T4 y para fosforilar los extremos 5'OH en el producto de PCR respectivamente. DpnI actúa sobre DNA metilado, es decir, su diana de restricción ha de estar metilada por lo tanto solo fragmenta al DNA molde y no al producto de PCR. La quinasa T4 fosforila los extremos 5' de los fragmentos de la PCR, que permitieran a la enzima ligasa regenerar los enlaces fosfodiéster y así la recircularización del plásmido. La digestión se purificó con fenol:cloroformo 1:1 y se precipitó (10% acetato de sodio al 2,5X etanol absoluto) durante 2 horas a -20°C . Después, se centrifugó y se resuspendió el pellet en agua estéril. Se utilizaron 50-100 ng/μl para la ligación (ligasa, 1X tampón ligación, PEG), que se incubó 3 horas a temperatura ambiente.

3.9.3. Transformación, purificación y secuenciación

Después, se transformaron células DH5α con 4 μl de ligación en un electroporador a 1700V. Se le añadieron 500 μl de medio LB y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente, se sembraron 100 y 50 μl de las células en placas con ampicilina. Las placas se incubaron a 37°C durante 12 horas y 4 de las colonias que crecieron fueron añadidas a 5 ml de medio LB con ampicilina para su cultivo en agitación a 37°C durante otras 12 horas aproximadamente. Posteriormente se realizó una miniprep para aislar los plásmidos de las colonias bacterianas. El protocolo fue obtenido de Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit. Las colonias se centrifugaron a 4500 r.p.m. durante 15 minutos. Seguidamente se eliminó el sobrenadante y se añadieron 250 μl de la solución de resuspensión a las células sedimentadas para transferirlas a un tubo 'eppendorf' y agregar 250 μl de la solución de lisis. Se mezcló por inversión y se añadieron 350 μl de la solución de neutralización. Se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 5 min para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico. El sobrenadante se transfirió a la columna de centrifugación GeneJET suministrada y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 1 minuto. Tras desechar el filtrado se añadieron 500 μl de solución de lavado a la columna y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 1 minuto. Después se retiró el filtrado y se repitió el lavado. La columna GeneJET se transfirió a un tubo 'eppendorf' nuevo de 1,5 ml y se añadieron 50 μl de tampón de elución. Se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 2 min. Finalmente, la columna se desechó y se almacenó el DNA plasmídico a -20°C.

Los plásmidos aislados se mandaron a secuenciar con cebadores del inicio del RNA2 para comprobar si se ha insertado correctamente la etiqueta HA por triplicado en el ORF de la P2.

3.9.4. Introducción del casete de expresión en pMOG

Tras la confirmación de la correcta construcción del plásmido pSK/cDNA2 3HA (Figura 11. Imagen superior derecha) se procedió a la introducción del casete de expresión en el plásmido binario pMOG. Para ello se incubó dicho plásmido con las enzimas de restricción EcoRI e HindIII y se purificó desde geles de agarosa el fragmento correspondiente al casete de expresión siguiendo los pasos descritos anteriormente (Fig.11, Imagen inferior derecha, casete 35S:5UTR-3HAP2-3UTR-Popit). Posteriormente se llevó a cabo la reacción de ligación del casete de expresión con el plásmido pMOG linealizado con las mismas enzimas de restricción. Con el producto de la ligación se transformaron con células DH5 α y se sembraron en placa con medio sólido LB con kanamicina durante 24 h a 37°C. Una vez crecidas las colonias, se realizó una colony PCR con cebadores específicos localizados en la región Popit del casete) y en la secuencia contigua del plásmido pMOG, por lo que solo se amplificaran los plásmidos que contienen ambos. Las colonias que fueron positivas se cultivaron en medio líquido LB con kanamicina 24h a 37°C. Al día siguiente se realizó una miniprep para aislar el DNA plasmídico (el protocolo de miniprep se describió anteriormente).

De este modo se obtuvo el plásmido binario pMOG/cDNA2 3HA (Figura 11. Imagen inferior derecha) que seguidamente se utilizó para, transformar células C58 de *Agrobacterium* que se cultivaron en placa con LB y kanamicina durante 48 h a 28°C.

3.10. Agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana*

Cada *Agrobacterium* transformado con un plásmido distinto (pMOG/cDNA1, pMOG/cDNA2 pMOG/cDNA2 3HA o pMOG/cDNA3 se cultivó en medio líquido con kanamicina durante 24 h a 28°C. Al día siguiente, se sedimentaron las células y se resuspendieron en 1 ml de medio de agroinfiltración (10 mM MES pH 5,6 y 10 mM MgCl₂). Se midió la concentración de cada cultivo en el espectrofotómetro y se mezclaron los cultivos para formar dos inóculos: inóculo salvaje: pMOG/cDNA1 + pMOG/cDNA2 + pMOG/cDNA3 e inóculo mutante: pMOG/cDNA + pMOG/cDNA2 3HA + pMOG/cDNA3 a una OD600 de 0,025 cada uno. Con estos inóculos se agroinfiltraron 2 hojas de 3 plantas de *Nicotiana benthamiana* de tres semanas de edad.

3.11. Detección del epítipo HA insertado en la P2 mediante western blot

Para analizar la acumulación de 3HA:P2 se recogieron 100 mg de tejido de las hojas sistémicas y se trituraron en nitrógeno líquido. Se les añadieron 2 volúmenes de tampón de extracción de proteínas Laemmli (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol y 100 mM DDT) y se incubaron 10 minutos a 100°C. Los extractos proteicos obtenidos se separaron en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida con sodiododecilsulfato (PAGE-

SDS). El gel contiene dos fases; para la preparación del gel se añadió 10% PAGE (10% acrilamida:bisacrilamida (29:1), 2% SDS, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$, 0,001% TEMED) y PAGE al 5% (5% de acrilamida:bisacrilamida (29:1), 2% SDS, 0,125 M Tris pH 6,8, 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_8$, 0,001% TEMED). Tras la polimerización de la poliacrilamida, el gel se montó en una cubeta de electroforesis y se le agregó el tampón de electroforesis para proteínas (0,025M Tris-HCl pH 8,3, 1% SDS, 0,2 M glicina). Se cargaron 25 μl de los extractos de proteínas y se corrió la electroforesis a 100 V durante una hora y media.

Una vez separadas las proteínas, se transfirieron a una membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF) durante 24 h a 4°C y 30 V en un equipo de electrotransferencia semi-seca *TE 70* de Hoefer. La membrana fue previamente tratada con metanol y posteriormente lavada con agua destilada. Se introdujeron papeles whatman 3 MM impregnados con tampón de electrotransferencia (25mM Tris, 192 mM glicina) entre la membrana y el gel de poliacrilamida. Al día siguiente se lavó la membrana con tampón TBS 1X (20 mM Tris-HCl pH 7,5 y 150 mM de NaCl) durante 5 minutos y luego se bloqueó con TBST (TBS 1X y 0,3% de Tween 20) y leche descremada al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana con una mezcla de tampón TBS 1X, leche al 2,5% y el anticuerpo antiHA comercial (Amersham) a una dilución 1:10000 durante 1 hora. Después, se realizaron 3 lavados con el tampón TBST 1X y 0,3% de Tween 20 durante 10 minutos cada uno para retirar el exceso de anticuerpos de la membrana. Seguidamente, se incubó 1 hora con TBS 1X + 2,5% de leche descremada y el anticuerpo comercial antirabbit (Amersham) conjugado a la enzima peroxidasa. Este anticuerpo secundario reconoce la fracción constante del anticuerpo primario antiHA. Para retirar el exceso de este se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS1X + 0,3% Tween 20 y un último lavado de 5 minutos con TBS 1X. Para el revelado se incubó durante 5 minutos en oscuridad con el sustrato de Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (el sustrato quimioluminescente para la fosfatasa alcalina). Por último, para la detección de la quimioluminescencia la membrana fue expuesta a una película autorradiográfica en oscuridad durante 20 minutos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de la implicación de la desmetilasa de *Arabidopsis* ALKBH10B en el proceso infectivo del AMV.

Puesto que en trabajos previos se había analizado el papel de las proteínas ALKBH9A, 9B y 9C en el ciclo infectivo del AMV (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2021), con el fin de aumentar la información sobre otras desmetilasas, en este TFM se abordó un primer estudio sobre la potencial implicación de la desmetilasa ALKBH10B en dicha infección (Duan *et al.*, 2017). Como primer paso, se confirmó que el mutante *alkbh10b* de inserción T-DNA utilizado en este trabajo es una línea homocigótica. Para ello se llevó a cabo una RT-PCR para amplificar el mRNA de ALKBH10B en plantas mutantes y silvestres (WT, por las siglas en inglés de *wild type*). Tal y como muestra la Figura 12A, el mRNA correspondiente al gen *ALKBH10B* no se amplifica en plantas mutantes *alkbh10b*, pero sí se detecta en plantas WT, mientras que el mRNA utilizado como control, ILR3 (Aparicio y Pallas, 2017), se detecta al mismo nivel que en las plantas silvestres (Fig. 12B).

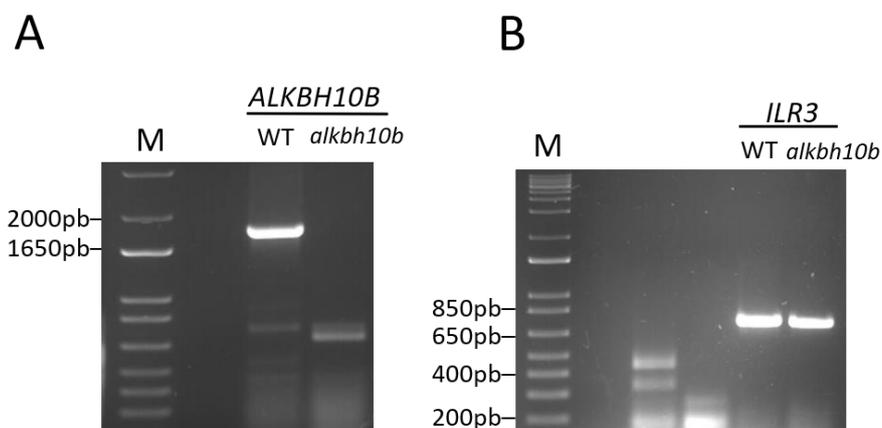


Figura 12. RT-PCR realizadas para la comprobación de la ausencia de mRNA del gen *ALKBH10B*. A) RT-PCR del gen *ALKBH10B*. B) RT-PCR del gen *ILR3* como control en las mismas muestras WT y *alkbh10b*, para comprobar que el RNA de ambas no está degradado y la RT-PCR de la figura A es fiable. M, marcador de pesos molecular.

Posteriormente, plantas WT y *alkbh10b* se inocularon con viriones de AMV y los niveles de acumulación viral se analizaron mediante northern blot en hojas sistémicas (rosetas) y tallos florales a 9 y 13 días post-inoculación (dpi), respectivamente. Tal y como se describió en un trabajo previo, estas plantas mutantes no presentan ningún fenotipo de desarrollo evidente (Duan *et al.*, 2017; Fig.13A). En la Figura 13B-D se puede observar que los niveles de acumulación viral no mostraron diferencias significativas entre el WT y el mutante en ninguno de los tejidos analizados. En resultados previos se observó que ALKBH9B desempeña un

papel crítico en el proceso de carga al floema del AMV (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2021), mientras que los resultados obtenidos en este TFM sugieren que, por el contrario, la desmetilasa ALKBH10B no es necesaria en el ciclo infectivo de este virus.

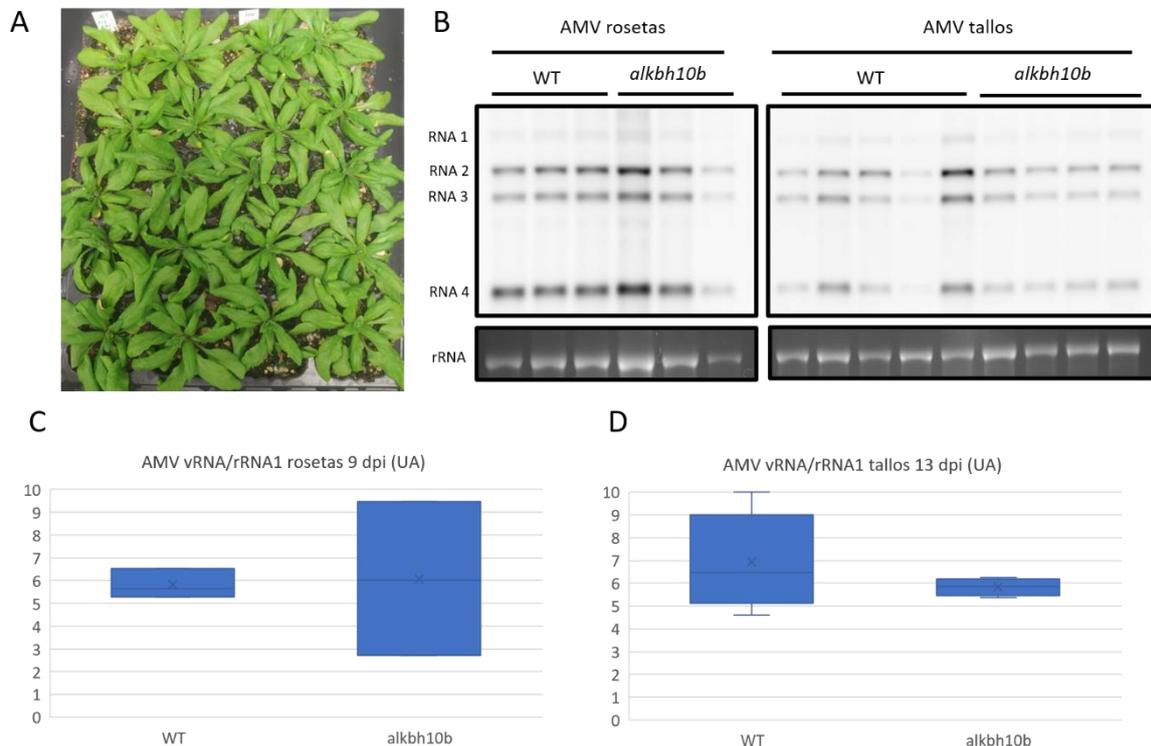


Figura 13. Análisis de la implicación de ALKBH10B en el ciclo del AMV. (A) Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes *alkbh10b*. (B) Northern blots para detectar los vRNAs de AMV en hojas sistémicas (rosetas) y tallos florales a 9 y 13 dpi, respectivamente, en plantas silvestres (WT) y mutantes *alkbh10b*. A la izquierda se indica la posición de los RNAs del AMV 1-4. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. (C y D) Histogramas de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a los vRNAs en los blots normalizados respecto al RNA ribosomal 1 (rRNA1). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-value} < 0,05$) mediante el test de Wilcoxon. UA: unidades arbitrarias.

4.2. Estudio de la implicación del mecanismo m⁶A en la respuesta antiviral en plantas.

Puesto que en trabajos previos de nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto la importante función que llevan a cabo las proteínas ALKBH9B y ECT2/ECT3/ECT5 regulando los niveles de infección de AMV en Arabidopsis (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2021; 2022), una pregunta interesante es si estas proteínas constituyen un mecanismo general en la regulación de las infecciones virales de plantas o, por el contrario, son específicas en la infección por AMV. Así, en este TFM se abordaron una serie de estudios para comprobar si estas proteínas llevan a cabo la misma función en los procesos infectivos de otros virus de plantas tales como el virus del cascabel del tabaco (TRV), el virus del arrugamiento del nabo

(TCV) y el virus del mosaico del nabo (TuMV). Para ello, se utilizó el mutante *alkbh9b* y el doble mutante *ect2/ect5*. De este último, inicialmente se emplearon dos líneas independientes: *ect2-1/ect5-2* y *ect2-1/ect5-3*. Todos estos mutantes tienen eliminada la expresión de la proteína correspondiente mediante la inserción de un T-DNA en el gen (plantas *knockout*) y fueron descritos en trabajos previamente publicados (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2022). Aunque de acuerdo a resultados previos el efecto sobre la infección era más evidente en *ect2/ect3*, se decidió utilizar el mutante *ect2/ect5* porque, al contrario que *ect2/ect3*, no presentaba un fenotipo de desarrollo a simple vista (Martínez-Pérez *et al.*, 2022). Antes de comenzar los bioensayos, se diseñaron las sondas específicas de cada virus tal y como se describe en el apartado de Métodos. En la figura 14 se observa el resultado de la electroforesis de las sondas de TRV y TCV.

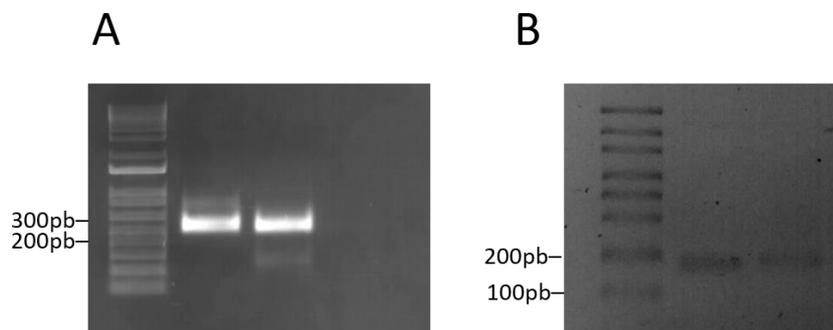


Figura 14. Sondas sintetizadas para la hibridación molecular no radioactiva. A) Sonda de TRV1 y TRV2. B) Sonda de TuMV.

4.2.1. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV)

Con el fin de analizar la implicación de ALKBH9B y las proteínas lectoras ECT2 y ECT5, en este estudio se inocularon plantas WT y mutantes con TRV y se analizó la acumulación viral en hojas sistémicas (rosetas) a 4 y 10 dpi (Figura 15). A 4 dpi se observó un mayor número de plantas infectadas en ambos mutantes en comparación a las WT (Figura 15 A) y un mayor nivel de RNA viral en estas plantas (Figura 15B), lo que indicaría que, en estadios iniciales de la infección, la ausencia de estas proteínas favorecería la infección por TRV. En el caso del mutante *alkbh9b*, este resultado es contradictorio frente al observado para AMV (Martínez-Pérez *et al.*, 2017), en el cual los mutantes *alkbh9b* presentaban una menor infección viral frente a las WT. En el caso de los mutantes *ect2-1/5-3*, sí se observa un resultado similar al observado previamente con AMV: las plantas mutantes presentan niveles más elevados de vRNA en comparación con las WT infectadas (Martínez-Pérez, 2021. Tesis Doctoral). A 10 dpi, el virus también parece acumularse menos en las plantas WT, aunque las diferencias entre los mutantes y las plantas WT no son estadísticamente significativas (Figura 15C-D).

Los resultados apuntarían a que, en estadíos iniciales de la infección, el virus se vería beneficiado por posibles efectos de desregulación en la ruta m⁶A a causa de la eliminación de la desmetilasa o las proteínas lectoras. A tiempos más largos, el mecanismo m⁶A no afectaría al proceso de infección viral. En cualquier caso, hay que considerar que a tiempos cortos la variabilidad observada en la acumulación viral es mayor dado que la infección depende en gran medida de la ontogenia de la planta y ésta puede condicionar el éxito y/o velocidad de la acumulación. En un futuro próximo se pretenden repetir estos experimentos a los mismos y otros dpi para corroborar y ampliar estos resultados.

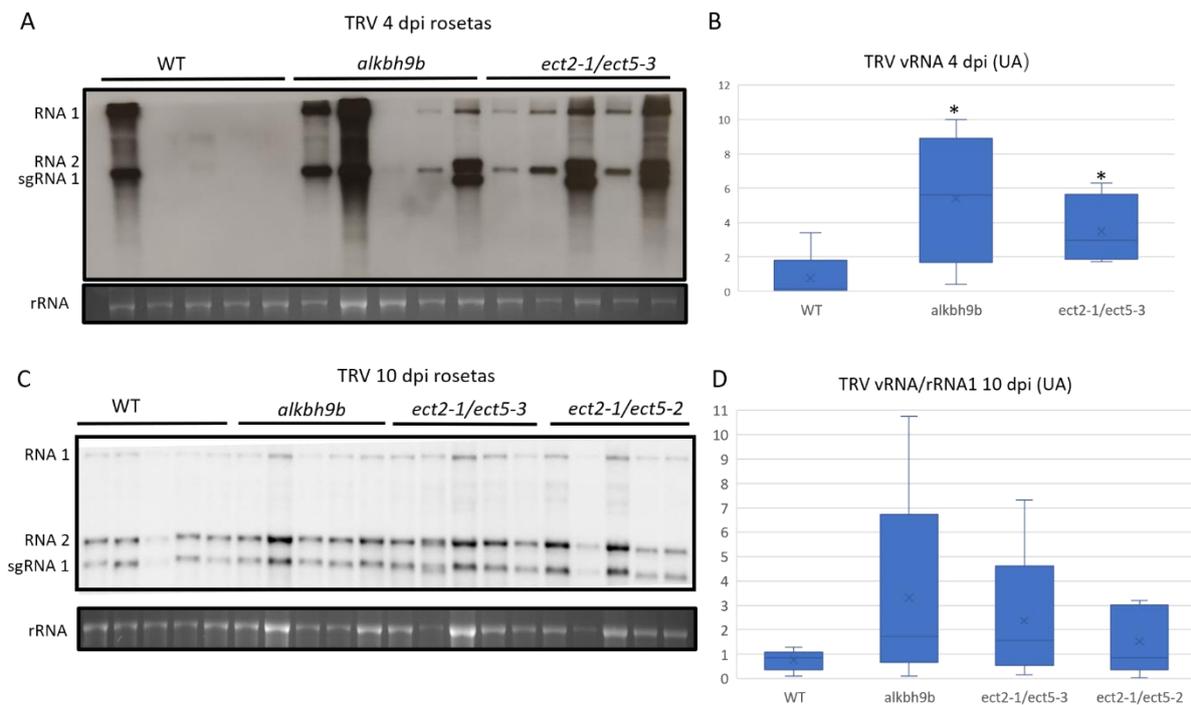


Figura 15. Implicación de ALKBH9B y ECT2/ECT5 en el ciclo infectivo del TRV. Northern blots para detectar los vRNAs de TRV en hojas sistémicas (rosetas) a 4 y 10 dpi (A y C, respectivamente) en plantas silvestres (WT) y mutantes *alkbh9b* y *ect2/ect5*. A la izquierda de cada panel se indica la posición de los vRNAs. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. En la parte derecha se muestran los histogramas de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a los vRNAs en los blots normalizada respecto al rRNA1 (UA, unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p-value<0,05) mediante el test de Wilcoxon. UA: unidades arbitrarias.

Por otro lado, en el caso de AMV se observó que el transporte viral hacia los tallos florales está prácticamente bloqueado en las plantas *alkbh9b* (Martínez-Pérez *et al.*, 2017; 2021). Sin embargo, tal y como muestra la Figura 16, el TRV se acumula en niveles similares en los tallos florales de estas plantas respecto de las WT a 16 dpi.

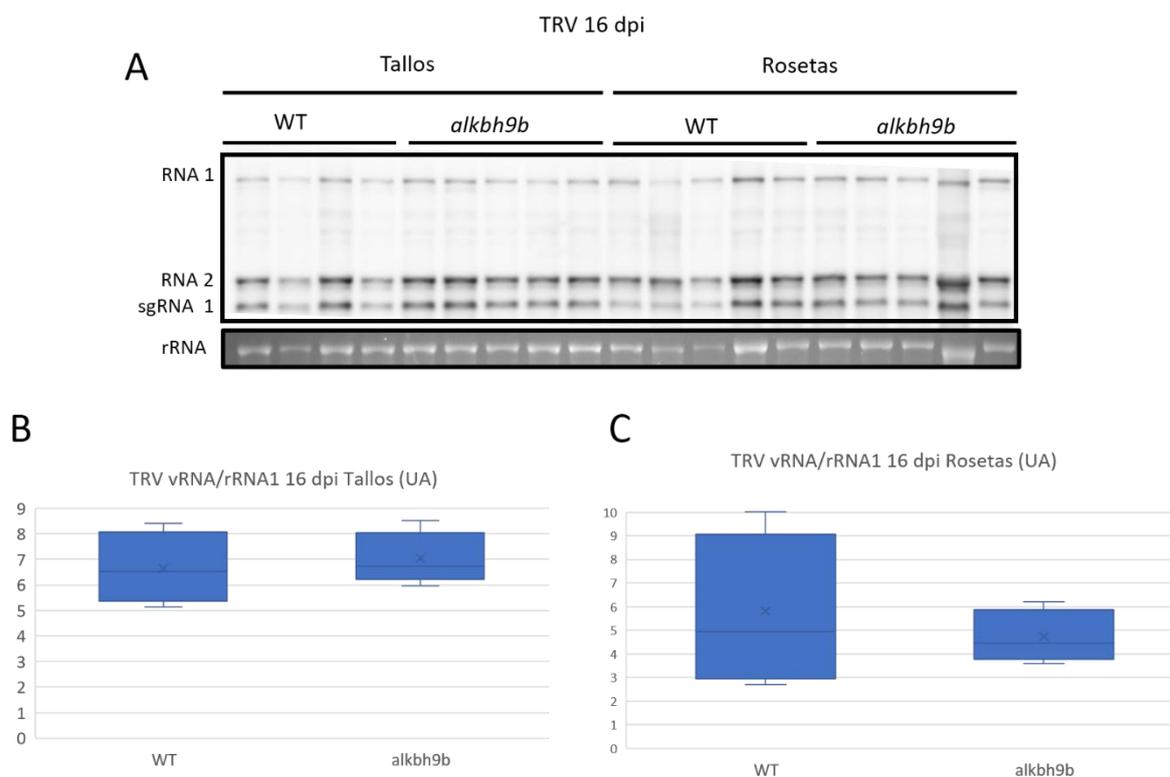


Figura 16. Implicación de ALKBH9B en transporte del TRV a los tallos florales. (A) Northern blots para detectar los vRNAs de TRV en las hojas sistémicas y tallos florales a 16 dpi en plantas silvestres (WT) y en mutantes *alkbh9b*. A la izquierda de cada panel se indica la posición los vRNAs. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. (B y C) Histogramas de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a los vRNAs en el blot normalizada respecto al rRNA1 (UA, unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p -value $<0,05$) mediante el test de Wilcoxon. UA: unidades arbitrarias.

4.2.2. Virus del arrugamiento del nabo (TCV)

En el caso del TCV, también se observó un aumento de la acumulación viral estadísticamente significativo en ambos mutantes respecto del WT a 4 dpi, mientras que la acumulación viral fue similar en todas las plantas a 10 dpi (Figura 17). Al igual que en el caso del TRV, ambos mutantes presentaron niveles más elevados de vRNA en comparación con las plantas silvestres, aunque los mutantes *ect2-1/5-3* presentaron niveles de TCV ligeramente más altos que los mutantes *alkbh9b* (Figura 17A y Figura 15A). También, en el caso de este virus, los resultados sugieren que, en estadios iniciales de la infección, el virus se vería beneficiado por posibles efectos de desregulación en la ruta m⁶A, mientras que, a tiempos más largos, este mecanismo no afectaría al proceso de infección viral. De nuevo, el fenotipo frente a la infección por este virus en el mutante *alkbh9b* es diferente al descrito previamente para la infección por AMV, en el que estas plantas presentan cierta resistencia al virus. En

contraposición, en los mutantes *ect2-1/5-3* se observa el mismo resultado que con la infección por AMV: una mayor susceptibilidad a la infección vírica.

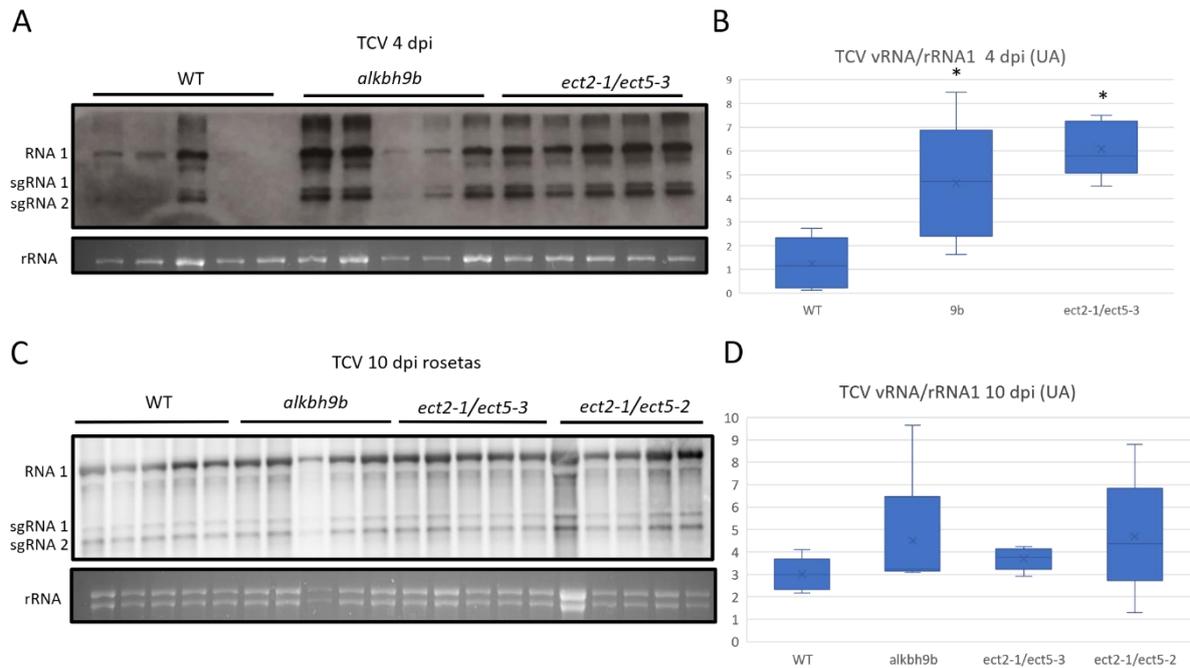


Figura 17. Implicación de ALKBH9B y ECT2/ECT5 en el ciclo infeccioso del TCV. Northern blots para detectar los vRNAs de TCV en hojas sistémicas (rosetas) a 4 y 10 dpi (A y B) en plantas silvestres (WT) y mutantes *alkbh9b* y *ect2/ect5*. A la izquierda de cada panel se indica la posición de los vRNAs. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. En la parte derecha se muestran los histogramas de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a los vRNAs en los blots normalizados respecto al rRNA1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (p -value < 0,05) mediante el test de Wilcoxon. UA: unidades arbitrarias.

Finalmente, para este virus también se analizó el transporte viral hacia los tallos florales en las plantas *alkbh9b*. Como muestra la Figura 18, el TCV infecta los tallos florales de todas las plantas y, además, muestra una mayor acumulación en las plantas mutantes respecto de las WT, indicando que la ausencia de ALKBH9B favorecería el transporte viral hacia los tallos florales. De nuevo es necesario destacar que estos son resultados preliminares y habrá que corroborarlos en un futuro próximo.

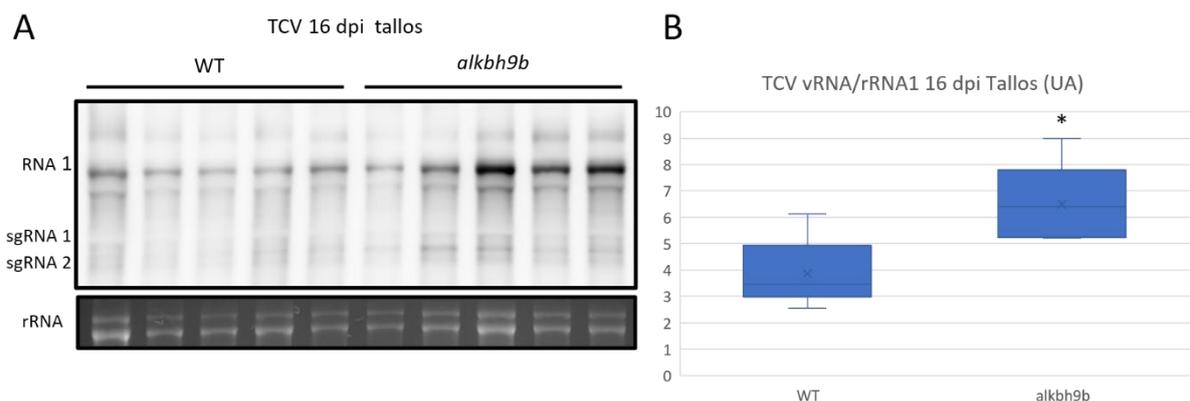


Figura 18. Implicación de ALKBH9B en el transporte del TCV a los tallos florales. *Northern blot* para detectar los vRNAs de TCV en tallos florales a 16 dpi en plantas silvestres (WT) y en mutantes *alkbh9b*. A la izquierda de cada panel se indica la posición de los vRNAs. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. En la parte derecha se muestra el histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas correspondientes a los vRNAs en el blot normalizada respecto al rRNA1 (UA, unidades arbitrarias). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas, mediante la comparación de medianas por el test de Wilcoxon. (UA: unidades arbitrarias).

4.2.3. Virus del mosaico del nabo (TuMV)

En el caso del TuMV, la acumulación viral se analizó en hojas sistémicas (rosetas) a 4 y 10 dpi. A 4 dpi la infección viral fue indetectable en todas las plantas, mientras que la acumulación viral a 10 dpi fue similar entre el WT y los mutantes (Figura 19).

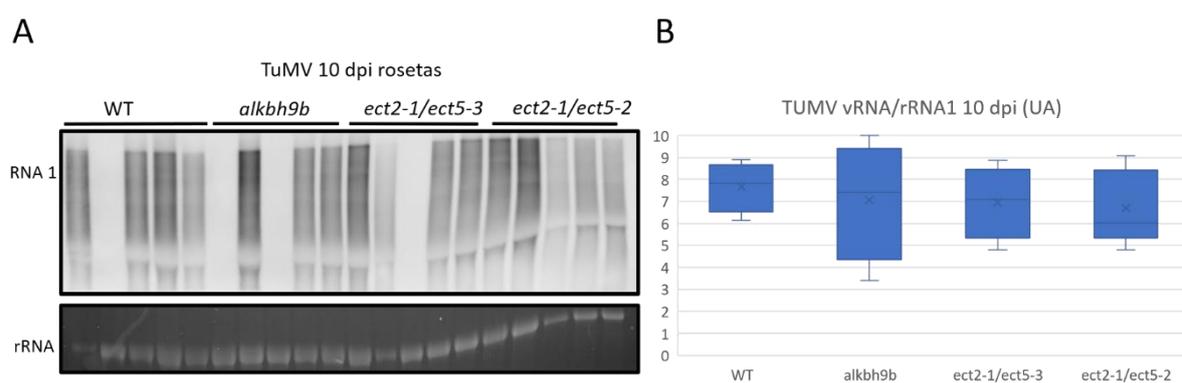


Figura 19. Implicación de ALKBH9B y ECT2/ECT5 en el ciclo infeccioso del TuMV. *Northern blot* para detectar los vRNAs de TuMV en hojas sistémicas (rosetas a 16 dpi en plantas silvestres (WT) y en mutantes *alkbh9b*. A la izquierda se indica la posición del vRNA genómico. La tinción con bromuro de etidio de los RNAs ribosomales (rRNA) se utilizó como control de carga. En la parte derecha se muestra el histograma de la cuantificación de la intensidad de las bandas en el blot respecto al rRNA1. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-value} < 0,05$) mediante el test de Wilcoxon. UA: unidades arbitrarias.

Cabe mencionar que, debido a la estructura del genoma del TuMV, que consiste en una molécula de RNA de 9'8 Kb, los ensayos *northern blot* revelan un alto grado de degradación, complicando el posterior paso de cuantificación. Por lo tanto, estos análisis se repetirán mediante RT-PCR cuantitativa con el fin de obtener resultados concluyentes.

En este caso no se pudo realizar el análisis de la infección en los tallos de WT y *alkbh9b* a 16 dpi porque las plantas infectadas morían antes de alcanzar la etapa de floración (Figura Suplementaria 2B).

En estudios previos a este TFM se describió la importancia de la maquinaria m⁶A frente a la infección por AMV y, además, se mostró que la resistencia parcial observada en mutantes de *alkbh9b* se revierte tras la inactivación de ECT2, ECT3 y ECT5, obteniendo niveles de infección equiparables a las plantas silvestres (Martínez-Pérez *et al.*, 2022). En base a estos

resultados, la desmetilación favorecería la infección, mientras que el reconocimiento del vRNA metilado por las proteínas lectoras disminuiría la acumulación viral mediante un mecanismo todavía desconocido. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, este mecanismo podría no afectar de la misma forma a todos los procesos virales. En el caso de TRV y TCV, los resultados sugieren que, por lo menos en etapas iniciales de la infección (4 dpi), la ausencia de la desmetilasa o las proteínas lectoras causa un aumento en la acumulación viral. El hecho de que dos proteínas con funciones, a priori, contrarias generen el mismo efecto sobre la infección viral sugiere que, en uno o ambos casos, podría tratarse de una consecuencia indirecta producida por la desregulación general de la metilación m⁶A en los mRNAs del huésped. En lo que respecta a la desmetilasa ALKBH9B, es probable que el AMV sea un caso específico. Mientras este virus parece secuestrar a esta proteína a través de la interacción con su CP para utilizarla a su favor (Martínez-Pérez *et al.*, 2017), el hecho de carecer de ALKBH9B podría generar efectos adversos en la planta que, en consecuencia, den lugar a una mayor susceptibilidad a otros virus. Aunque esta desmetilasa no parece afectar al nivel general de m⁶A en los mRNA de la planta (Duan *et al.*, 2017), podría estar regulando la expresión de genes concretos involucrados en la infección o la defensa de la planta.

El factor común entre los virus que se han estudiado y en los que se observa un efecto cuantificable (TRV, TCV y AMV) es que los mutantes *ect2/ect5* son más susceptibles a la infección, por lo que estos resultados refuerzan la hipótesis de que las proteínas lectoras tienen un papel esencial en la defensa antiviral, actuando como reguladoras de los niveles de acumulación del patógeno. Aun así, cabe recordar que los resultados presentados en este TFM son preliminares y serán confirmados y ampliados en un futuro cercano. Además, se pretende abordar la evaluación de los niveles de m⁶A en el vRNA de TCV y TRV durante la infección en *Arabidopsis* con el fin de aportar nuevos datos que refuercen nuestra hipótesis.

4.3. Construcción de una versión del genoma del AMV que contiene el epítipo HA en la subunidad de la replicasa viral P2.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación constituyen una herramienta muy útil para identificar proteínas que pueden establecer interacciones durante determinados procesos biológicos. La identificación de proteínas que interactúan con el complejo de replicación viral nos permitiría, entre otras cosas, descubrir nuevos factores de la ruta m⁶A que intervengan en el ciclo del AMV. En este sentido, se planteó llevar a cabo una modificación en la subunidad P2 de la replicasa del AMV mediante la inserción de la secuencia nucleotídica por triplicado del

epítipo HA (corresponde a un péptido derivado de la proteína hemaglutinina del virus influenza A). De este modo, sería posible inmunoprecipitar la P2 junto con proteínas asociadas a ella utilizando anticuerpos comerciales contra HA.

En el laboratorio se dispone de plásmidos binarios en los que están clonados los cDNAs correspondientes a los 3 RNAs que constituyen el genoma del AMV (denominados pMOG/cDNA1, pMOG/cDNA2 y pMOG/cDNA3) (Alvarado-Marchena *et al.*, 2022). Una mezcla de cultivos de agrobacterium transformados individualmente con cada uno de estos plásmidos sirven como fuente de inóculo mediante agroinfiltración, de modo que permiten establecer infecciones sistémicas del virus en plantas de *N. benthamiana* (Alvarado-Marchena *et al.*, 2022).

Mediante una PCR circular sobre un molde consistente en un plásmido intermedio (pSK/cDNA2) que contiene el casete de expresión, el cual consta, de la secuencia por duplicado correspondiente al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, seguido de la secuencia completa del RNA2 del AMV (5UTR-ORF P2-3UTR) y el terminador Popit (Figura 11) y usando cebadores específicos, se insertó el epítipo HA por triplicado al inicio de la ORF de esta proteína (Figura 20A). Posteriormente se aisló el casete de expresión y se clonó en el plásmido binario pMOG (Figura 20B). Así, se obtuvo un plásmido binario que se puede usar para infectar plantas que acumularan esta P2 modificada (Figura 21B. Plásmido pMOG/cDNA2 3HA).

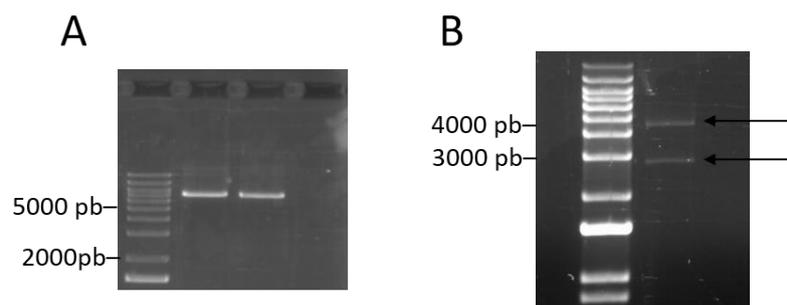


Figura 20. Electroforesis en geles de agarosa del proceso de inserción del epítipo 3HA en el plásmido pSK/cDNA2. (A) Producto obtenido tras la PCR circular del plásmido intermedio. (B) Productos obtenidos tras la restricción del plásmido con los enzimas EcoRI/HindIII. La banda superior corresponde al casete 35S:5UTR-3HAP2-3UTR-Popit y la inferior al resto del plásmido psK.

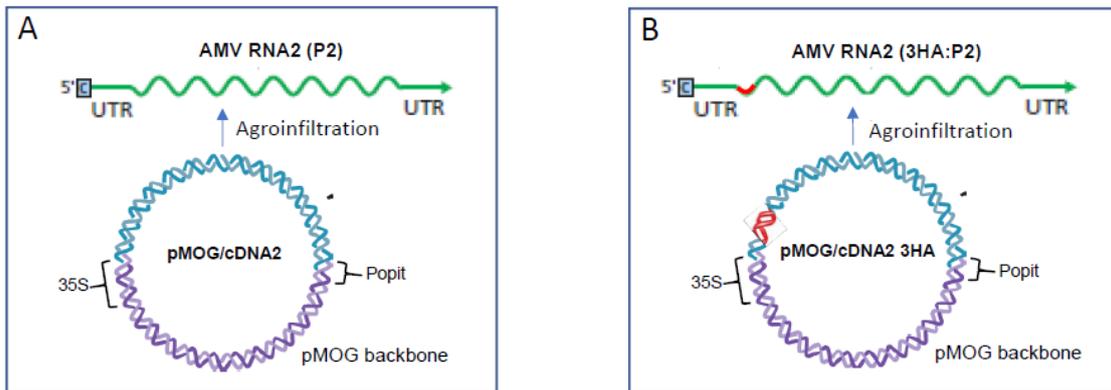


Figura 21. Esquema de los plásmidos binarios conteniendo las versiones de la P2 utilizados en este trabajo. (A) pMOG/cDNA 2 disponible en el laboratorio. (B) pMOG/cDNA2 3HA generado en este TFM que presenta el epítipo 3HA al inicio de ORF de la P2 (en rojo). Se indica la posición del promotor 35S y del terminador Popit.

Se prepararon dos inóculos en medio de agroinfiltración consistentes en: inóculo salvaje (mezcla de los cultivos que expresan pMOG/cDNA1, pMOG/cDNA2 y pMOG/cDNA3) e inóculo mutante: (mezcla de los cultivos que expresan pMOG/cDNA1, pMOG/cDNA2 3HA y pMOG/cDNA3, a una OD600 de 0,025 cada uno) y se infiltraron en plantas de *N. benthamiana* (2 hojas por planta/3 plantas por inóculo). A 4 días post agroinfiltración (dpa) se observaron los síntomas típicos del AMV en hojas sistémicas de plantas infiltradas con el inóculo salvaje (disminución de tamaño y enrollamiento de las hojas), mientras que estos síntomas empezaron a ser visibles a 5 dpa en el inóculo mutante (Figura 22, panel A). A 6 dpa se recogieron hojas sistémicas y se analizó la acumulación de 3HA:P2 mediante western blot. Tal y como se observa en la Figura 22B ninguna de las tres plantas inoculadas con el inóculo mutante parece acumular la proteína 3HAP2 (Figura 22B, carriles 1, 2 y 3).

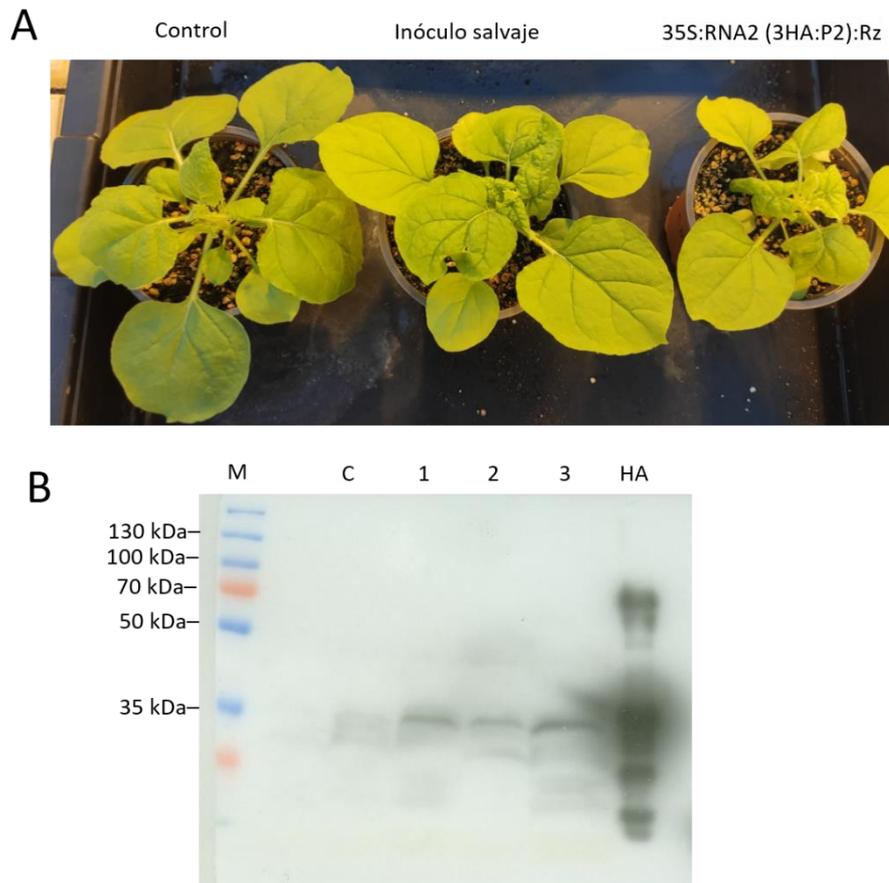


Figura 22. Agroinfiltración y western blot. A) Imagen de plantas de *N. benthamiana* control y agroinfiltradas con el inóculo salvaje y con el casete 35S:RNA2(3HA:P2). B) Western blot de las hojas sistémicas de las plantas infectadas con el inoculo salvaje (carril C) y el inóculo con el casete 35S:RNA2(3HA:P2) (carriles 1, 2 y 3). El carril 4 corresponde a una proteína control que contiene el epítipo HA. Carril M muestra el marcador de tamaño de proteínas en kDa.

Los resultados obtenidos indican que la infiltración de plantas con la mezcla de agrobacterium expresando los cDNA1, cDNA2 3HA y cDNA3 acaba siendo infectiva y es capaz de producir síntomas en las hojas sistémicas, aunque no se detecta la etiqueta HA unida a la P2 de AMV. En un trabajo publicado anteriormente se demostró que una P2 modificada de modo que contenía la GFP fusionada a su extremo N- terminal (GFP:P2) era capaz de replicar el virus en protoplastos de *N. benthamiana* (Ibrahim *et al.*, 2012). Nuestros resultados sugieren que durante el proceso infectivo el AMV se desprendería de la secuencia 3HA de modo que la P2 revertiría al genotipo salvaje. En futuros experimentos se analizará si el tamaño y/o la localización del epítipo influyen en el desprendimiento de éste. Para ello, se construirán versiones de la P2 en las que se reducirá el número de epítopos HA introducidos y/o se insertaran en el extremo 3' de la proteína.

5. CONCLUSIONES

A partir de la realización del presente Trabajo Final de Máster pueden establecerse las siguientes conclusiones:

1. A diferencia de lo observado previamente para la ALKBH9B, la desmetilasa ALKBH10B no parece tener un papel en el ciclo infeccioso de AMV
2. En estadios iniciales de la infección por TRV y TCV, la ausencia de las proteínas borradoras (ALKBH9B) y lectoras (ECT2 Y ECT5), dio lugar a una mayor acumulación de los genomas virales, siendo estos mutantes más susceptibles a la infección.
3. La mayor susceptibilidad de los mutantes *ect2* y *ect5* es respaldada por resultados previos obtenidos en el laboratorio frente al AMV. Mientras que, para los mutantes *alkbh9b*, su susceptibilidad puede deberse a un efecto indirecto de la desregulación de m⁶A.
4. En estadios tardíos, concretamente a 16 dpi, en las plantas infectadas por TCV se observa una mayor acumulación viral en los tallos de los mutantes *alkbh9b*, por lo que la ausencia de la desmetilasa parece favorecer el transporte de TCV hacia los tallos florales.
5. La generalización del efecto de m⁶A sobre el destino de distintos virus de RNA de plantas es discutible, debido a los resultados obtenidos en cuanto a la acción de las proteínas borradoras ALKBH9B. Sin embargo, en cuanto a la acción de las proteínas lectoras ECT2 y ECT5, se han obtenido los mismos resultados que en la previa literatura científica, por lo que, en este caso, quizás sí nos encontramos ante un mecanismo de defensa universal frente a virus de RNA de plantas.
6. La técnica northern blot no es efectiva en la cuantificación del TuMV, debido a su degradación durante el proceso de detección. Por lo que debería analizarse mediante otras técnicas como qPCR.
7. La inserción del epítipo HA por triplicado en la P2 de AMV no interfiere sobre su capacidad infecciosa, aunque su detección fue nula en los extractos proteicos. Por tanto, en futuros estudios debería modificarse el tamaño y/o la localización del epítipo para lograr una exitosa inmunoprecipitación.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. J., Heinze, C., Jackson, A., Kreuze, J., Macfarlane, S. A., & Torrance, L. (2011). Family Virgaviridae. *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1139-1162.
- Alvarado-Marchena L, Martínez-Pérez M, Úbeda JR, Pallas V, Aparicio F. Impact of the Potential m⁶A Modification Sites at the 3'UTR of Alfalfa Mosaic Virus RNA3 in the Viral Infection. *Viruses*. 2022; 14(8):1718.
- Amara, U., Shoab, Y. & Kang, H. (2022) ALKBH9C, a potential RNA m⁶A demethylase, regulates the response of Arabidopsis to abiotic stresses and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, 45, 3566– 3581.
- Anderson, S.J., Kramer, M.C., Gosai, S.J., Yu, X., Vandivier, L.E., Nelson, A.D.L., Anderson, Z.D., Beilstein, M.A., Fray, R.G., Lyons, E., and Gregory, B.D. (2018). N⁶-Methyladenosine Inhibits Local Ribonucleolytic Cleavage to Stabilize mRNAs in Arabidopsis. *Cell Rep*. 25: 1146–1157.
- Aparicio, F. and Pallas, V. (2017). The coat protein of Alfalfa mosaic virus interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic acid-dependent defence signaling response. *Molecular Plant Pathology* 18(2):173-186.
- Aparicio, F., Vilar, M., Perez-Payá, E., and Pallás, V. (2003). The coat protein of prunus necrotic ringspot virus specifically binds to and regulates the conformation of its genomic RNA. *Virology* 313: 213–23.
- Aravind, L. and Koonin, E. V. (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol*. 2: research0007.
- Arribas-Hernández, L., Bressendorff, S., Hansen, M.H., Poulsen, C., Erdmann, S., and Brodersen, P. (2018). An m⁶A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 30: 952–967.
- Arribas-Hernández, L., and Brodersen, P. (2020a). Occurrence and functions of m⁶A and other covalent modifications in plant mRNA. *Plant Physiol*. 182, 79–96.
- Arribas-Hernández, L., Simonini, S., Hansen, M. H., Paredes, E. B., Bressendorff, S., Dong, Y., Østergaard, L., & Brodersen, P. (2020b). Recurrent requirement for the m⁶A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 147(14), dev189134.
- Blake, J.A., Lee, K.W., Morris, T.J., & Elthon, T.E. (2007). Effects of turnip crinkle virus infection on the structure and function of mitochondria and expression of stress proteins in turnips. *Physiologia Plantarum*, 129, 698-706.
- Boccalletto, P., MacHnicka, M.A., Purta, E., Pitkowski, P., Baginski, B., Wirecki, T.K., et al. (2018). MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Res*. 46, D303–D307.
- Bol, J. F. (2008). Alfalfa Mosaic Virus. In B. W. J. Mahy, & M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), *Encyclopedia of Virology (Third Edition)* (pp. 81-87). Academic Press.
- Bujarski, J., Gallitelli, D., García-Arenal, F., Pallás, V., Palukaitis, P., Reddy, M. K., Wang, A., & ICTV Report Consortium (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae. *The Journal of general virology*, 100(8), 1206–1207.
- Carrington, J. C., Heaton, L. A., Zuidema, D., Hillman, B. I., & Morris, T. J. (1989). The genome structure of turnip crinkle virus. *Virology*, 170(1), 219-226.
- Courtney, D.G., Kennedy, E.M., Dumm, R.E., Bogerd, H.P., Tsai, K., Heaton, N.S., and Cullen, B.R. (2017). Epitranscriptomic Enhancement of Influenza A Virus Gene Expression and Replication. *Cell Host Microbe* 22: 377–86.
- Dang, W., Xie, Y., Cao, P., Xin, S., Wang, J., Li, S., et al. (2019). N⁶-methyladenosine and viral infection. *Front. Microbiol*. 10, 417.

- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10), 3971–3975.
- Duan, H. C., Wei, L. H., Zhang, C., Wang, Y., Chen, L., Lu, Z., et al. (2017). ALKBH10B is an RNA N6-methyladenosine demethylase affecting arabidopsis floral transition. *Plant Cell* 29, 2995–3011.
- Donze, T., Qu, F., Twigg, P., & Morris, T. J. (2014). Turnip crinkle virus coat protein inhibits the basal immune response to virus invasion in Arabidopsis by binding to the NAC transcription factor TIP. *Virology*, 449, 207-214.
- Escriu, F., Vidal, M.B., Arteaga, M.L., and Vargas-Mainar, M.E. (2011). Síntomas, dispersión y daños del virus del mosaico de la alfalfa. *Vida Rural* 322: 48–52.
- Fedeles, B.I., Singh, V., Delaney, J.C., Li, D., and Essigmann, J.M. (2015). The AlkB family of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenases: Repairing nucleic acid alkylation damage and beyond. *J. Biol. Chem.* 290: 20734–42.
- Gaafar, Y., Sieg-Müller, A., Lüddecke, P., Herz, K., Hartrick, J., Maaß, C., Schuhmann, S., Richert-Pöggeler, K.R. and Ziebell, H. (2019), First report of Turnip crinkle virus infecting garlic mustard (*Alliaria petiolata*) in Germany. *New Disease Reports*, 39: 9-9.
- Garbaczewska, G., Otulak, K., Chouda, M., & Chrzanowska, M. (2012). Ultrastructural studies of plasmodesmatal and vascular translocation of tobacco rattle virus (TRV) in tobacco and potato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34.
- Gokhale, N.S., McIntyre, A.B.R., McFadden, M.J. et al. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host Microbe* 20: 654–665.
- Goldberg, N. (2012). Extension Plant Pathology “News You Can Use.” Available at: www.commanster.edu [Accessed November 21, 2022].
- Hafez, S.L., and Sundararaj, P. 2009. Management of corky ringspot disease of potatoes in the Pacific Northwest. University of Idaho Extension. CIS:1162.
- Hao, H., Hao, S., Chen, H., Chen, Z., Zhang, Y., Wang, J., Wang, H., Zhang, B., Qiu, J., Deng, F., and Guan, W. (2019). N6-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication. *Nucleic Acids Res.* 47: 362–374.
- Harrison, B. D., & Nixon, H. L. (1959). Some properties of infective preparations made by disrupting tobacco rattle virus with phenol. *Journal of General Microbiology*, 21, 591-599.
- He, Y., Li, L., Yao, Y., Li, Y., Zhang, H., and Fan, M. (2021). Transcriptome-wide N6-methyladenosine (m6A) methylation in watermelon under CGMMV infection. *BMC Plant Biol.* 21, 1–14. doi:10.1186/S12870-021-03289-8/FIGURES/7.
- Hull, R. (2013). *Matthews’ Plant Virology*. Academic Press.
- Ibrahim, A., Hutchens, H. M., Berg, R. H., & Loesch-Fries, L. S. (2012). Alfalfa mosaic virus replicase proteins, P1 and P2, localize to the tonoplast in the presence of virus RNA. *Virology*, 433(2), 449–461.
- Imam, H., Khan, M., Gokhale, N.S., McIntyre, A.B.R., Kim, G.-W., Jang, J.Y., Kim, S.-J., Mason, C.E., Horner, S.M., and Siddiqui, A. (2018). N6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA differentially regulates the viral life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115: 8829–8834.
- Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Annual review of virology*, 6(1), 387–409.
- Kawai, Y., Ono, E., and Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *Plant J.* 78, 328–343. doi:10.1111/tpj.12479.
- Kawakubo, S., Tomitaka, Y., Tomimura, K., Koga, R., Matsuoka, H., Uematsu, S., Yamashita, K., Ho, S. Y. W., & Ohshima, K. (2022). The recombinogenic history of turnip mosaic potyvirus reveals its introduction to Japan in the 19th century. *Virus evolution*, 8(2), veac060.
- Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J.J., Vågbø, C.B., Geula, S., Hanna, J.H., Black, D.L., Darnell, J.E., and Darnell, R.B. (2017). m6A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes Dev.* 31: 990–1006.

- Kegler, H., Fuchs, E., Grüntzig, M., & Schwarz, S. (1998). Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta virologica*, 42 4, 200-15.
- Kondo, H.; Hirano, S.; Chiba, S.; Andika, I.B.; Hirai, M.; Maeda, T.; Tamada, T. Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus Benyvirus, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Res.* 2013, 177, 75–86.
- Krug, R. M., Morgan, M. A., and Shatkin, A. J. (1976). Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. *J. Virol.* 20, 45–53. doi:10.1128/JVI.20.1.45-53.1976.
- Lecoq H. (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac: 1892 ou 1898? [Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?]. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 324(10), 929–933.
- Lichinchi, G., Zhao, B.S., Wu, Y., Lu, Z., Qin, Y., He, C., and Rana, T.M. (2016b). Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* 20: 666–673.
- Li, J., Ding, J., Chen, M., Chen, K., Zou, Y., Xu, X., Zhang, D., Yu, X., & Ding, Z. (2022). Transcriptome-wide N6-methyladenosine modification profiling of mRNAs during infection of Newcastle disease virus in chicken macrophages. *Virus research*, 323, 198993.
- Li, X. H., & Simon, A. E. (1989). Symptom intensification on cruciferous hosts by the virulent satellite RNA of turnip crinkle virus. *Phytopathology* 1990.
- Li, Z., Shi, J., Yu, L., Zhao, X., Ran, L., Hu, D., et al. (2018). N 6 -methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virol. J.* 15. doi:10.1186/S12985-018-0997-4.
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A.O., Meydan, C., Mason, C.E., and Jaffrey, S.R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat. Methods* 12: 767–72.
- Lister, R. M., 1958: Some turnip viruses in Scotland and their effect on yield. *Plant Pathology* 7, 144-146.
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., and Pan, T. (2015). N6 -methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature* 518: 560–564.
- Locatelli, E.A., Allen, T.C., Koepsell, P.A. et al. Diagnosis of tobacco rattle virus (TRV) and other viruses in weed and rotation crops in potato fields. *American Potato Journal* 55, 249–257 (1978).
- Luo, G.Z., Macqueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L.C., Lu, Z., Liu, J., Chen, K., Jia, G., Bergelson, J., and He, C. (2014). Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Commun.* 28: 5630.
- Makkouk, K., Pappu, H., and Kumari, S. G. (2012). Virus Diseases of Peas, Beans, and Faba Bean in the Mediterranean Region. *Adv. Virus Res.* 84, 367–402.
- Martínez-Pérez, M. (2020). Involvement of the host RNA N 6-adenosine methylation (m6A) pathway in the infection cycle of Alfalfa mosaic virus. *Doctoral Thesis*.
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., Arribas-Hernández, L., Due Tankmar, M., Rennie, S., Brodersen, P., & Pallas, V. (2022). Plant YTHDF proteins are direct effectors of antiviral immunity against an m6A-containing RNA virus. *bioRxiv*, 2022.10.19.512835.
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Sánchez-Navarro, J. A., and Pallás, V. (2017). *Arabidopsis* m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m6A abundance in its genomic RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 10755–10760.
- Martínez-Pérez, M., Gómez-Mena, C., Alvarado-Marchena, L., Nadi, R., Micol, J. L., Pallas, V., et al. (2021). The m6A RNA Demethylase ALKBH9B Plays a Critical Role for Vascular Movement of Alfalfa Mosaic Virus in *Arabidopsis*. *Front. Microbiol.* 12.
- Mcgavin, W.J.; Mcmenemy, L.S.; Macfarlane, S.A. The complete sequence of a UK strain of black raspberry necrosis virus. *Arch. Virol.* 2010, 155, 1897–1899.
- Meyer, K.D. and Jaffrey, S.R. (2017). Rethinking m 6 A Readers, Writers, and Erasers . *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33: 319–342.

- Mielecki, D., Zugaj, D., Muszewska, A., Piwowarski, J., Chojnacka, A., Mielecki, M., Nieminuszczy, J., Grynberg, M., and Grzesiuk, E. (2012). Novel AlkB dioxygenases-alternative models for in silico and in vivo studies. *PLoS One* 7: e30588.
- Moreno, A., & Fereres, A. (2012). Virus diseases in lettuce in the Mediterranean basin. *Advances in virus research*, 84, 247–288.
- Navarro, J.A. and Pallás, V. (2017). An update on the intracellular trafficking of carmoviruses. *Front. Plant Sci.* 8, e1801.
- Nellist, C. F., Ohshima, K., Ponz, F., & Walsh, J. A. (2022). Turnip mosaic virus, a virus for all seasons. *Annals of Applied Biology*, 180(3), 312–327.
- Nichols, J. L., & Welder, L. (1981). Nucleotides adjacent to N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Science Letters*, 21(1), 75-81.
- Otulak, K., Chouda, M., Bujarski, J., & Garbaczewska, G. (2015). The evidence of Tobacco rattle virus impact on host plant organelles ultrastructure. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 70, 7–20.
- Pallas, V. (2007). *En el límite de la vida. Un siglo de virus*. Ed. La Voz de Galicia S.A. 124pp. ISBN: 978-84-9757-238-5. Reeditado por la Universidad Politécnica de Valencia (2008), 154 pp; ISBN 978-84-8363-350-2.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A., and Scott, S.W. (2013). The Molecular Biology of Ilarviruses. *Adv. Virus Res.* 87: 139–81.
- Pallas, V., Mas, P. and Sanchez-Navarro, J.A. (1998). Detection of plant RNA viruses by non-isotopic dot-blot hybridization. *Plant Virology Protocols: from virus isolation to transgenic resistance*. Humana Press Inc. G.D. Foster & S.C. Taylor Eds. Totowa, NJ.81, 461-468.
- Park, O.H., Ha, H., Lee, Y., Boo, S.H., Kwon, D.H., Song, H.K., and Kim, Y.K. (2019). Endoribonucleolytic Cleavage of m6A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex. *Mol. Cell* 74: 494–507.
- Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). m(6)A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620), 369–373.
- Ping, X.L., Sun, B., Wang, L. et al. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Res.* 24: 177–89.
- Reichel, M., Liao, Y., Rettel, M., Ragan, C., Evers, M., Alleaume, A.M., Horos, R., Hentze, M.W., Preiss, T., and Millar, A.A. (2016). In planta determination of the mRNA-binding proteome of arabidopsis etiolated seedlings. *Plant Cell* 28: 2435–52.
- Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., et al. (2017). Identification of factors required for m6A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytol.* 215, 157–172.
- Sánchez, F., Martínez-Herrera, D., Aguilar, I., & Ponz, F. (1998). Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host Arabidopsis thaliana and local lesion hosts. *Virus research*, 55(2), 207–219.
- Sastry, K. S., Mandal, B., Hammond, J., Scott, S. W., and Bridson, R. W. (2019). *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids*. Springer Nature.
- Schultz, E. S. (1921) 'A Transmissible Mosaic Disease of Chinese Cabbage, Mustard, and Turnip', *Journal of Agricultural Research*, 22: 173–8. 171.
- Simon, A. E. (2015). 3'UTRs of carmoviruses. *Virus Research*, 206, 27-36.
- Shen, L., Liang, Z., Gu, X., Chen, Y., Teo, Z. W. N., Hou, X., et al. (2016). N6-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis. *Dev. Cell* 38, 186–200.
- Scutenaire, J., Deragon, J.M., Jean, V., Benhamed, M., Raynaud, C., Favory, J.J., et al. (2018). The YTH Domain Protein ECT2 Is an m6A Reader Required for Normal Trichome Branching in Arabidopsis. *Plant Cell* 30, 986–1005.
- Sylvester E. 1954. Aphid transmission of nonpersistent plant viruses with special reference to the Brassica nigra virus. *Hilgardia* 23(3):53-98.
- Tsai, K., Courtney, D.G., and Cullen, B.R. (2018). Addition of m6A to SV40 late mRNAs enhances viral structural gene expression and replication. *PLoS Pathog.* 14: 1–23.

- van den Born, E., Omelchenko, M. V., Bekkelund, A., Leihne, V., Koonin, E. V., Dolja, V. V., et al. (2008). Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. *Nucleic Acids Res.* 36, 5451–5461.
- Verma GS, Varma JP (1959). Occurrence of a strain of Turnip crinkle virus in India. *Indian J Microbiol* 1:37–41.
- Walsh, J. A., & Jenner, C. E. (2002). Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular plant pathology*, 3(5), 289–300.
- Weimer, J.L. (1931). Alfalfa mosaic. *Phytopathology* 21: 122–3.
- Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C., Wang, J., Jiao, F., Liu, H., Yang, P., Tan, L., Lan, F., Shi, Y. G., He, C., Shi, Y., & Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m⁶A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular cell*, 69(6), 1028–1038.e6.
- Xenophontos, S., Robinson, D.J., Dale, M.F.B. et al. Evidence for persistent, symptomless infection of some potato cultivars with tobacco rattle virus. *Potato Res* 41, 255–265 (1998).
- Yue, H., Nie, X., Yan, Z., and Weining, S. (2019). N6-methyladenosine regulatory machinery in plants: composition, function and evolution. *Plant Biotechnol. J.* 17, 1194–1208.
- Yue, J., Wei, Y., & Zhao, M. (2022). The Reversible Methylation of m6A Is Involved in Plant Virus Infection. *Biology*, 11(2), 271.
- Yue, J., Wei, Y., Sun, Z., Chen, Y., Wei, X., Wang, H., Pasin, F., & Zhao, M. (2022). AlkB RNA demethylase homologues and N6 -methyladenosine are involved in Potyvirus infection. *Molecular plant pathology*, 23(10), 1555–1564.
- Zhang M, Bodi Z, Mackinnon K, Zhong S, Archer N, Mongan NP, Simpson GG & Fray RG (2022) Two zinc finger proteins with functions in m6A writing interact with HAKAI. *Nat Commun* 13: 1127.
- Zhang, K., Zhuang, X., Dong, Z., Xu, K., Chen, X., Liu, F., et al. (2021b). The dynamics of N6-methyladenine RNA modification in interactions between rice and plant viruses. *Genome Biol.* 22.
- Zhang, T. Y., Wang, Z. Q., Hu, H. C., Chen, Z. Q., Liu, P., Gao, S. Q., et al. (2021c). Transcriptome-Wide N6-Methyladenosine (m6A) Profiling of Susceptible and Resistant Wheat Varieties Reveals the Involvement of Variety-Specific m6A Modification Involved in Virus-Host Interaction Pathways. *Front. Microbiol.* 12.
- Zhao, B. S., Roundtree, I. A., and He, C. (2016). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 31–42.
- Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y. et al. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Mol. Cell* 49: 18–29.
- Zheng, H., Li, S., Zhang, X., and Sui, N. (2020a). Functional Implications of Active N6-Methyladenosine in Plants. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 291.
- Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., and Fray, R.G. (2008). MTA Is an Arabidopsis Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *Plant Cell Online* 20: 1278–1288.
- Zhou, L., Gao, G., Tang, R., Wang, W., Wang, Y., Tian, S., & Qin, G. (2022). m6 A-mediated regulation of crop development and stress responses. *Plant biotechnology journal*, 20(8), 1447–1455.
- Zhou, L., Tian, S. & Qin, G. (2019). RNA methylomes reveal the m⁶A-mediated regulation of DNA demethylase gene SIDML2 in tomato fruit ripening. *Genome Biol* 20, 156.
- Zubareva, I. A, Elena, G., Vinogradova, S., Gribova, T., Monakhos, S., & Ignatov, A. (2013). The development of turnip mosaic virus resistant doubled haploid lines of Brassica napus L. *Sel'Skokhozyaistvennaya Biologiya*, 122-125.

ANEXO I

A



B



C



Figura suplementaria 1. Plantas de Arabidopsis infectadas con TRV. Columnas 1 y 2 plantas WT; columnas 3 y 4 plantas mutantes *alkbh9b*; columnas 5 y 6 plantas mutantes *ect2-1/5-3*. A) Plantas a 4 dpi. B) Plantas a 10 dpi. C) Plantas a 16 dpi.

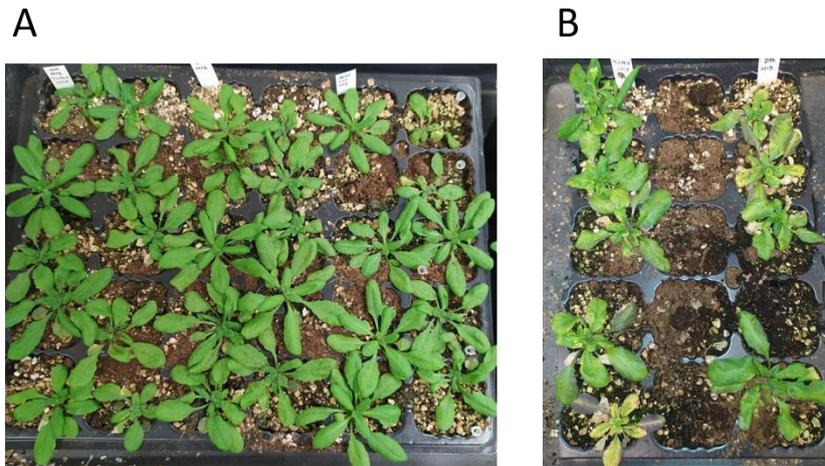


Figura Suplementaria 2. A) Plantas de Arabidopsis infectadas con TuMV a 10 dpi. Columnas 1 y 2 plantas WT; columnas 3 y 4 plantas mutantes *alkbh9b*; columnas 5 y 6 plantas mutantes *ect2-1/5-3*. B) Plantas infectadas a 16 dpi.

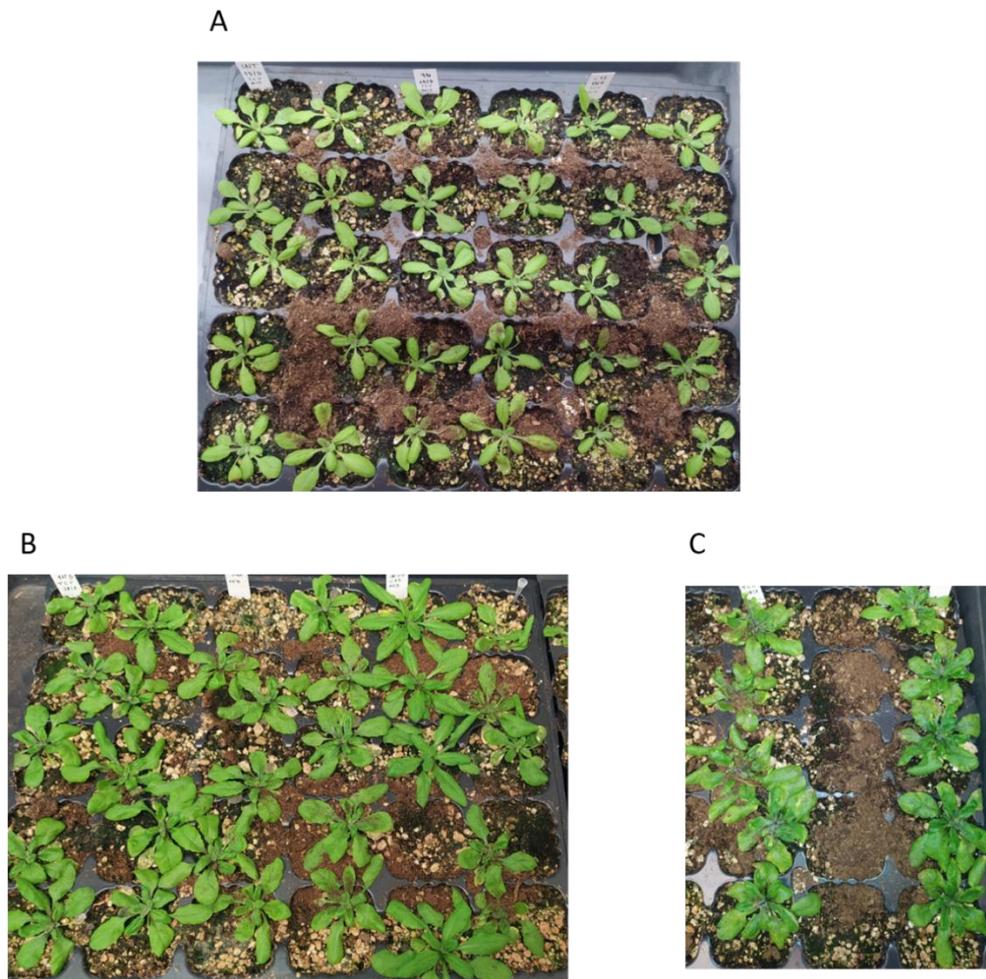


Figura suplementaria 3. Plantas de Arabidopsis infectadas con TCV. Columnas 1 y 2 plantas WT; columnas 3 y 4 plantas mutantes *alkbh9b*; columnas 5 y 6 plantas mutantes *ect2-1/5-3*. A) Plantas a 4 dpi. B) Plantas a 10 dpi. C) Plantas a 16 dpi.

ANEXO II

RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.			✓	
ODS 2. Hambre cero.			✓	
ODS 3. Salud y bienestar.		✓		
ODS 4. Educación de calidad.				✓
ODS 5. Igualdad de género.				✓
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				✓
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				✓
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.			✓	
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.			✓	
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				✓
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.			✓	
ODS 12. Producción y consumo responsables.			✓	
ODS 13. Acción por el clima.			✓	
ODS 14. Vida submarina.				✓
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		✓		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				✓
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				✓