



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Nuevos conocimientos sobre patogénesis viroidal:  
alteración de la biogénesis de ribosomas e interferencia  
con el eje SnRK1-TOR.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Silva Valencia, Samanta

Tutor/a: Rodrigo Bravo, Ismael

Director/a Experimental: BELDA PALAZON, BORJA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



## **MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS**

**Nuevos conocimientos sobre patogénesis viroidal:  
alteración de la biogénesis de ribosomas e interferencia  
con el eje SnRK1-TOR**

### **TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Curso:** 2021/2022

**Realizado por:**

Samanta Silva Valencia

**Directores:**

Borja Belda-Palazón

Ismael Rodrigo Bravo

Valencia, enero de 2023

# RESUMEN

Los viroides son pequeños patógenos vegetales con capacidad autorreplicativa, constituidos por una cadena de RNA monocatenaria circular con una elevada estructura secundaria. Los viroides no tienen capacidad codificante; sin embargo, pueden infectar y causar enfermedades graves en plantas susceptibles. Los estudios de patogénesis viroidal se han centrado principalmente en la capacidad de estos patógenos de inducir silenciamiento génico, pero la relación precisa entre estos u otros procesos todavía por descubrir y la sintomatología viroidal sigue siendo desconocida.

Recientemente, en nuestro laboratorio hemos observado que las infecciones viroidales causan estrés ribosomal en plantas de tomate al interferir en el procesamiento de los pre-RNA ribosómicos (pre-rRNA) alterando, por tanto, la fisiología y el metabolismo de la planta. En este sentido, numerosos estudios implican a las quinasas de actividad antagonista TOR (*Target of Rapamycin*) y SnRK1 (*Sucrose non-fermenting-Related protein Kinase 1*), que son reguladores maestros del metabolismo celular, en procesos de patogénesis vegetal como infecciones virales y bacterianas.

En este Trabajo de Final de Máster se ha profundizado en el papel del estrés ribosomal causado por la patogénesis viroidal, a través del estudio de posibles alteraciones en el patrón de expresión de la fibrilarina, componente fundamental del complejo U3 snoRNP (*U3 small nucleolar ribonucleoprotein*), que es necesario para el procesamiento de los pre-rRNA. De esta forma, hemos observado que la infección del viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) altera la expresión de la fibrilarina en plantas de *Nicotiana benthamiana* incrementando transitoriamente la expresión de esta proteína. Además, en este trabajo se han investigado nuevos mecanismos moleculares implicados en la patogénesis viroidal, a través del estudio de la interacción del viroide PSTVd con las rutas de señalización reguladas por las quinasas TOR y SnRK1 en plantas de tomate. A través de estos estudios, se ha observado que, aparentemente, el viroide no altera la actividad ni la regulación transcripcional mediada por SnRK1. En cambio, es capaz de inhibir el proceso de autofagia selectiva. Adicionalmente, se ha comprobado que la inhibición de TOR produce una reducción de la sintomatología ocasionada por la infección viroidal, recuperándose el flujo autofágico y disminuyendo la acumulación del viroide en las plantas de tomate.

**Palabras clave:** viroide; estrés ribosomal; autofagia; SnRK1; TOR

# ABSTRACT

Viroids are small, self-replicating plant pathogens consisting of a circular single-stranded RNA strand with a high secondary structure. Viroids have no coding capacity; however, they can infect and cause severe disease in susceptible plants. Studies of viroid pathogenesis have mainly focused on the ability of these pathogens to induce gene silencing, but the precise relationship between these or other yet to be discovered processes and viroid symptomatology remains unknown.

We have recently observed in our laboratory that viroid infections cause ribosomal stress in tomato plants by interfering with ribosomal pre-rRNA (pre-rRNA) processing thereby altering plant physiology and metabolism. In this sense, numerous studies implicate the antagonistic kinases TOR (Target of Rapamycin) and SnRK1 (Sucrose non-fermenting-Related protein Kinase 1), which are master regulators of cellular metabolism, in plant pathogenesis processes such as viral and bacterial infections.

In this Master's Thesis we have focused on the role of ribosomal stress caused by viroid pathogenesis, through the study of possible alterations in the expression pattern of fibrillarin, a major component of the U3 snoRNP (U3 small nucleolar ribonucleoprotein) complex, which is necessary for the pre-rRNA processing. Thus, we have observed that potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection alters fibrillarin expression in *Nicotiana benthamiana* plants, transiently increasing the expression of this protein. In addition, this work has investigated new molecular mechanisms involved in viroid pathogenesis, through the study of the interaction of the PSTVd viroid with the signaling pathways regulated by TOR and SnRK1 kinases in tomato plants. Through these studies, it has been observed that the viroid apparently does not alter the activity nor transcriptional regulation mediated by SnRK1. Nevertheless, it can inhibit the process of selective autophagy. Importantly, it has been found that TOR inhibition produces a reduction of the symptomatology caused by viroid infection, recovering the autophagic flux and reducing the viroid accumulation in tomato plants.

**Keywords:** viroid; ribosomal stress; autophagy; SnRK1; TOR

## RESUM

Els viroids són xicotets patògens vegetals amb capacitat autorreplicativa, constituïts per una cadena de RNA monocatenaria circular amb una elevada estructura secundària. Els viroids no tenen capacitat codificant; no obstant això, poden infectar i causar malalties greus en plantes susceptibles. Els estudis de patogènesis viroidal s'han centrat principalment en la capacitat d'aquests patògens d'induir silenciament gènic, però la relació precisa entre aquests o altres processos encara per descobrir i la simptomatologia viroidal continua sent desconeguda.

Recentment, en el nostre laboratori hem observat que les infeccions viroidals causen estrés ribosomal en plantes de tomaca en interferir en el processament dels pre-RNA ribosòmics (pre-rRNA) alterant, per tant, la fisiologia i el metabolisme de la planta. En aquest sentit, nombrosos estudis impliquen les cinases d'activitat antagònica TOR (*Target of Rapamycin*) i SnRK1 (*Sucrose senar-fermenting-Related protein Kinase 1*), que són reguladors mestres del metabolisme cel·lular, en processos de patogènesis vegetal com a infeccions virals i bacterianes.

En aquest Treball de Final de Màster s'ha aprofundit en el paper de l'estrés ribosomal causat per la patogènesis viroidal, a través de l'estudi de possibles alteracions en el patró d'expressió de la fibrilarina, component fonamental del complex U3 snoRNP (*U3 small nucleolar ribonucleoprotein*), que és necessari per al processament dels pre-rRNA. D'aquesta manera, hem observat que la infecció del viroid del tubercle fusiforme de la creïlla (PSTVd) altera l'expressió de la fibrilarina en plantes de *Nicotiana benthamiana* produint un increment transitori de l'expressió d'aquesta proteïna. A més, en aquest treball s'han investigat nous mecanismes moleculars implicats en la patogènesis viroidal, a través de l'estudi de la interacció del viroid PSTVd amb les rutes de senyalització regulades per les cinases TOR i SnRK1 en plantes de tomaca. A través d'aquests estudis, s'ha observat que aparentment el viroid no altera l'activitat ni la regulació transcripcional mediada per SnRK1. No obstant això, és capaç d'inhibir el procés d'autofàgia selectiva. Adicionalment, s'ha comprovat que la inhibició de TOR produeix una reducció de la simptomatologia ocasionada per la infecció viroidal, recuperant-se el flux autofàgic i disminuint l'acumulació del viroid en les plantes de tomaca.

**Paraules clau:** viroid; estrés ribosomal; autofàgia; SnRK1; TOR

# ÍNDICE GENERAL

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| 1.1   | La respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos.....   | 1  |
| 1.2   | Los viroides .....  | 2  |
| 1.2.1 | El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd) .....   | 4  |
| 1.3   | Los viroides y el estrés ribosomal .....  | 4  |
| 1.4   | Las quinasas TOR ( <i>Target of Rapamycin</i> ) y SnRK1 ( <i>Sucrose non-Fermenting Related Kinase1</i> ) ..... | 6  |
| 1.5   | El eje SnRK1-TOR y su función durante el estrés biótico.....  | 7  |
| 1.6   | El papel de la autofagia en respuesta al estrés biótico .....   | 7  |
| 2     | OBJETIVOS .....   | 9  |
| 3     | MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 10 |
| 3.1   | Material vegetal y condiciones de cultivo .....   | 10 |
| 3.1.1 | Germinación .....   | 10 |
| 3.1.2 | Condiciones de cultivo en invernadero.....  | 10 |
| 3.2   | Material microbiológico.....  | 10 |
| 3.3   | Inoculación del viroide en plantas de tomate o tabaco .....   | 11 |
| 3.4   | Expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .....  | 11 |
| 3.5   | Microscopía confocal de fluorescencia .....   | 12 |
| 3.6   | Tratamiento con inhibidores de TOR (Torin2 Y AZD8055) .....   | 12 |
| 3.7   | Manipulación de ácidos nucleicos .....  | 13 |
| 3.7.1 | Extracción de RNA de plantas .....  | 13 |
| 3.7.2 | Retrotranscripción.....   | 13 |
| 3.7.3 | Electroforesis de DNA de plantas.....   | 13 |
| 3.7.4 | Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR) y cuantitativa (RT-qPCR).<br>.....                        | 14 |
| 3.8   | Manipulación de proteínas.....  | 14 |
| 3.8.1 | Extracción y separación de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....                                   | 14 |
| 3.8.2 | Transferencia de proteínas del gel de SDS-PAGE a membrana .....   | 15 |
| 3.8.3 | Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana .....   | 15 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 3.9  | Transformación genética de plantas de tomate.....  | 15 |
| 3.10 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 16 |
| 4    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 17 |
| 4.1  | Estudio del efecto del viroide en la biogénesis ribosomal. ....  | 17 |
| 4.2  | Estudio de la actividad de SnRK1 y TOR en plantas de tomate infectadas por PSTVd                                 | 19 |
| 4.3  | Estudio del papel de la autofagia en la patogénesis viroidal.....  | 21 |
| 4.4  | Estudio de la inhibición de TOR en la sintomatología viroidal y el flujo autofágico<br>mediado por viroide. .... | 22 |
| 4.5  | Generación de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de SnRK1 .....                                | 25 |
| 4.6  | Una nueva perspectiva de la patogénesis viroidal .....   | 27 |
| 5    | CONCLUSIONES .....   | 28 |
| 6    | BIBLIOGRAFÍA.....  | 29 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Modelo en <i>zig-zag</i> ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas. ....   | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la estructura secundaria de PSTVd.....   | 3  |
| <b>Figura 3.</b> Diferentes vistas de la organización nucleolar.....  | 5  |
| <b>Figura 4.</b> SnRK1 y TOR son complejos de proteína quinasa que regulan de forma antagónica el crecimiento y el desarrollo en respuesta al aporte de energía. ....   | 6  |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo del proceso de transformación de tomate. ....  | 16 |
| <b>Figura 6.</b> El viroide podría afectar al procesamiento de los pre-rRNA a través de su interferencia con la fibrilarina del complejo U3 snoRNP. ....  | 18 |
| <b>Figura 7.</b> La infección de PSTVd no altera la señalización canónica de SnRK1 en tomate. ....  | 20 |
| <b>Figura 8.</b> La infección por PSTVd disminuye el flujo autofágico en plantas de tomate. ....  | 22 |
| <b>Figura 9.</b> La inhibición de TOR contrarresta la infección de PSTVd al recuperarse parcialmente el flujo autofágico en plantas de tomate. ....   | 23 |
| <b>Figura 10.</b> Validación <i>in vivo</i> de las construcciones sobreexpresoras ( <i>SISnRK1.1-GFP</i> y <i>SISnRK1.2-GFP</i> ) y silenciadoras de <i>SnRK1.1</i> y <i>SnRK1.2</i> ( <i>amiRSI1</i> , <i>amiRSI2</i> y <i>amiRSI3</i> ) mediante expresión transitoria en <i>N. bethamiana</i> . .... | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Nuevos conocimientos sobre patogénesis viroidal .....   | 27 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>A. tumefaciens</i> utilizadas en este trabajo para expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> .....   | 11 |
| <b>Tabla 2.</b> Composición de las mezclas de <i>A. tumefaciens</i> infiltradas en hojas de <i>N. benthamiana</i> . Se indica la OD <sub>600</sub> final en la mezcla de cada una de las cepas..... | 12 |
| <b>Tabla 3.</b> Condiciones de las imágenes confocales para la visualización de las proteínas fluorescentes GFP y RFP.....  | 12 |
| <b>Tabla 4.</b> Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa .....   | 14 |
| <b>Tabla 5.</b> Secuencias de los oligonucleótidos empleados el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.....   | 14 |

# ABREVIATURAS

**ETI:** Effector-Triggered Immunity

**ETS:** Effector Triggered Susceptibility

**FIB:** Fibrilarina

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**HR:** Hypersensitive Reaction

**nt:** nucleótidos

**PAGE:** PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

**PAMPs:** Pathogen-Associated Molecular Patterns

**pb:** pares de bases

**PRRs:** Pattern Recognition Receptors

**PSTVd:** Potato spindle tuber viroid

**PTI:** PAMP Triggered Immunity

**RBFs:** factores de biogénesis de ribosomas

**RFP:** Red Fluorescent Protein

**snoRNAs:** guide small nucleolar RNAs

**snoRNPs:** small nucleolar ribonucleoprotein particles

**SnRK1:** Sucrose non-Fermenting Related Kinase1

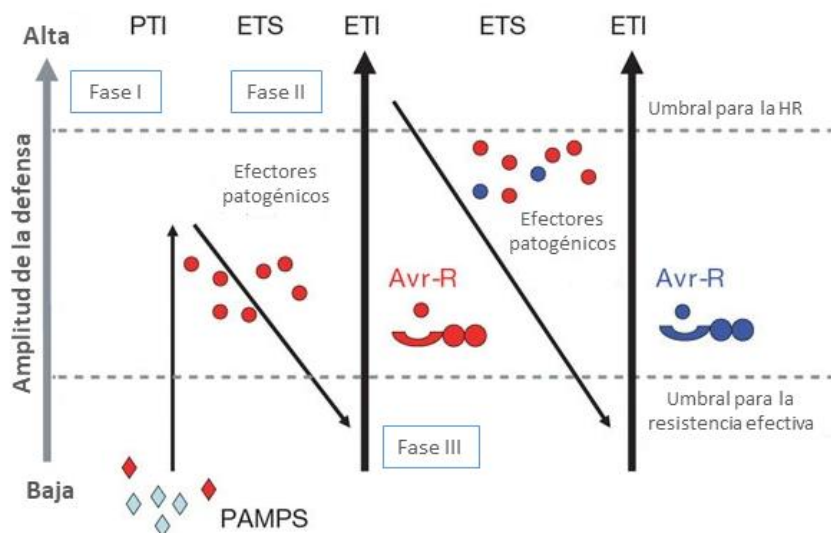
**TOR:** Target of Rapamycin

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 La respuesta defensiva de las plantas frente a patógenos

Las plantas son organismos vulnerables que están expuestos a estreses ambientales tanto bióticos como abióticos, lo que desencadena una disminución de la producción y calidad de los cultivos (Verma et al., 2013). Al tratarse de organismos sésiles, las plantas han llegado a desarrollar mecanismos para combatir estos tipos de estrés (Gull et al., 2019). En concreto, el estrés biótico en las plantas es provocado por herbívoros, mamíferos, insectos y una gran variedad de microorganismos (Verma et al., 2013). El estudio de la interacción entre planta y patógeno tiene un gran interés científico y económico debido a las grandes pérdidas en los cultivos que ocasionan los agentes patogénicos. Un ejemplo es el estudio de la inmunidad vegetal mediante la cual las plantas son capaces de defenderse de las estrategias empleadas por los patógenos para enfermarlas (Gull et al., 2019).

Las plantas cuentan con mecanismos de defensa compuestos por múltiples barreras. Puede considerarse, por un lado, una primera línea de defensa que incluye barreras físicas y químicas ya existentes de manera natural en las plantas (defensa pasiva o general) y, por el otro, un conjunto de reacciones y mecanismos que se activan a causa de una invasión patogénica (resistencia activa) (Verma et al., 2013). La respuesta producida por la planta frente a un patógeno se da a dos niveles. El primero, conocido como PTI (*PAMP Triggered Immunity*), comienza con el reconocimiento de los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) por parte de los receptores no específicos PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) (Figura 1). Como ejemplos de PAMPs se tiene a proteínas como la flagelina bacteriana o carbohidratos como la quitina fúngica. Algunos mecanismos de defensa frente a los PAMPs incluyen el refuerzo de la pared celular, la producción de proteínas PR de defensa o la inducción de genes que codifican proteínas para el establecimiento de barreras físicas para frenar la propagación del patógeno (Jones & Dangl, 2006). El segundo nivel de respuesta se denomina ETI (*Effector-Triggered Immunity*), que es una versión más rápida e intensa que la PTI y se activa por la percepción de efectores ETS (*Effector Triggered Susceptibility*), lo que implica una interacción entre factores de avirulencia (Avr) del patógeno y productos de genes de resistencia (*R*) de la planta. Este tipo de interrelación se conoce como interacción *gen-a-gen* y puede ser del tipo *compatible* o *incompatible*, lo que determinará el desarrollo o no de la enfermedad, respectivamente (Cui et al., 2015; Jones & Dangl, 2006). La interacción incompatible tendrá lugar si se produce un reconocimiento entre los factores R y Avr, lo que provocará la activación de la ETI y se llevarán a cabo respuestas defensivas para evitar la proliferación del patógeno y como consecuencia dará lugar a muerte celular alrededor de la zona de infección, conocida como reacción hipersensible (*Hypersensitive Reaction*, HR), para evitar el avance de la infección (Greenberg & Yao, 2004). Por otro lado, si se da la ausencia de cualquiera de los factores R o Avr, se produce una interacción compatible y, por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad dando lugar a una infección sistémica como la que produce el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) o el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd).



**Figura 1. Modelo en zig-zag ilustrativo del sistema inmunológico de las plantas.** En la Fase I, la planta detecta los PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) a través de PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) lo que promueve la PTI (*PAMP Triggered Immunity*). En la Fase II, los patógenos que han superado la primera barrera, liberan efectores que interfieren con la PTI, produciendo una susceptibilidad desencadenada por los ETS (*Effector Triggered Susceptibility*). En la Fase III, el factor de avirulencia (Avr) es reconocido por el producto de un gen de resistencia (R), y se activa la ETI (*Effector Triggered Immunity*) que induce la respuesta hipersensible (HR) dando lugar a la muerte celular en lugar de la infección (adaptación de Jones & Dangl, 2006).

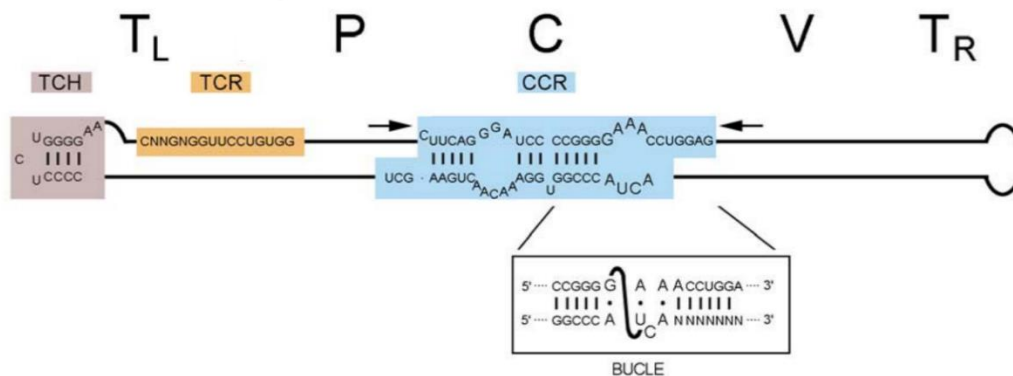
## 1.2 Los viroides

Los viroides son los patógenos más simples conocidos en plantas, pero, a pesar de su simplicidad, cuentan con una gran versatilidad. Su genoma está compuesto por una pequeña (250-400 pb) cadena circular de RNA monocatenario no codificante, que no está protegida por una envoltura ni está encapsulada. Los viroides están formados por un contenido alto de pares CG, lo que aumenta la fidelidad de la replicación debido a que éstos proporcionan una mayor estabilidad que el par AU. Su estructura circular les permite eludir los problemas de la replicación lineal del genoma y elimina la necesidad de *tags* genómicos para completar su replicación. Al no codificar proteínas, su aparición podría ser previa a los ribosomas, pero en todos los casos, su genoma cuenta con suficiente información secuencial y estructural para poder replicarse en las células del huésped y así propagarse dentro de la planta para producir una infección compatible o sistémica que puede causar enfermedades severas en las plantas, de forma similar a las que causaría una infección vírica (Ding, 2009; Flores et al., 2014; Navarro et al., 2021).

Los viroides cuentan con diferentes características biológicas, estructurales y bioquímicas y, en general, se pueden considerar parásitos de la maquinaria transcripcional de los orgánulos (núcleo o cloroplastos), a diferencia de la mayoría de los virus de RNA de plantas, que se les considera como parásitos de la maquinaria traduccional, debido a que se replican en el citoplasma y que, para infectar al huésped, deben expresar las proteínas que codifica su propio genoma (Tsagris et al., 2008). Los viroides se clasifican en dos familias, la familia *Asunviroidae* y la familia *Pospiviroidae*. Los miembros de la primera de ellas se replican y acumulan en los cloroplastos mediante un mecanismo de círculo rodante y, además, están dotados de autoescisión mediada por ribozimas de cabeza de martillo, actuando como RNAs catalíticos. Su ciclo de replicación es considerado simétrico, porque forma un RNA circular de polaridad

positiva (+) (cadena más abundante en la planta) y negativa (-). Su replicación empieza con una RNA polimerasa dependiente de DNA plastídico forzada a aceptar RNA como molde. De forma inmediata, se produce la escisión de cadenas oligoméricas (+) mediada por ribozimas de cabeza de martillo y, finalmente, la cadena se circulariza a través una isoforma plastídica de la tRNA ligasa. Esta familia tiene al viroide del manchado solar del aguacate (*Avocado Sunblotch Viroid*, ASBVd) como miembro más representativo (Di Serio et al., 2018; Flores et al., 2000, 2014).

En cuanto a la familia *Pospiviroidae*, que es en la que se enfoca este trabajo, cuenta con casi 30 especies de viroides conocidas que se replican y acumulan en el núcleo y, al contrario de la anterior familia, no tienen estructuras de autoescisión. Presentan una estructura secundaria en forma de varilla dividida en 5 regiones (Figura 2): el dominio C (*Central*); el dominio P (*Pathogenic*) donde se cree que reside la patogenicidad del viroide y, por tanto, cualquier mutación puede alterar la virulencia; el dominio V (*Variable*) en el que pueden ocurrir mutaciones sin alterar los procesos de infección, y los dominios TL y TR (*Terminal Left* y *Terminal Right*, respectivamente) que forman horquillas debido a que las bases no aparean entre sí. Además, estos viroides cuentan con una región CCR (*Central Conserved Region*) característica de la familia, que es la región responsable de dirigir la maquinaria del huésped para que se dé un correcto procesamiento de las cadenas durante la replicación, por lo que cualquier mutación en esta región puede ser letal para éste. En lo que concierne a su replicación se le considera asimétrica, pero cabe recalcar que la cadena (-) se encuentra localizada en el nucleoplasma y la cadena (+) principalmente en el nucleolo (Ding et al., 2005). La replicación de esta familia también sigue el modelo de círculo rodante, de forma similar a la familia *Asunviroidae*, comenzando con una RNA polimerasa dependiente de DNA nuclear. Posteriormente, la escisión de las cadenas oligoméricas se produce por una RNasa III que actúa en una horquilla *aguas arriba* del CCR mientras que, para la circularización, se emplea una DNA ligasa nuclear. Su miembro más representativo es el viroide del tubérculo fusiforme de la patata (*Potato Spindle Tuber Viroid*, PSTVd) (Di Serio et al., 2021; Ding et al., 2005; Flores et al., 2014).



**Figura 2. Representación esquemática de la estructura secundaria de PSTVd.** TL: dominio terminal izquierdo; TR: dominio terminal derecho; C: dominio central; P: dominio patogénico; V: dominio variable; CCR: región central conservada; bucle E: elemento de estructura terciaria caracterizado en la CCR del PSTVd (Carbonell, 2014).

La infección sistémica producida por viroides sigue un proceso con pasos comunes: entrada a orgánulos (núcleo o cloroplastos), replicación, exportación fuera de los orgánulos, movimiento intercelular, entrada al tejido vascular, desplazamiento a larga distancia por el sistema vascular y su posterior salida (Ding et al., 2005). Como se ha indicado anteriormente, a pesar de ser organismos simples, los viroides son agentes infecciosos responsables de enfermedades severas en plantas, la mayoría en plantas superiores. Por otro lado, estudios

sistémicos han demostrado que el RNA viroidal se puede encontrar de forma asintomática en diversos huéspedes. En general, los viroides son causantes de enfermedades que causan gran impacto a nivel agronómico y, por tanto, económico. Este es el caso de la enfermedad causada por el viroide PSTVd (Gómez et al., 2008), el cual es objeto de estudio en este trabajo.

### 1.2.1 El viroide del tubérculo fusiforme de la patata (PSTVd)

El viroide del tubérculo fusiforme de la patata, cuyo genoma puede constar de 356 a 390 nt, es un patógeno de cuarentena para la patata que está incluido en la lista de la Unión Europea. El huésped principal es la patata, pero de entre 156 especies susceptibles, 139 pertenecen a la familia *Solanaceae*, como el tomate, pimiento y varias especies ornamentales (Arias, 2014). La infección se transmite de forma mecánica, por contacto entre plantas enfermas o transmisión por el uso de herramientas contaminadas, entre otras vías. La sintomatología ocasionada por el PSTVd varía de media a severa, dependiendo de la cepa de viroide, y puede producir una reducción en el rendimiento de un cultivar de hasta un 40%. Algunos de los síntomas visibles que se pueden apreciar son: enroscamiento del ápice del tallo en el sentido de las agujas del reloj, folíolos más alargados y verdes oscuros y tubérculos pequeños y elongados. En tomate algunos de los síntomas son, por ejemplo, hojas deformadas y con clorosis, un acortamiento de los nudos y enanismo (Ling et al., 2013; Owens & Verhoeven, 2009).

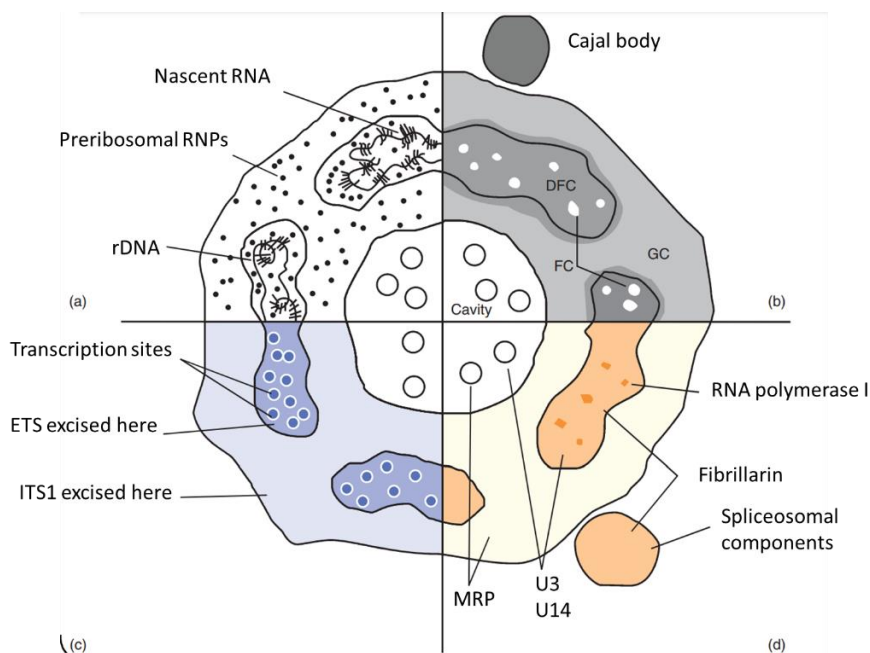
El viroide del tubérculo fusiforme de la patata, además de ser el miembro de referencia de la familia *Pospiviroidae*, es un buen modelo para el estudio viroide-huésped, ya que ha sido ampliamente caracterizado. Por ejemplo, el PSTVd ha sido la base de estudio de la estructura de los viroides, el movimiento sistémico a través del floema y célula a célula a través de plasmodesmos, y para desarrollar plantas resistentes a los viroides, entre otros (Adkar-Purushothama et al., 2015, 2017; Zhu et al., 2002). Teniendo en cuenta que el tomate es uno de los huéspedes naturales de PSTVd, esta planta es una de las más utilizadas a nivel experimental debido a su conveniencia, sus características de importancia agronómica no presentes en otras plantas empleadas en laboratorio y el tiempo relativamente corto de crecimiento y maduración, de entre 4 a 6 semanas (Verhoeven et al., 2004).

## 1.3 Los viroides y el estrés ribosomal

Varios estudios han demostrado que los viroides, a pesar de su naturaleza no codificante, alteran tanto transcripcional como postranscripcionalmente a las células de las plantas. En concreto, se ha observado que la infección viroidal afecta a la expresión de genes que codifican proteínas ribosomales, así como también proteínas relacionadas con el metabolismo y la biogénesis de los ribosomas (Góra-Sochacka et al., 2019; Lisón et al., 2013).

Dado el papel esencial de los ribosomas en la traducción de la información genética, un aspecto crucial para todas las formas de vida es el proceso de biogénesis ribosomal. La biogénesis ribosomal es un proceso esencial en el que los RNA pre-ribosómicos (pre-rRNAs) se sintetizan y procesan para formar los ribosomas 80S maduros, compuestos por la subunidad ribosómica pequeña 40S y la grande 60S (Kressler et al., 2017; Lafontaine & Tollervey, 2001; Xie et al., 2017). La biogénesis de los ribosomas tiene lugar en el nucleolo, el cual, se subdivide en los componentes fibrilar (FC) y denso fibrilar (DFC), donde tiene lugar la transcripción de los rDNA, y los primeros pasos del procesamiento de los pre-rRNAs y ensamblaje de las subunidades ribosómicas; y un componente granular (CG), donde se producen los pasos finales del ensamblaje de las subunidades ribosómicas, pequeña y grande, a partir de los rRNAs maduros y proteínas ribosómicas, antes de ser transportados a través del nucleoplasma extra-

nucleolar hacia el citoplasma (Kalinina et al., 2018). La biogénesis de ribosomas es, en resumen, un proceso altamente complejo, como demuestra la existencia de los más de 200 factores de biogénesis de ribosomas (RBFs) que alberga el nucleolo eucariota (Kressler et al., 2017). Entre estos factores se encuentran los snoRNAs (*guide small nucleolar RNAs*) que junto a su interacción con proteínas forman las llamadas snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein particles*) que son clave en la modificación y el procesamiento del pre-rRNA (Weis et al., 2015). En concreto, el complejo U3 snoRNP, de tipo caja C/D, se ha demostrado esencial para el corte del pre-rRNA para dar lugar a los rRNA maduros. En levadura, el complejo U3 snoRNP está formado por las proteínas *core*, Snu13p/15.5kD, Nop56p, Nop58p, Nop1p (fibrilarina en plantas y humanos) y Rrp9p, además de varias proteínas asociadas que forman el complejo Mpp10-Imp3-Imp4 (Marmier-Gourrier et al., 2011). En plantas, en concreto en *Brassica oleracea*, se ha comprobado la existencia de un complejo U3 snoRNP conteniendo a los ortólogos de Nop1p/fibrilarina, Cbf5p y Nop58p. Este complejo es necesario para el corte P del pre-rRNA para dar lugar al precursor 35S pre-rRNA (Weis et al., 2015).



**Figura 3. Diferentes vistas de la organización nucleolar.** Se ilustra un típico nucleolo de una planta. (a) Posible modelo de la organización de las unidades de transcripción de rDNA en el nucleolo. RNP (*Ribonucleoprotein complex*). (b) Estructura nucleolar. DFC (*Dense Fibrillar Component*), FC (*Fibrillar Component*) y GC (*Granular Component*). (c) Organización de los sitios de transcripción y las zonas de procesamiento de transcripción. ETS (*External transcribed Spacer*), ITS1 (*Internal transcribed Spacer 1*). (d) Localización de algunas proteínas y pequeños RNAs nucleolares (Shaw, 2015).

Promovidos por investigar los efectos moleculares de la patogénesis viroidal en plantas, en 2019 nuestro laboratorio descubrió que los viroides ocasionan estrés ribosomal en plantas de tomate (Cotilli et al. 2019). En concreto, se observó que el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) provocaba un defecto global en el proceso traduccional a causa, en parte, de su interferencia en la biogénesis de ribosomas que se produce en el nucleolo. Estas alteraciones se debían a la interferencia del viroide en el proceso de maduración del rRNA 18S. Curiosamente, el complejo U3 snoRNP también se ha demostrado que es necesario para la maduración completa del rRNA 18S (Dutca et al., 2011). Además, otros estudios muestran que la cadena (+) del PSTVd, co-localiza subcelularmente con el U3 snoRNA, provocando su redistribución asimétrica en plantas infectadas de *Nicotiana benthamiana* (Qi et al., 2003). Todas estas observaciones, plantearon en nuestro laboratorio la hipótesis de que los viroides, como el CEVd o el PSTVd, podrían estar afectando el procesamiento del pre-rRNA 18S y, en

consecuencia, la biogénesis ribosomal, a través de la alteración del funcionamiento normal del complejo U3 snoRNP.

#### 1.4 Las quinasas TOR (*Target of Rapamycin*) y SnRK1 (*Sucrose non-Fermenting Related Kinase1*)

Las proteínas *Snf1-related protein kinase1* (SnRK1; AMPK en mamíferos y Snf1 en levadura) y *Target of Rapamycin* (TOR) son dos proteínas-quinasas evolutivamente conservadas que ejercen funciones celulares centrales pero antagónicas entre sí (Figura 4). Estas proteínas son reguladores energéticos maestros que reajustan tanto la expresión génica como el metabolismo celular dependiendo del estatus energético de la planta (Roustan et al., 2016).

SnRK1 se activa en respuesta a la disminución del suministro energético (por ejemplo, durante el estrés), lo que desencadena, en general, la represión del crecimiento, la activación del catabolismo y la inhibición de los procesos anabólicos que consumen energía (Baena-González et al., 2007). SnRK1 es un complejo proteín-quinasa heterotrimérico compuesto por una subunidad  $\alpha$ -catalítica, y 2 subunidades reguladoras,  $\beta$  y  $\beta\gamma$ , que están codificadas por varios genes: en *Arabidopsis thaliana* son 3 genes para la subunidad  $\alpha$  (*SnRK1 $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2/ $\alpha$ 3*), 3 para la subunidad  $\beta$  (*SnRK1 $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\beta$ 3*) y 1 para la subunidad  $\beta\gamma$  (*SnRK1 $\beta\gamma$* ) (Crozet et al., 2014), mientras que en *Solanum lycopersicum* se han descrito 2 para la subunidad  $\alpha$  (*SISnRK1.1/1.2*), 4 para la subunidad  $\beta$  (*SIGal83*, *SISip1*, *SITau1* y *SITau2*) y 1 para la subunidad  $\gamma$  (*SISNF4*). La fosforilación de un residuo de treonina conservado en el *T-loop* de activación de la subunidad catalítica por parte de quinasas aguas arriba es esencial para la actividad de Snf1/AMPK/SnRK1 (Polge & Thomas, 2007). Una vez activada, SnRK1 induce amplios cambios en la expresión génica (transcriptómicos y traduccionales) y el metabolismo en respuesta al estrés (Baena-González & Hanson, 2017). TOR es una Ser/Thr quinasa conservada que, al contrario que SnRK1, en condiciones de suficiente aporte energético promueve el crecimiento y procesos biosintéticos, así como la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas (Mugume et al., 2020). En plantas, el complejo TOR está formado por la quinasa TOR y las proteínas reguladoras RAPTOR y LST8, de manera equivalente al complejo TORC1 de mamíferos.

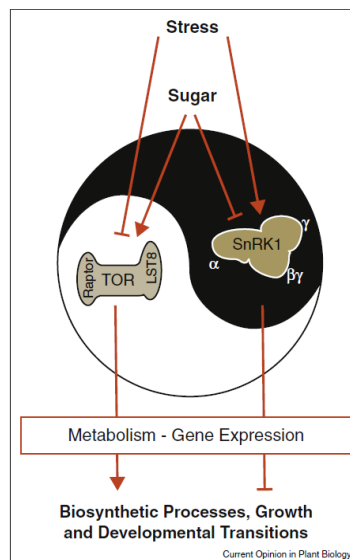


Figura 4. SnRK1 y TOR son complejos de proteína quinasa que regulan de forma antagónica el crecimiento y el desarrollo en respuesta al aporte de energía. Figura adaptada de (Baena-González & Hanson, 2017).



## 1.5 El eje SnRK1-TOR y su función durante el estrés biótico

El estrés, como el causado por el ataque de patógenos, afecta a los procesos de asimilación de carbono y de producción de ATP resultando en una disminución de los niveles energéticos (Biswal et al., 2011). Por tanto, es lógica la implicación tanto de SnRK1 como de TOR en la respuesta frente a este tipo de estreses y, de hecho, numerosos estudios reflejan la importancia de estas quinasas en el balance entre el crecimiento de la planta y la propia respuesta de defensa frente al patógeno (Margalha et al., 2019). En general, la respuesta inmune de la planta resulta en una regulación antagónica entre SnRK1 (se activa) y TOR (se reprime) para desencadenar una respuesta defensiva eficiente. Ante el ataque del patógeno, SnRK1 promueve la resistencia mientras que TOR potencia el crecimiento en detrimento de la respuesta defensiva, haciendo que aumente la susceptibilidad (Mugume et al., 2020). En consecuencia, plantas con ganancia de función de SnRK1 o pérdida de función TOR tienden a ser más resistentes, y viceversa (Margalha et al., 2019).

Hay que destacar que varios patógenos son capaces de interferir en la acción de estas proteínas en su propio beneficio, al inhibir a SnRK1 y/o activar a TOR para promover la infección. Un ejemplo es el descrito por Hao et al., (2003) en el que se encontró que proteínas determinantes de la patogenicidad de geminivirus pueden inactivar a SnRK1, lo que conduce a una mayor susceptibilidad. También, en varios trabajos se ha descrito la interacción de efectores virales con TOR. Por ejemplo, la proteína efectora TAV del virus del mosaico de la coliflor (CAMV) se puede unir y promover la actividad de TOR, ayudando de esta manera al éxito viral (Schepetilnikov et al., 2011). En este sentido, plantas tratadas con inhibidores específicos de TOR son más resistentes a la infección por CAMV al no tener la capacidad de promover la traducción policistrónica y de esta manera abolir la replicación viral (Schepetilnikov et al., 2011). De manera semejante, la inhibición producida por AZD8055, otro inhibidor de TOR dificulta la infección causada por el virus del mosaico de la sandía (WMV). Sin embargo, la infección producida por el virus del mosaico del nabo (TuMV) no se ve afectada por dicha inhibición y las plantas siguen siendo susceptibles, lo que sugiere que, dependiendo del tipo de virus, el requerimiento de la señalización mediada por TOR podría diferir (Ouibrahim et al., 2015; Schepetilnikov et al., 2011). De manera similar a lo que ocurre en las interacciones planta-virus, en el caso de infecciones bacterianas las actividades de SnRK1 y TOR están relacionadas con una mayor resistencia y susceptibilidad, respectivamente. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de SnRK1 en arroz confiere mayor resistencia a la infección de *Xanthomonas oryzae pva oryzae* (*Xoo*) (Filipe et al., 2018). En un estudio complementario en *Xoo* se ha observado que TOR es capaz de suprimir en parte la PTI al neutralizar la señalización de hormonas de defensa como el ácido salicílico y el ácido jasmónico. En este caso, la inhibición de TOR con rapamicina activa genes relacionados con la defensa (De Vleeschauwer et al., 2018).

## 1.6 El papel de la autofagia en respuesta al estrés biótico

Uno de los procesos celulares clave para la resistencia y supervivencia de las plantas ante el ataque de patógenos es la autofagia (Wang et al., 2018). La autofagia es un proceso celular catabólico conservado en el que componentes como macromoléculas, orgánulos dañados o agentes tóxicos, se degradan en vacuolas líticas para ser eventualmente reutilizados. Este proceso es importante durante el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis celular en condiciones basales, pero también es crucial en condiciones de estrés, momento en el que se induce fuertemente (Galluzzi et al., 2017; Yang & Bassham, 2015). Básicamente, en la autofagia se da la formación de una vesícula de doble membrana, el autofagosoma, el cual se forma a partir del fagóforo que rodea y engulle al material citoplasmático a degradar, que es

transportado hacia la vacuola. Para que tenga lugar este proceso, se han caracterizado cerca de 36 genes *ATG* (*AuTophagy*), los cuales codifican proteínas centrales de autofagia que parecen estar bien conservadas en la mayoría de organismos multicelulares, entre ellos las plantas (Avin-Wittenberg et al., 2018). La autofagia se considera necesaria para la supervivencia de las plantas, particularmente en situaciones de deficiencia de nutrientes o ante diversas condiciones de estrés (Signorelli et al., 2019). En concreto, la autofagia tiene un papel importante en la respuesta inmune de las plantas, ya que puede actuar como vía de supervivencia, promoviendo la muerte celular programada en la respuesta hipersensible inducida por un ataque patogénico para evitar su avance sistémico (Coll et al., 2011). La autofagia puede ser no selectiva (*bulk*) o selectiva, cuando para este último caso se pretenden degradar componentes específicos. En este sentido, la autofagia es inducida por numerosos PRRs lo que conlleva a la degradación selectiva de los patógenos intracelulares. La existencia de autofagia selectiva aumenta sobremanera la complejidad de los mecanismos de regulación concernientes a este proceso, los cuales permanecen por descubrir en la mayoría de los casos (Stephani & Dagdas, 2020).

Como se ha mencionado anteriormente, tanto el estrés abiótico como el biótico provocan cambios metabólicos y energéticos, los cuales interactúan con los mecanismos de autofagia para el mantenimiento de la homeostasis celular, en la que es esencial una adecuada modulación del flujo energético y de nutrientes para que la planta pueda hacer frente a la situación desfavorable. Por tanto, para la regulación de la autofagia también es de gran importancia la función de las quinasas SnRK1 y TOR (Jamsheer K et al., 2021; Mugume et al., 2020; Wang et al., 2018). SnRK1 es un regulador positivo de la autofagia en condiciones de ayuno nutricional y, aunque los mecanismos precisos que rodean a esta regulación se desconocen principalmente en plantas, se ha podido demostrar que SnRK1 fosforila a proteínas importantes para promover el proceso autofágico como ATG1a y ATG6 (Chen et al., 2017; Soto-Burgos & Bassham, 2017). En cambio, TOR es un regulador negativo de la autofagia. En condiciones óptimas de crecimiento, cuando el aporte de nutrientes y energía es normal, la autofagia se mantiene en niveles basales bajos que son mantenidos por la acción de TOR que fosforila a ATG13 (Puente et al., 2016; Wallot-Hieke et al., 2018).

Todavía no son claras las pruebas que relacionan directamente la regulación de la respuesta de defensa al ataque por patógenos a través de la autofagia y el eje SnRK1-TOR, pero cada vez existen más estudios que correlacionan un aumento de la resistencia de las plantas debido a la inhibición de TOR o, al contrario, un aumento de la susceptibilidad a causa de una disminución de la actividad de SnRK1. Esta correlación se puede explicar fácilmente a través de la regulación autofágica antagónica por parte de SnRK1 y TOR (Jamsheer K et al., 2021; Mugume et al., 2020; Wang et al., 2018).

Por otra parte, se ha descrito que la inhibición de la actividad TOR -que disminuye la producción de proteínas ribosomales, ralentiza la síntesis proteica y estimula la autofagia- es capaz de reducir el estrés proteotóxico causado por ribosomopatías o alteraciones en la biogénesis de ribosomas (Recasens-Alvarez et al., 2021). Por tanto, el estudio de la posible implicación de las rutas de señalización reguladas por TOR y SnRK1 en los procesos de patogénesis viroidal, que se ha descrito que producen alteraciones en la biogénesis ribosomal (Cottilli et al., 2019), resulta de gran interés.

## 2 OBJETIVOS

Recientemente, hemos observado en nuestro laboratorio que las infecciones viroidales causan estrés ribosomal en plantas de tomate al interferir en el procesamiento de los pre-rRNAs alterando, por tanto, la fisiología y el metabolismo de la planta. Además, numerosos estudios implican a las kinasas de actividad antagónica TOR y SnRK1 en procesos de patogénesis vegetal como infecciones virales y bacterianas. En este Trabajo de Final de Máster se pretende profundizar en el papel del estrés ribosomal causado por la infección viroidal a través del estudio de posibles alteraciones en funcionamiento del complejo U3 snoRNP, que es necesario para el procesamiento de los pre-rRNAs. De la misma forma, se pretende investigar nuevos mecanismos moleculares implicados en la patogénesis viroidal, mediante el estudio de la interacción entre el viroide PSTVd y las rutas de señalización reguladas por las kinasas TOR y SnRK1 en plantas de tomate. Los objetivos específicos de este trabajo son, por tanto:

- I. Estudio del efecto de la infección viroidal en la función del complejo U3 snoRNP durante la biogénesis ribosomal, mediante el estudio de la expresión y/o localización de la fibrilarina, una proteína nucleolar componente de dicho complejo.
- II. Estudio de la interacción entre el viroide PSTVd y el eje SnRK1-TOR en plantas de tomate.
  - a. Estudio de la actividad de SnRK1 y TOR en plantas de tomate infectadas por PSTVd.
  - b. Estudio del papel de la autofagia en la patogénesis viroidal.
  - c. Estudio de la inhibición de TOR en la sintomatología viroidal y el flujo autofágico mediado por viroide.
  - d. Generación de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de SnRK1 como herramienta para el estudio de sus funciones moleculares y fisiológicas.

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Se emplearon plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad Money Maker y plantas de *Nicotiana benthamiana*.

#### 3.1.1 Germinación

Para la germinación de las semillas de tomate, se realizó su esterilización mediante lavados en serie para disminuir la tasa de contaminación. Las semillas se envolvieron en membranas *Miracloth* y se sumergieron en una mezcla de lejía comercial y agua desionizada estéril (1:1), a la que se añadió 1 gota del surfactante Tween-20. Este primer lavado se mantuvo durante 30 min en agitación constante. A continuación, se realizaron 3 lavados con agua desionizada estéril durante 5, 10 y 15 min, para eliminar por completo el agente desinfectante.

Una vez esterilizadas las semillas, se colocaron en placas Petri con una capa de papel filtro esterilizado y humedecido con 7 mL de agua desionizada y esterilizada. Se selló la placa herméticamente con cinta *Micropore* y se almacenaron en oscuridad 72 h a una temperatura de 24 °C en cámara de cultivo *in vitro* para que se produjera la aparición de la radícula. Transcurrido el tiempo, se destaparon las placas y se mantuvieron entre 72 y 96 h en la cámara de cultivo con condiciones de ciclos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a 24 °C. Pasado el tiempo, las plántulas se transfirieron a tierra.

En el caso de *N. benthamiana*, las semillas se germinaron en el invernadero directamente en tierra.

#### 3.1.2 Condiciones de Cultivo en invernadero

Las plantas se sembraron en macetas (12 cm de profundidad x 13 cm de diámetro interior) con una mezcla de turba y vermiculita (1:1) y se regó cada 2 días con solución nutritiva *Hoagland*. Las plantas de tomate crecieron en una cámara de cultivo a una temperatura de entre 25 y 30 °C (noche/día), con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad y con una humedad relativa entre el 50 y 70 % (Belles et al., 2006). En el caso de *N. benthamiana*, el crecimiento se realizó en una cámara de cultivo a una temperatura de 22±1 °C en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). En todos los casos se empleó una intensidad lumínica de 100-110  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.2 Material microbiológico

En los experimentos de infección mediada por viroide, se utilizó una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (pGV2260) de la colección del laboratorio, que expresa la secuencia dimérica de cDNA de PSTVd-RG1 (GenBank Acc. No. U23058.1) en el vector binario pMD201t2. Como control negativo de la infección, se utilizó la misma cepa de *A. tumefaciens* conteniendo únicamente el plásmido, según se refiere en Prol et al., (2021).

Para los experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* se utilizó *A. tumefaciens* C58 (pGV2260). Para la generación de plantas transgénicas de tomate mediante agro-transformación se utilizaron células comerciales de *A. tumefaciens* ElectroMAX LBA4404 (Invitrogen). Para la manipulación y propagación del DNA plasmídico se utilizaron células electro-competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.3 Inoculación del viroide en plantas de tomate o tabaco

Para infectar plantas de tomate y tabaco con viroide se procedió a inocular la cepa de *A. tumefaciens* que expresa el dímero de PSTVd descrita en el punto anterior, en plantas de 14 y 10 días, respectivamente. La inoculación se realizó mediante infiltración en la cara abaxial de los cotiledones utilizando jeringas de 1 mL sin aguja. Para ello, el cultivo bacteriano expresando el viroide se cultivó previamente hasta alcanzar la fase exponencial (a una densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) de 1.0 a 2.0 aproximadamente), se recogieron las células (15 min a 3000 x g) y se resuspendieron en tampón de infiltración (MES 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM y acetosiringona 200  $\mu$ M) de manera que el cultivo quedara a una  $OD_{600nm}$  de 0.1. Las agrobacterias se incubaron 2 h a temperatura ambiente en agitación suave previamente a su inoculación. Tras la infiltración, las plantas se mantuvieron en las condiciones de crecimiento descritas anteriormente. En los tiempos especificados a lo largo del texto, se recogieron muestras de tejido foliar para su posterior análisis.

### 3.4 Expresión transitoria en *N. benthamiana*

Para los experimentos de expresión transitoria se utilizaron plantas de *N. benthamiana* de aproximadamente 4 semanas de edad, con hojas de un diámetro de 3 a 5 cm desde la base hasta el ápice de la hoja. La transformación de las plantas con los distintos vectores (Tabla 1), se realizó vía *A. tumefaciens* (agroinfiltración) como se describe en Belda-Palazón et al. (2012). Brevemente, cada una de las agrobacterias conteniendo las construcciones de interés (Tabla 1), se creció hasta su fase exponencial ( $OD_{600nm}$  de 1.0 a 2.0) y las células se recogieron por centrifugación (15 min a 3000 x g). Posteriormente, las células se resuspendieron en tampón de infiltración (MES 10 mM,  $MgCl_2$  10 mM y 200  $\mu$ M de acetosiringona) de manera que alcanzaran la  $OD_{600nm}$  deseada. Posteriormente, se realizaron las mezclas apropiadas entre los diferentes cultivos de agrobacterias (Tabla 2). Las agrobacterias se incubaron durante 2-3 h a temperatura ambiente en agitación suave y se infiltraron con jeringas de 1 mL sin aguja en la cara abaxial de las hojas. Para los casos especificados a lo largo del texto las infiltraciones se realizaron en plantas previamente infectadas con PSTVd tras 21 dpi (véase punto anterior). Las plantas se mantuvieron en las condiciones de crecimiento de día largo descritas anteriormente. La expresión de proteína fluorescente se examinó 48 h después de la infiltración a través de microscopia confocal de fluorescencia.

**Tabla 1.** Cepas de *A. tumefaciens* utilizadas en este trabajo para expresión transitoria en *N. benthamiana*.

| Construcción (vector)  | Función   | Fuente                      |
|------------------------|---|-----------------------------|
| <i>FIB2-RFP (pKT7)</i> | Fusión C-terminal de fibrilarina (AT4G25630), componente del complejo U3 snoRNP a RFP | (Herranz et al., 2012)      |
| <i>p19 (pCB301)</i>    | Expresión de la proteína p19, supresora del silenciamiento vía RNAi                   | Belda-Palazón et al., 2012) |

|                                   |   |                                   |
|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>SISnRK1.1-GFP</i><br>(pK7FWG2) | Fusión C-terminal de SnRK1.1<br>(Solyc02g067030.3) a GFP        | Ana Confraria, (IGC,<br>Portugal) |
| <i>SISnRK1.2-GFP</i><br>(pK7FWG2) | Fusión C-terminal de SnRK1.2<br>(Solyc03g115700.3) a GFP        | Ana Confraria, (IGC,<br>Portugal) |
| <i>amiRSI1</i> (pK7WG2)           | Silenciamiento génico de <i>SISnRK1.1</i> y<br><i>SISnRK1.2</i> | Ana Confraria, (IGC,<br>Portugal) |
| <i>amiRSI2</i> (pK7WG2)           | Silenciamiento génico de <i>SISnRK1.1</i> y<br><i>SISnRK1.2</i> | Ana Confraria, (IGC,<br>Portugal) |
| <i>amiRSI3</i> (pK7WG2)           | Silenciamiento génico de <i>SISnRK1.1</i> y<br><i>SISnRK1.2</i> | Ana Confraria, (IGC,<br>Portugal) |

**Tabla 2.** Composición de las mezclas de *A. tumefaciens* infiltradas en hojas de *N. benthamiana*. Se indica la OD<sub>600</sub> final en la mezcla de cada una de las cepas.

| <b>Mezclas de <i>A. tumefaciens</i></b>   |
|---|
| FIB2-RFP (OD <sub>600 nm</sub> = 0.5) + p19 (OD <sub>600 nm</sub> = 0.5)                    |
| <i>SISnRK1.1-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI1</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |
| <i>SISnRK1.1-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI2</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |
| <i>SISnRK1.1-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI3</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |
| <i>SISnRK1.2-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI1</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |
| <i>SISnRK1.2-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI2</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |
| <i>SISnRK1.2-GFP</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 1) + <i>amiRSI3</i> (OD <sub>600 nm</sub> = 2) |

### 3.5 Microscopía confocal de fluorescencia

Para la visualización de la fluorescencia en el microscopio confocal, se utilizaron secciones circulares de 2 cm de diámetro de las hojas agroinfiltradas de *N. benthamiana* y se colocaron sobre un portaobjetos con el lado abaxial hacia arriba. Se utilizó un microscopio de escaneo láser Zeiss LSM 780 con objetivo de inmersión en agua C-Apochromat 40x/1.20 W Korr FCS M27. Los *pinholes* se ajustaron a 1 unidad de aire para cada longitud de onda. Las condiciones de visualización de las proteínas RFP y GFP se detallan en la Tabla 3. En los casos especificados, se realizó una compilación de imágenes (*z-stack*) para una sección total de aproximadamente 25 µm, apilando 50 planos con un intervalo aproximado de 0.44 µm entre cada imagen. Las imágenes se capturaron y procesaron con el software *ImageJ* (<http://rsb.info.gov/ij/>) para obtener el área y fluorescencia medias cuantificadas en µm<sup>2</sup> y unidades arbitrarias (u.a.) respectivamente.

**Tabla 3.** Condiciones de las imágenes confocales para la visualización de las proteínas fluorescentes GFP y RFP.

| <b>Proteína/molécula fluorescente</b> | <b>Excitación laser (nm)</b> | <b>MBS = dicroico</b> | <b>Detección espectral (nm)</b> |
|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| GFP                                   | Argón 488                    | 488                   | 510-535                         |
| RFP                                   | Helio-Neón 561               | 488/541               | 564-610                         |
| Clorofila                             | Argón 488 nm                 | 488                   | 670-700                         |

### 3.6 Tratamiento con inhibidores de TOR (Torin2 Y AZD8055)

La inhibición de TOR se realizó dos compuestos químicos distintos, Torin2 y AZD8055 (Belda-Palazón et al., 2020). Éstos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y se

almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Los tratamientos con los inhibidores se realizaron en plantas de tomate a través del riego. Para ello, cada uno de los inhibidores se disolvió en agua corriente hasta una concentración de 1 µM (200 µL de 10 mM de cada inhibidor en un volumen final de 2 L). El riego se realizó cada 3 días directamente en la bandeja en la que se encontraban las plantas. Como tratamiento control los inhibidores se sustituyeron por el mismo volumen de DMSO.

### 3.7 Manipulación de ácidos nucleicos

#### 3.7.1 Extracción de RNA de plantas

La extracción de RNA de los tejidos vegetales se realizó utilizando el reactivo *Extrazol*<sup>®</sup> (Trizol Reagent; Birt S.A). Para ello, se mezclaron 100 mg de tejido vegetal previamente molido en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero con 1 mL de reactivo. Las muestras se homogenizaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min para la disociación de los complejos ribonucleoproteicos. Tras ello, las muestras se centrifugaron a 13000 x *g* durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se añadieron 200 µL de cloroformo. Posteriormente las muestras se agitaron e incubaron a temperatura ambiente durante 2 min, transcurridos los cuales se centrifugó nuevamente a 13000 x *g* durante 15 min a 4 °C. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadieron 500 µL de isopropanol, agitando de nuevo e incubando las muestras a temperatura ambiente durante 10 min. El RNA se sedimentó centrifugando las muestras de nuevo a 13000 x *g* durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se volvió a centrifugar 5 min a 7500 x *g* y 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el etanol residual se dejó evaporar durante unos minutos. El RNA precipitado se resuspendió en 44 µL de agua Milli-Q estéril tratada con DEPC (dietilpirocarbonato).

Para eliminar el DNA genómico contaminante, se empleó el Kit TURBO DNA-free<sup>™</sup> (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante (2 U/µL), y las muestras se incubaron a 37 °C entre 20 y 30 min. Posteriormente, para inactivar y eliminar la DNasa, se añadieron 0.1 volúmenes de *DNasa Inactivation Reagent* y se incubó 2 min, para finalmente llevar a cabo una centrifugación (10000 x *g*, 2 min) y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

Para la cuantificación del RNA total de cada una de las muestras, se empleó un espectrofotómetro ultravioleta-visible *Nanodrop*<sup>™</sup> *ONE*.

#### 3.7.2 Retrotranscripción

Se empleó el kit comercial PrimeScript<sup>™</sup> RT Reagent Kit (Perfect Real Time) de Takara, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante (1 µg de RNA en un volumen final de 10 µL). Las muestras de cDNA se diluyeron hasta 100 µL con agua libre de nucleasas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

#### 3.7.3 Electroforesis de DNA de plantas.

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Como marcadores de tamaño se utilizaron Lambda DNA/EcoRI+Hind III (Fermentas) y el GeneRuler<sup>™</sup> 1 Kb Plus. La electroforesis se desarrolló a 100 V durante aproximadamente 40 min y el resultado del gel se visualizó por exposición a luz UV y se fotografió.

### 3.7.4 Reacciones de amplificación semicuantitativa (RT-PCR) y cuantitativa (RT-qPCR)

Las amplificaciones por RT-PCR se realizaron en un volumen final de 30  $\mu$ L y en cada reacción se emplearon 2  $\mu$ L de cDNA, 3  $\mu$ L de tampón de reacción 10X, 3  $\mu$ L de dNTPs (2.5 mM), 1  $\mu$ L de cada cebador (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de Taq DNA polimerasa (2 U/ $\mu$ L). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C; 25 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94 °C, 30 s de apareamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C, seguido de un último paso de extensión final de 5 min a 72 °C. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la medida de la expresión génica mediante RT-PCR semicuantitativa.

| Gen   | Cebador directo (5'-3')          | Cebador reverso (5'-3')          |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|
| PSTVd | CGTCTCCCTCGATTGCGGAACTAACTCGTGGT | CGTCTCTCTCAAAGCAGGAACCAACTGCGGTT |

Para la RT-qPCR se utilizó el reactivo PyroTaq EvaGreen qPCR Mix Plus (ROX), 0.4  $\mu$ L de cDNA y 500 nM de cada cebador en un volumen final de 10  $\mu$ L. Los análisis de RT-qPCR se llevaron a cabo en un equipo 7500 Fast (Life Technologies) y como marcador endógeno de referencia se utilizó el gen de la actina. Los cálculos de expresión relativa se realizaron por el método  $2^{-\Delta Ct}$  y se realizaron tres repeticiones técnicas de cada réplica biológica de cDNA. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se indican en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Secuencias de los oligonucleótidos empleados el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR.

| Gen    | Cebador directo (5'-3')          | Cebador reverso (5'-3')          |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|
| Actina | CTAGGGTGGGTTTCGAGGAGATGATGC      | GTCTTTTGGACCCATACCCACCATCACAC    |
| PSTVd  | CGTCTCCCTCGATTGCGGAACTAACTCGTGGT | CGTCTCTCTCAAAGCAGGAACCAACTGCGGTT |
| DIN6   | TCTTCCACAGAACTCAGCG              | ATCGGGGTGTCCAAATTCCC             |
| SEN5   | AAGGCATTTGCTCATCCTCCT            | GTGATTGAGCAAGGAGGTGC             |
| EXP10  | TGGGTGGAGCATGTGGTTAT             | AAGGGCAAATTTGGTGGGC              |

## 3.8 Manipulación de proteínas

### 3.8.1 Extracción y separación de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la extracción de proteínas se utilizaron 100 mg de material de partida previamente pulverizado en nitrógeno líquido, al que se añadieron 2 volúmenes de tampón de Laemmli 2x (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20 %, mercaptoetanol 2 % y 0,001 % de azul de bromofenol). Tras homogenizar y mantener en hielo las muestras durante 20 min, éstas se calentaron a 95 °C durante 10 min para provocar la desnaturalización de las proteínas. Finalmente, se centrifugaron durante 15 min a 12000 x g y se conservó el sobrenadante.

Para la separación de proteínas por SDS-PAGE se utilizó el sistema *Mini-Protean® Tetra handcast systems* (Bio-Rad) con geles de poliacrilamida al 10 %. Se llenó el tanque con tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1 % de SDS, pH 8.3). Se analizaron 10  $\mu$ L de cada muestra y se cargó una carrera con un marcador de masa molecular (PageRuler™, Fermentas). La electroforesis se desarrolló a 120 V durante 90 min o hasta que el frente de electroforesis llegara al fondo del gel.



### 3.8.2 Transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida SDS-PAGE a membrana

Para llevar a cabo la transferencia de proteínas separadas por SDS-PAGE a membranas de PVDF (*Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting* de Bio-Rad) se activó en primer lugar la membrana con etanol al 96%, y posteriormente se incubó en tampón de transferencia (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM, 0.1% de SDS, 20% de etanol, pH 8.3). La transferencia se realizó en condiciones húmedas utilizando el sistema *Mini Trans-Blot® Cell Module* de Bio-Rad. La transferencia se desarrolló durante 90 min a 120 V. Para confirmar que la cantidad de proteínas en cada carrera era equivalente (control de carga), las membranas fueron teñidas empleando colorante Ponceau-S preparado al 0.1% en 5% de ácido acético.

### 3.8.3 Detección inmunológica de proteínas transferidas a membrana

Para la detección inmunológica, primero se incubó la membrana con solución bloqueante (1X TBS (*Tris-Buffered Saline*, Tris-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM) conteniendo 0.05% de Tween 20 y 5% de leche en polvo desnatada) durante 1 h en una plataforma oscilante. Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche preparado en la misma solución de bloqueo. A continuación, se realizaron tres lavados con abundante TBS-T (1X TBS, 0.05% de Tween 20) cada 10 min y se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 h. Después de tres lavados de 10 min con TBS-T, se procedió al revelado inmunológico, para lo que se utilizó el kit *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bandas de proteínas fueron detectadas utilizando equipo *AMERSHAM ImageQuant 800* y cuantificadas usando el software ImageJ.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-GFP (Roche; dilución 1:1000), anti-NBR1 (Agrisera, AS142805A; dilución 1:4000), anti-Phospho-RPS6<sup>S240</sup> (Dobrenel et al., 2016; dilución 1:4000) y anti-Phospho-AMPK $\alpha$ <sup>T172</sup> (Cell Signaling, 2531S; dilución 1:1000). Como anticuerpo secundario se empleó el anticuerpo anti- IgG de conejo conjugada a peroxidasa (Jacksons, 115035146; dilución 1:10000).

## 3.9 Transformación genética de plantas de tomate

Para transformación genética de plantas de tomate, se utilizó el cultivar MoneyMaker. Primeramente se esterilizaron y germinaron las semillas en medio de germinación (para 1L: 4.4 g de medio MS, 10 g de sacarosa, 8 g de agar; pH 5.7) hasta obtener plántulas que se utilizaron para obtener explantes de cotiledón y co-cultivarlos con *A. tumefaciens* expresando a las construcciones de interés, según el método desarrollado por (Ellul et al., 2003). En una primera fase, los explantes de cotiledón se pre-cultivaron en medio IK4040 (para 1L: 4,4 g de medio MS, 4 mg de IAA (ácido indolacético), 4 mg de Kinetina, 30 g de sacarosa, 8 g de agar; pH 5.7) poniendo el envés en contacto con el medio, y se incubaron a 24 °C por 2-3 días. Posteriormente se realizó la infección con *A. tumefaciens* poniendo los explantes de cotiledón en contacto con el cultivo bacteriano para después poner el envés de cada explante en contacto con el medio IKZ404010 (medio IK4040 + 1 mg de Zeatina) y 200  $\mu$ M de acetosiringona e incubarlos a 24 °C durante 2-3 días en oscuridad. Tras ello, se realizó un cultivo sin presión de selección, para lo que se realizó un lavado de los explantes y el envés se puso en contacto con el medio IKZ404010 con 300 mg/L de cefotaxima y se incubaron a 24 °C en fotoperíodo de día largo durante 2-3 días. Pasado el tiempo, se realizaron subcultivos de los explantes en medio con presión de selección, poniendo el envés en contacto con el medio

IKZ404010 con 300 mg/L de cefotaxima y 100 mg/L de kanamicina. El cultivo de explantes en medio con presión de selección dio lugar a la aparición de yemas resistentes a partir de las cuales se realizarán subcultivos sucesivos utilizando el medio con presión de selección. La Figura 3 ilustra de forma esquemática el proceso para realizar la transformación.

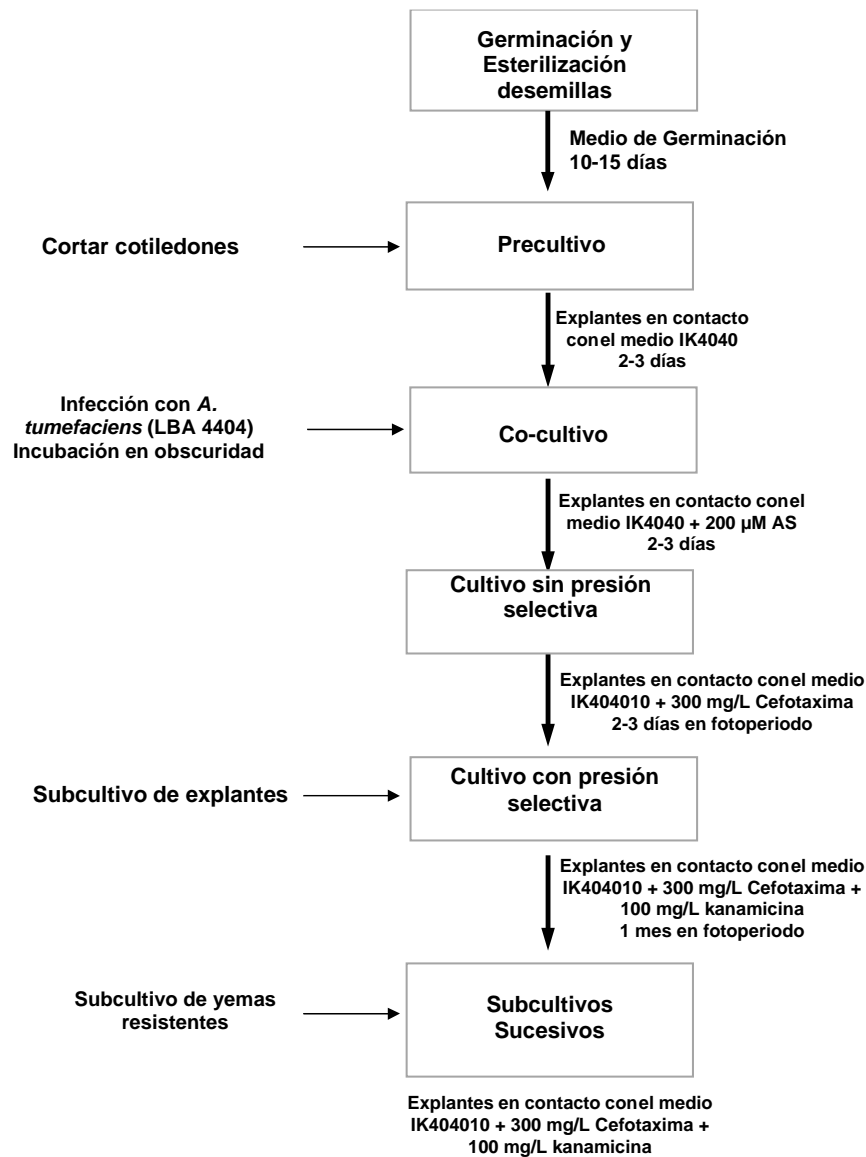


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de transformación de tomate.

### 3.10 Análisis Estadístico

El procesamiento de datos se realizó con ayuda del programa MS-Excel. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando GraphPad Prism versión 8.0.2 (<https://www.graphpad.com>). Se empleó la prueba *t* de Student para comparaciones entre 2 grupos. Para comparar más de dos grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba *post-hoc* HSD (*Honestly-significant-difference*) de Tukey de comparaciones múltiples. Los valores representados son el resultado de la media obtenida a partir de al menos 3 réplicas biológicas independientes  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Salvo que se especifique lo contrario, en todos los tipos de análisis se consideró un *p*-value <0.05 como estadísticamente significativo.

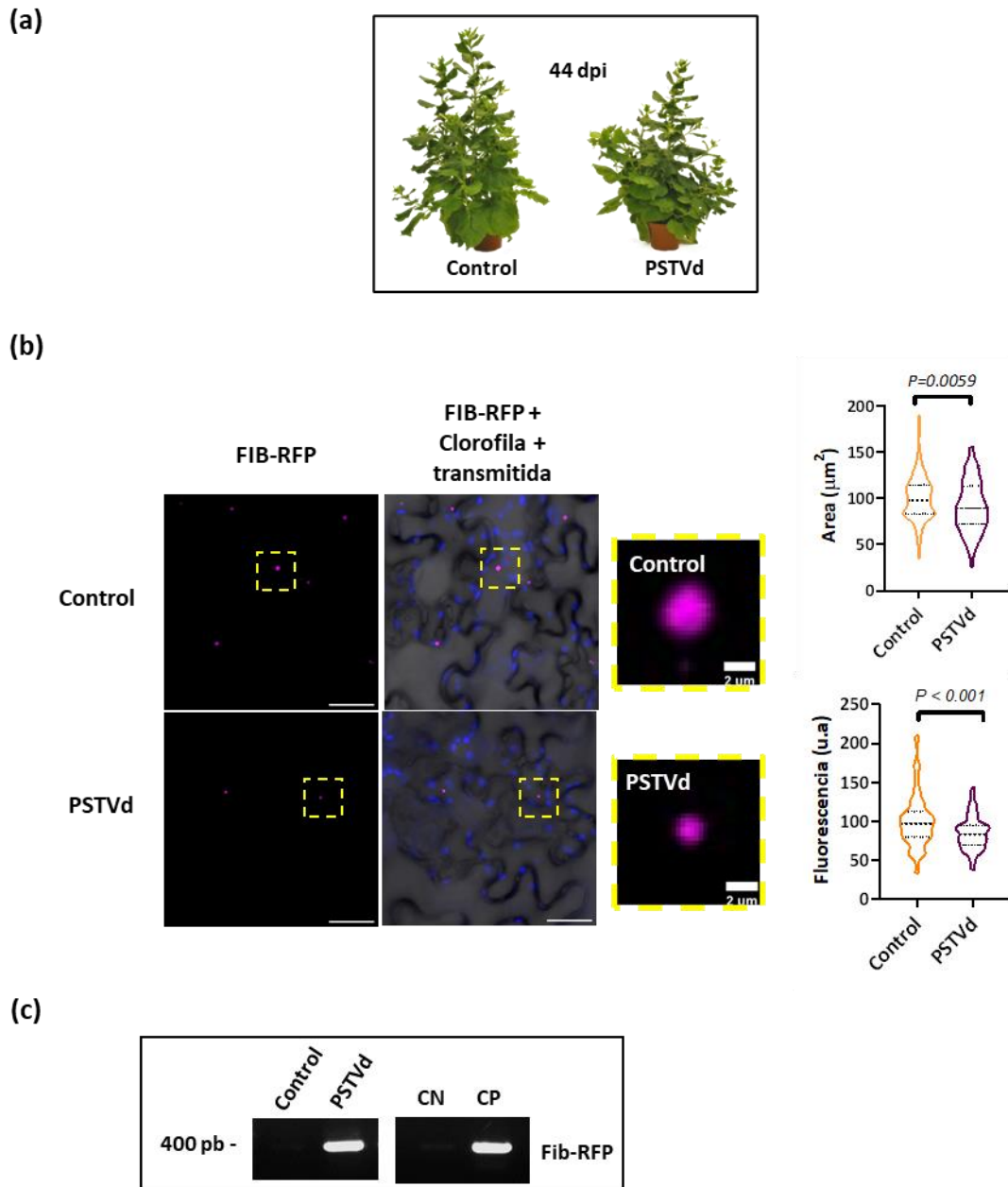
## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Estudio del efecto del viroide en la biogénesis ribosomal.

Los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (Cottilli et al., 2019), planteaban la hipótesis de que los viroides podrían interferir en la función del complejo U3 snoRNP en el procesamiento del pre-rRNA durante la biogénesis ribosomal que tiene lugar en el nucleolo. Para contrastar esta hipótesis, se realizaron experimentos de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* infectadas con el viroide PSTVd, de la proteína fibrilarina de *Arabidopsis thaliana* (FIBRILLARIN 2, AT4G25630) fusionada a la proteína fluorescente roja (FIB-RFP). La fibrilarina es una proteína nucleolar clave en eucariotas componente del complejo U3 snoRNP y que dirige la metilación de 2'-O-ribosa del rRNA (Sáez-Vásquez & Delseny, 2019) y, a través de estos experimentos, pretendíamos analizar si la infección del viroide pudiera estar alterando la expresión y/o localización de dicha proteína en el nucleolo.

Se ha demostrado que *N. benthamiana* es huésped sintomático de PSTVd (Navarro et al., 2021). En nuestros ensayos observamos que tras 44 días de su inoculación, el PSTVd provocaba una disminución evidente en el tamaño de la planta (Figura 6a), uno de los síntomas habituales de la infección por viroide (Navarro et al., 2021). En nuestros experimentos de infección por PSTVd, expresión transitoria de FIB-RFP en *N. benthamiana* y visualización de la fluorescencia en el microscopio confocal, pudimos observar que el viroide ocasionaba cambios aparentes en cuanto a la morfología y expresión de dicho marcador nucleolar, provocando una disminución significativa tanto del área como de la intensidad de la fluorescencia perteneciente a la expresión de FIB-RFP con respecto a plantas control, no infectadas (Figura 6b). La presencia de PSTVd en las plantas en el momento del análisis de la fluorescencia fue confirmada por RT-PCR (Figura 6c). Los resultados sugerían que PSTVd podría estar alterando el procesamiento de los pre-rRNAs a través de su interferencia con el U3 snoRNP.

La fibrilarina está implicada en el movimiento a larga distancia de los virus de plantas (Declé-Carrasco et al., 2021) En particular, se ha descrito la interacción entre la fibrilarina y el virus semilatente de la *Poa* (PSLV), perteneciente al género de los Hordeivirus (Semashko et al., 2012). Esta interacción, en concreto, se produce a través de la proteína de movimiento hordeiviral TGBp1, que forma partículas de RNP con el propio genoma viral. Asimismo, la proteína p23 del virus del arabesco del *Pelargonium* (PLPV) interacciona *in vivo* con la fibrilarina, produciendo la sobreexpresión de esta proteína nucleolar un efecto negativo sobre la acumulación de dicho virus (Pérez-Cañamás et al., 2022). Otros estudios muestran que PSTVd podría interferir en el complejo U3 snoRNP, al provocar una redistribución asimétrica del U3 snoRNA en el nucleolo en plantas infectadas de *N. benthamiana* (Qi & Ding, 2003). Sin embargo, la naturaleza no codificante de los viroides indicaría que PSTVd tendría que interactuar de forma directa con el complejo U3 snoRNP o, tal vez, indirectamente por medio de otra proteína de la planta capaz de interactuar con este complejo. Estos resultados dan pie al desarrollo de futuros experimentos de interacción en nuestro laboratorio entre el viroide y la fibrilarina y/o diferentes componentes del complejo U3 snoRNP para arrojar luz sobre los mecanismos moleculares a través de los cuales los viroides afectan a la biogénesis ribosomal.



**Figura 6. El viroide podría afectar al procesamiento de los pre-rRNA a través de su interferencia con la fibrilarina del complejo U3 snoRNP. (a)** Síntomas representativos de plantas de *N. benthamiana* infectadas con PSTVd y su correspondiente planta control a los 44 días post-infección (dpi). **(b)** Las fotografías de la izquierda muestran la localización subcelular de la fibrilarina fusionada a la proteína RFP (FIB-RFP) expresada transitoriamente en hojas de *N. benthamiana* de plantas previamente infectadas o no con PSTVd durante 20 días. Cada imagen corresponde a la compilación de un intervalo de diferentes planos de enfoque (*Z-stack*). Barras de escala, 30  $\mu\text{m}$ . Las gráficas de la derecha muestran la distribución de los datos (*violin plot*) obtenidos de la cuantificación del área y la fluorescencia de los nucleolos usando las imágenes adquiridas por el microscopio confocal de fluorescencia. Los *p*-valores (*P*) indican diferencias estadísticamente significativas, *t* de Student de 2 colas.  $n=250$  nucleolos de 9 plantas en total para cada condición. **(c)** Electroforesis para comprobar la presencia de PSTVd en las plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con FIB-RFP, previamente infectadas o no con PSTVd. Como control positivo (CP) y negativo (CN) se usó material genético obtenido a partir de hojas de plantas de *S. lycopersicum* cv *Rutgers* (Western Hybrid Seeds, Hamilton City, CA, EE.UU.) obtenidos con las construcciones de clones infecciosos descritos en el trabajo realizado por Prol et al., (2021).

## 4.2 Estudio de la actividad de SnRK1 y TOR en plantas de tomate infectadas por PSTVd

Cada vez son más los estudios que implican al eje SnRK1-TOR en procesos de defensa frente a patógenos como virus, bacterias y hongos, entre otros (Margalha et al., 2019). Este hecho planteó la hipótesis de que este importante eje de regulación pudiera estar también implicado en el proceso de patogénesis viroidal. En el laboratorio decidimos investigar si la señalización mediada por estas proteínas pudiera estar alterada durante la infección de plantas de tomate por el viroide PSTVd. Para ello, se evaluó la actividad de dichas proteínas en plantas infectadas por PSTVd, que presentaban epinastia y rugosidad, así como una disminución de crecimiento, en comparación con las plantas control (Figura 7a).

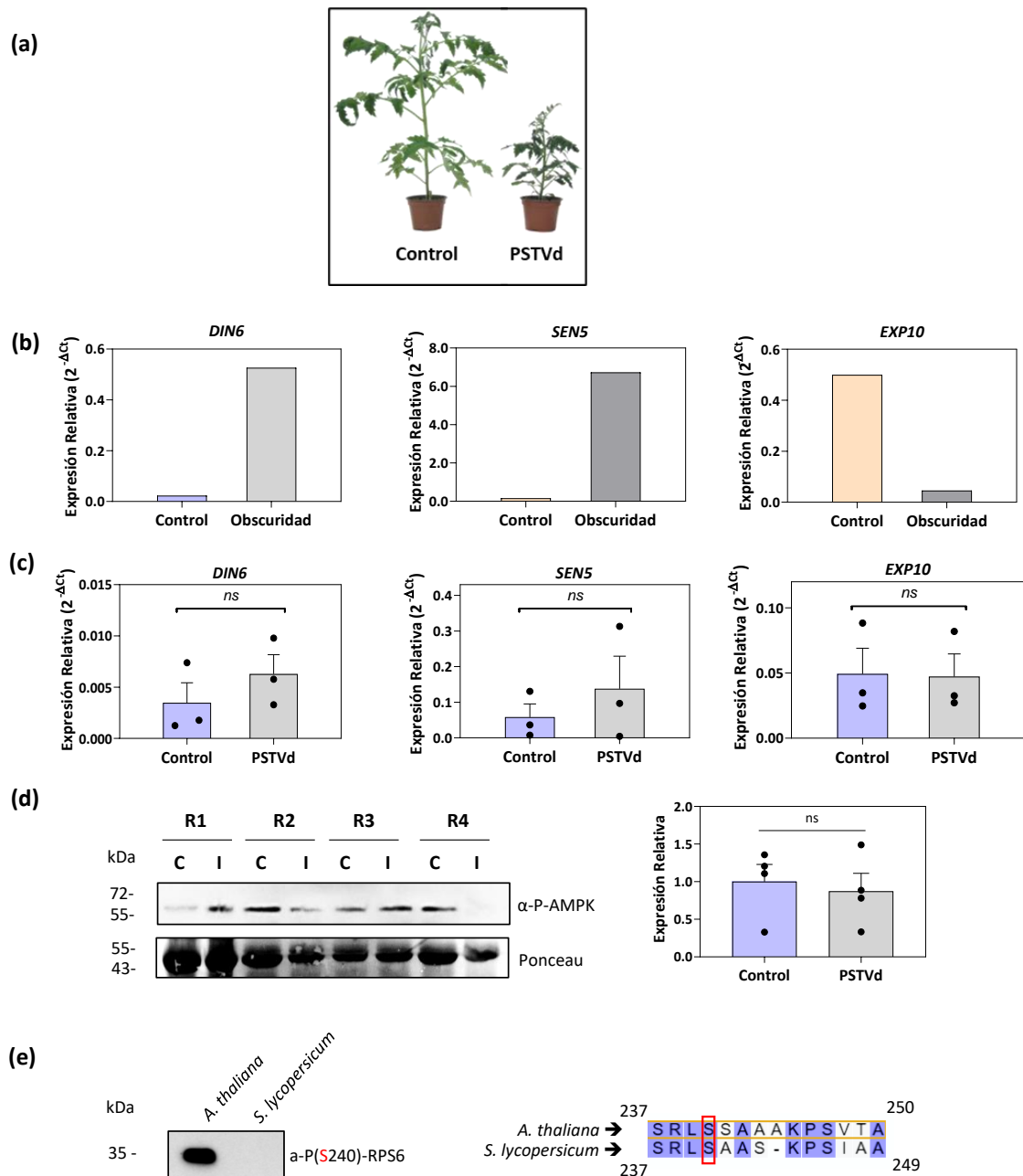
SnRK1 es clave para la reprogramación transcriptómica de las células durante su adaptación al estrés energético, por lo que se conocen numerosos genes cuya expresión diferencial depende de la activación de SnRK1 en esa particular condición de estrés (Baena-González et al., 2007). Para estudiar si la infección del viroide también provocaba una expresión diferencial de genes marcadores de la actividad SnRK1, se seleccionaron genes inducidos (*DIN6* y *SEN5*) y reprimidos (*EXP10*) en condiciones de estrés energético en *A. thaliana* para su posterior estudio en *S. lycopersicum*. En primer lugar, se realizó un análisis BLAST con la secuencia de aminoácidos de estas proteínas frente a la base de datos de Sol Genomics (*Tomato Genome proteins, ITAG release 4.0*) y se identificaron los ortólogos de tomate más próximos en función de la identidad de secuencia (Tabla 6).

**Tabla 6.** Identificación de genes marcadores de SnRK1 en tomate.

| Gen          | Gen en Arabidopsis | Ortólogo en Tomate | % id. |
|--------------|--------------------|--------------------|-------|
| <i>DIN6</i>  | AT3G47340          | Solyc06g007180.3.1 | 83,50 |
| <i>SEN5</i>  | AT3G15450          | Solyc12g013700.1.1 | 65,23 |
| <i>EXP10</i> | AT1G26770          | Solyc03g115890.2.1 | 80,43 |

Para comprobar su funcionalidad, se sometieron plantas de tomate a 8 h de oscuridad repentina (estrés fotosintético) y se analizó la expresión de los genes *DIN6*, *SEN5* y *EXP10* mediante RT-qPCR. Estos análisis demostraron que, de manera equivalente a lo que sucede en *A. thaliana*, tanto *DIN6* como *SEN5* se inducían mientras que *EXP10* se reprimía transcripcionalmente en condiciones de estrés energético (Figura 7b). Este resultado validaba el análisis de estos genes como marcadores de la actividad de SnRK1 en tomate. Sin embargo, tras el análisis RT-qPCR de estos genes en plantas infectadas por PSTVd no se observaron diferencias significativas entre plantas infectadas y control (Figura 7c).

Otra manera establecida para el estudio de SnRK1/Snf1/AMPK en eucariotas, principalmente en mamíferos y levadura, es el análisis de la fosforilación de un residuo de treonina conservado en el *T-loop* de activación también altamente conservado en estas proteínas (Steinberg & Carling, 2019). La alta conservación de la fosforilación de este dominio nos permitió analizar la activación/fosforilación de SnRK1 en tomate mediante anticuerpos de mamíferos frente a la treonina fosforilada y que han sido previamente validados para su uso en plantas (Belda-Palazón et al., 2020). Tras el análisis de la fosforilación del *T-loop* de activación de SnRK1 en plantas de tomate infectadas por PSTVd, pudimos observar que la patogénesis viroidal no causaba diferencias aparentes en la fosforilación del *T-loop* de SnRK1 (Figura 7d). Nuestros resultados parecían indicar que la infección por PSTVd no causaba alteraciones en la actividad de SnRK1.



**Figura 7. La infección de PSTVd no altera la señalización canónica de SnRK1 en tomate.** (a) Comparación de los síntomas de la infección con PSTVd (enanismo, epinastia, rugosidad) en plantas de tomate a los 28 dpi. (b) Análisis por RT-qPCR de los genes marcadores de la actividad de *SnRK1*, *DIN6*, *SEN5* y *EXP10*, en plantas de tomate sometidas a estrés fotosintético (8 h de oscuridad repentina). Se representan los niveles de expresión relativa con respecto al gen de actina ( $2^{-\Delta Ct}$ ) correspondientes a la media de 3 réplicas técnicas de un mismo experimento. (c) Análisis por RT-qPCR de los genes marcadores de la actividad de *SnRK1*, *DIN6*, *SEN5* y *EXP10*, en plantas de tomate infectadas por PSTVd a los 28 dpi. Se representan las medias de los niveles de expresión relativa con respecto al gen de actina ( $2^{-\Delta Ct}$ ) de 3 réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de la media. n. s., diferencias no significativas, *t* de Student de 2 colas. (d) Izquierda, análisis de la fosforilación del *T-loop* de activación de *SnRK1* $\alpha$  mediante inmuno-Western Blot con anti-P-AMPK. Derecha, cuantificación de la fosforilación de *SnRK1* $\alpha$  normalizada con respecto a los niveles de la subunidad grande de la RuBisCO determinados por tinción de Ponceau. Se representan las medias los niveles de fosforilación relativa de 4 réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de la media. n. s., diferencias no significativas, *t* de Student de 2 colas. (e) Análisis de la fosforilación de la S240 de RPS6 para monitorizar la actividad de TOR. A la izquierda se muestra el resultado del análisis inmuno-Western Blot con el



anticuerpo anti-Phospho-RPS6<sup>S240</sup> disponible en el laboratorio, en el que se comparan extractos proteicos totales procedentes de *A. thaliana* y *S. lycopersicum*. A la derecha se muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos del péptido de RPS6 de *A. thaliana* (AT4G31700) frente al que se desarrollaron los anticuerpos, comparado con la correspondiente secuencia de *S. lycopersicum* (Solyc12g096300). En rojo se indica el residuo de serina 240 que se fosforila.

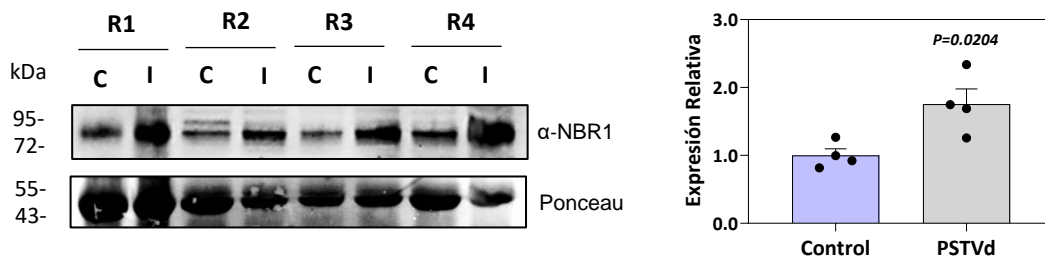
Al contrario que en mamíferos y levaduras, la mayoría de los estudios en plantas no demuestran una correlación clara entre un aumento en la actividad de SnRK1 y condiciones de déficit energético (Belda-Palazón et al., 2020; Margalha et al., 2019). De hecho, recientemente se ha demostrado que la subunidad catalítica SnRK1 $\alpha$ , tiene actividad independiente de las subunidades reguladoras y que está activada por defecto (Ramon et al., 2019). Este hecho podría indicar que, aunque en nuestros ensayos no hayamos observado diferencias aparentes en el análisis de marcadores de la actividad de SnRK1, no podemos descartar que la patogénesis viroidal pudiera producir cambios en la actividad de esta proteína. La obtención de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de SnRK1, cuya producción se ha iniciado en este trabajo, ayudará a elucidar esta cuestión.

En los últimos años se ha establecido a la quinasa TOR como una proteína clave para la regulación de la traducción (Liu & Xiong, 2020). Entre otros procesos, se ha demostrado que la activación de TOR desemboca indirectamente en la fosforilación del residuo de serina 240 de la proteína ribosomal S6 (RPS6), la cual se ha establecido como una señal marcadora para monitorizar la actividad de TOR, a través de la utilización de anticuerpos específicos capaces de reconocer esta fosforilación en *A. thaliana* (Belda-Palazón et al., 2020, 2022; Dobrenel et al., 2016). Con el objetivo de evaluar el uso de estos anticuerpos para analizar la actividad de TOR en plantas de tomate, en primer lugar, realizamos un estudio de la similitud de secuencia entre el péptido de *A. thaliana* frente al que se diseñaron los anticuerpos (Dobrenel et al., 2016) y el correspondiente en la proteína RPS6 ortóloga de tomate. El análisis de secuencia mostraba una homología del 64.3% lo que invitaba a pensar que dichos anticuerpos podrían reconocer a la S240 fosforilada de tomate (Figura 7e, derecha). Sin embargo, los análisis por inmuno-Western-Blot realizados en este trabajo demostraron que, mientras que dichos anticuerpos eran capaces de reconocer con gran sensibilidad la fosforilación de RPS6 de *A. thaliana*, no reconocían a la de tomate (Figura 7e, izquierda). Hasta la fecha, y para nuestro conocimiento, no se han generado herramientas que ayuden a monitorizar directamente la actividad de TOR en plantas de tomate, por lo que sería de gran interés la preparación de anticuerpos que reconocieran dianas directas fosforiladas por TOR. Esta misma problemática sería también aplicable para el caso de SnRK1. Por consiguiente, para estudiar la implicación del eje SnRK1-TOR en patogénesis, tenemos que recurrir al análisis de procesos regulados por estas proteínas que, al mismo tiempo, sean cruciales para los procesos de defensa vegetal, como lo es la autofagia (Wang et al., 2018).

### 4.3 Estudio del papel de la autofagia en la patogénesis viroidal

La autofagia cumple un papel importante en la respuesta inmune de las plantas y tanto TOR como SnRK1 regulan estrechamente el proceso autofágico, siendo reguladores negativos y positivos de dicho proceso, respectivamente (Jamsheer K et al., 2021; Mugume et al., 2020; Wang et al., 2018). Para el estudio del flujo autofágico en plantas de tomate infectadas por PSTVd se procedió a estudiar los niveles del receptor de carga de autofagia selectiva NBR1, el cual actúa como marcador de dicho proceso. Dado que el propio NBR1 es un sustrato de autofagia, la acumulación de esta proteína indica una degradación reducida y, por tanto, un flujo autofágico disminuido (Hafrén et al., 2018; Svenning et al., 2011). El estudio de la

acumulación de NBR1 en *A. thaliana* se realiza a través del uso de anticuerpos específicos frente a esta proteína (Svenning et al., 2011). Para confirmar que dichos anticuerpos se podían utilizar para detectar a la forma ortóloga de tomate, se realizó un análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos entre el dominio UBA2 de NBR1 de *A. thaliana* (AT4G24690), frente al que se produjeron los anticuerpos, y el correspondiente dominio de la ortóloga de *S. lycopersicum* (Solyc03g112230.2). Dicho análisis reveló un porcentaje de homología del 75 % (no mostrado), lo que sugería que los anticuerpos de *A. thaliana* podrían reconocer la proteína ortóloga de tomate. En nuestros ensayos de análisis de los niveles de NBR1 en plantas de tomate infectadas por PSTVd, pudimos observar una acumulación significativa de NBR1 tras 28 días después de la infección (Figura 8). Estos resultados demostraban que la infección viroidal disminuía el flujo autofágico en plantas de tomate.



**Figura 8. La infección por PSTVd disminuye el flujo autofágico en plantas de tomate.** Izquierda, análisis inmuno-Western Blot de la proteína marcadora/sustrato de autofagia NBR1 en plantas de tomate infectadas con PSTVd tras 28 dpi. La imagen de la tinción corresponde a la misma que en la figura 7. Se utilizó la misma membrana. Derecha, cuantificación de los niveles de NBR1 normalizados con respecto a los niveles de la subunidad grande de la RuBisCO (tinción de Ponceau). Se representan las medias de los niveles de expresión relativa de 4 réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar de la media. Los  $p$ -valores (P) indican diferencias estadísticamente significativas,  $t$  de Student de 2 colas.

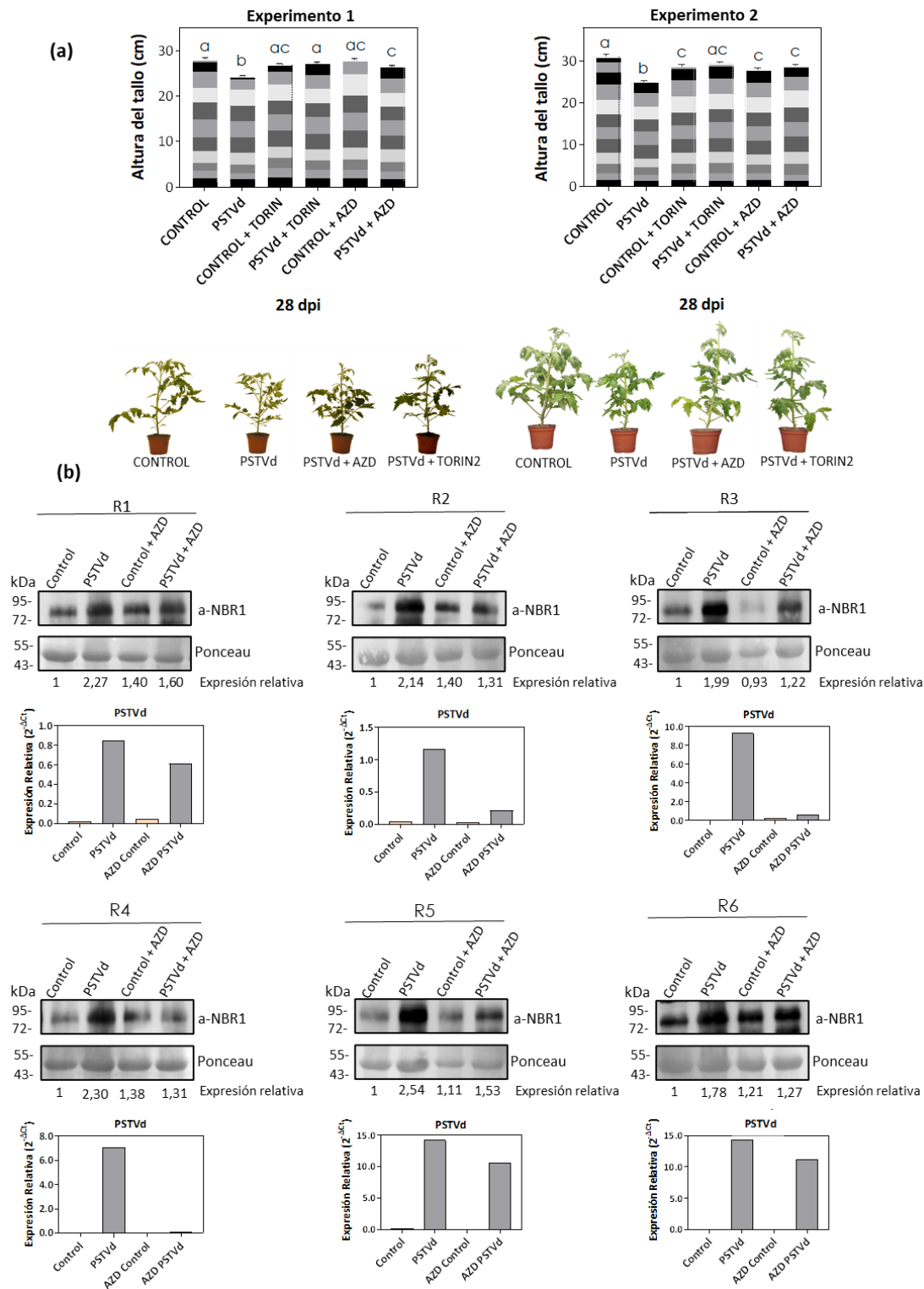
La autofagia selectiva dependiente de NBR1 cumple una función importante en procesos de defensa frente a patógenos como el virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y germinivirus (Hafrén et al., 2018; Haxim et al., 2017; Svenning et al., 2011). A su vez, este mecanismo puede ser contrarrestado por los virus afectando al flujo autofágico a través de proteínas virales, causando la acumulación de NBR1 (Hafrén et al., 2018). De manera similar, los viroides podrían evitar la actividad autofágica de defensa de la planta, como refleja la acumulación de NBR1.

#### 4.4 Estudio de la inhibición de TOR en la sintomatología viroidal y el flujo autofágico mediado por viroide.

Ya que la actividad de TOR es necesaria para inhibir el proceso de autofagia, en el laboratorio se planteó la hipótesis de que la disminución del flujo autofágico ocasionada por el viroide podría deberse a una activación de TOR (Mugume et al., 2020). De hecho, se ha demostrado que el estrés biótico mediado por bacterias, hongos y virus, en la mayoría de los casos, activa a TOR en plantas. De esta manera, plantas con actividad deficiente de TOR son más resistentes a estos patógenos, posiblemente debido a que la inhibición de TOR podría causar un aumento de la autofagia y, por tanto, de la inmunidad de la planta frente a estos patógenos (Margalha et al., 2019; Mugume et al., 2020).

Para evaluar la susceptibilidad de plantas de tomate infectadas por PSTVd con una actividad reducida de TOR se realizaron tratamientos con los inhibidores farmacológicos AZD8055 y Torin2 y se evaluó la sintomatología tras 28 días de infección, midiendo la longitud de cada uno de los nodos y altura total del tallo (Figura 9).





**Figura 9. La inhibición de TOR contrarresta la infección de PSTVd al recuperarse parcialmente el flujo autofágico en plantas de tomate. (a)** Cuantificación de la altura total y de cada uno de los nodos del tallo en plantas de tomate infectadas o no con PSTVd y tratadas o no con los inhibidores de TOR (AZD8055 y Torin2) tras 28 dpi. Se representan las longitudes medias de 2 experimentos compuestos de 6 (experimento 1, izquierda) o 12 (experimento 2, derecha) plantas para cada tratamiento. Las barras de error representan el error estándar de la media. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con una prueba de Tukey de diferencias honestamente significativas (HSD). Se muestran imágenes representativas de las plantas de tomate para cada uno de los tratamientos. **(b)** Paneles superiores, análisis inmuno-Western Blot de la

proteína marcadora/sustrato de autofagia selectiva NBR1 en plantas de tomate para cada uno de los tratamientos descritos anteriormente. Se muestra el resultado individual de 6 réplicas biológicas (6 plantas independientes). También, se indican los valores de expresión relativa de NBR1 con respecto a los niveles de la subunidad grande de la RuBisCO (tinción de Ponceau), referenciados con respecto a la muestra control (1). Gráficas inferiores, análisis por RT-qPCR de los niveles de PSTVd para cada una de las réplicas y tratamientos. Se representan los niveles de expresión relativa con respecto al gen de actina ( $2^{-\Delta Ct}$ ) correspondientes a la media de 3 réplicas técnicas de un mismo experimento.

Se puede observar que la inhibición de TOR por medio de estos dos compuestos causaba un alivio sintomático de plantas de tomate infectadas por PSTVd en comparación con plantas no tratadas (Figura 9a). Si bien la infección por PSTVd causaba una disminución de la longitud internodal y altura total de la planta, la inhibición de TOR en plantas infectadas recuperaba parcialmente el crecimiento de las plantas. El tratamiento de los inhibidores, a una concentración de 1  $\mu$ M previamente puesta a punto en el laboratorio, no causaba alteraciones en el crecimiento en plantas no infectadas, lo que validaba nuestra aproximación.

Para demostrar que la reducción de la sintomatología viroidal ocasionada por la inhibición de la actividad de TOR, era debida a una recuperación del flujo autofágico, se procedió a analizar la acumulación de NBR1 en plantas infectadas y tratadas con los inhibidores, en comparación con plantas infectadas no tratadas. Como muestra la figura 9b, en las 6 réplicas biológicas analizadas, la inhibición farmacológica de TOR ocasionaba una disminución de la acumulación de NBR1 inducida por el viroide PSTVd. Esa recuperación parcial del flujo autofágico venía acompañada de una disminución de la cantidad de PSTVd en todos los casos, en comparación con plantas no tratadas (Figura 9b). Estos resultados demostraban que el alivio sintomático de la infección del viroide en plantas de tomate con una actividad de TOR reducida se debía a una recuperación de la actividad autofágica y, por tanto, de la inmunidad vegetal que podría disminuir la acumulación del viroide.

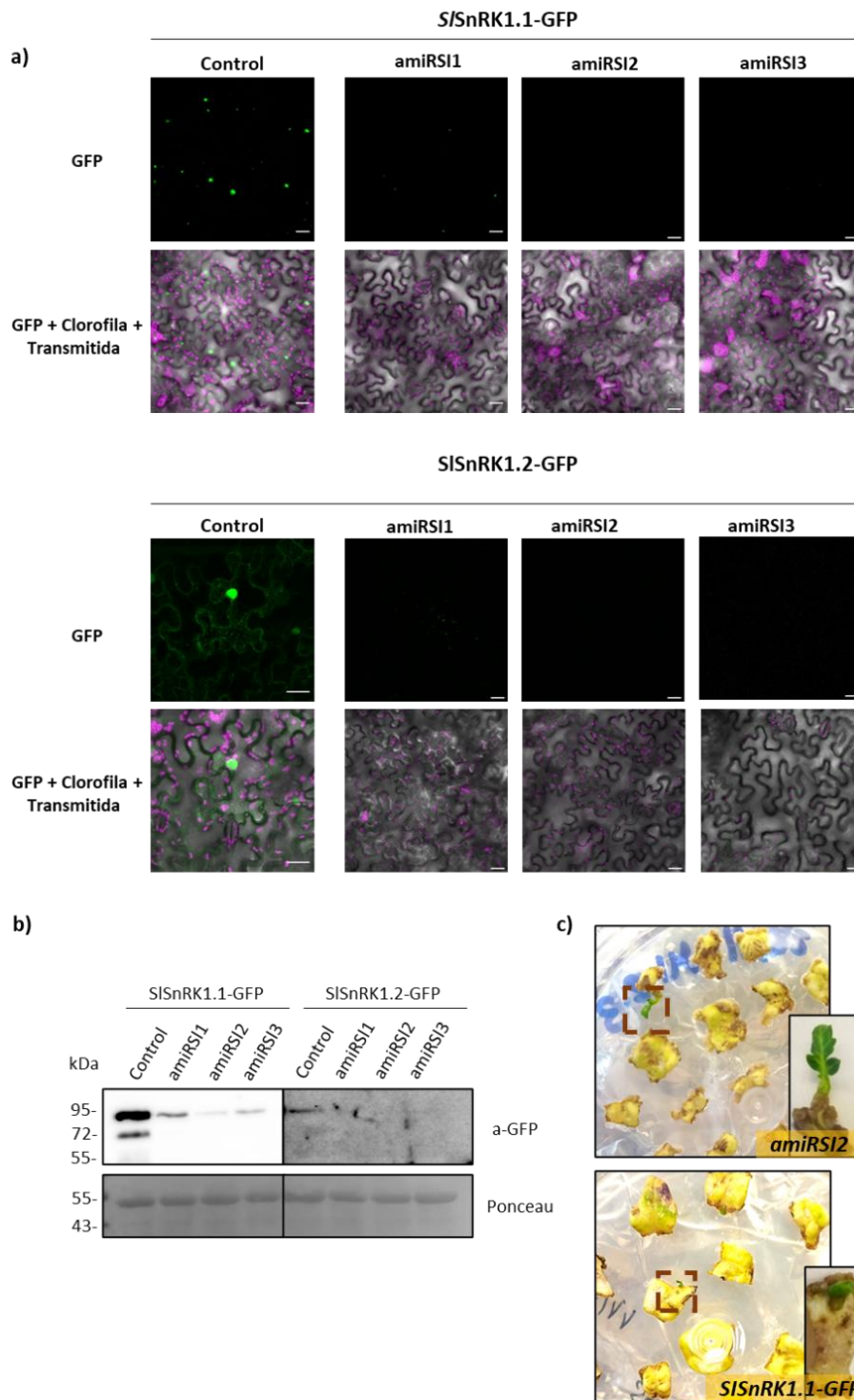
Los mecanismos moleculares a través de los cuales los viroides, sin capacidad codificante, pueden modificar la actividad de una proteína quinasa como TOR en plantas de tomate permanecen por descubrir. Este hecho supone un enorme reto para los investigadores especializados en patogénesis vegetal. Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de TOR estimula la inmunidad y la resistencia a patógenos de tomate como *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Xanthomonas euvesicatoria* de forma dependiente de ácido salicílico, lo que demuestra la interconexión entre varios procesos de señalización celular y al mismo tiempo la gran complejidad de la respuesta de las plantas frente a patógenos (Marash et al., 2022). Por otra parte, tal y como se ha comentado previamente, la inhibición de la actividad TOR reduce el estrés proteotóxico causado por ribosomopatías (Recasens-Alvarez et al., 2021), entre las que podrían encontrarse las causadas por viroides, que se ha observado se asocian a los ribosomas produciendo alteraciones en su biogénesis (Cottilli et al., 2019). En levadura, se ha descrito que la ruta de señalización de TOR participa en la biogénesis de ribosomas (Busche et al., 2021; Powers & Walter, 1999) y que TOR interacciona con los ribosomas, siendo éstos necesarios para la activación de la señalización de complejo mTORC2 (Xie & Guan, 2011). Una posible explicación de nuestros resultados podría ser que el viroide interaccionara con el ribosoma a través de TOR, permitiendo su activación y reduciendo así el flujo autofágico. De nuevo, nuestros resultados invitan a la realización de nuevos experimentos de interacción entre el viroide y proteínas vegetales para elucidar los mecanismos moleculares de la patogénesis viroidal.

## 4.5 Generación de plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de SnRK1

Las funciones moleculares y fisiológicas de SnRK1 en tomate se desconocen totalmente y los descubrimientos relativos a SnRK1 en *A. thaliana* no siempre son aplicables entre diferentes especies vegetales. Además, para nuestro conocimiento, no existen plantas transgénicas de tomate con niveles alterados de SnRK1. Por tanto, para el estudio de la función de SnRK1 en tomate que nos ayude a investigar, entre otros, el papel de esta quinasa en la patogénesis viroidal, se ha iniciado en este trabajo la generación de líneas transgénicas de tomate de ganancia y pérdida de función de SnRK1, en colaboración con la Dra. Ana Confraria del Instituto Gulbenkian de Ciência (Portugal). En el inicio de mi estancia investigadora en el IBCMP ya estaban disponibles las construcciones con potencial interés de ser transformadas en tomate (Tabla 1 de la sección de Materiales y Métodos). Por un lado, se disponía de dos construcciones que producían la sobreexpresión de cada una de las subunidades catalíticas que se conocen en el genoma de tomate, *S/SnRK1.1* (Solyc02g067030) y *S/SnRK1.2* (Solyc03g115700) (Su & Devarenne, 2018), fusionadas en C-terminal a la proteína fluorescente verde (*S/SnRK1.1-GFP* y *S/SnRK1.2-GFP*). Por otro lado, podíamos emplear tres construcciones que provocaban el silenciamiento de SnRK1.1 y SnRK1.2 a través la expresión de microRNAs artificiales (*amiRS1*, *amiRS2* y *amiRS3*) frente a SnRK1.1 y SnRK1.2. Estos amiRs fueron diseñados previamente por la Dra. Confraria a través de la herramienta *on-line* WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>), calculando unas energías de hibridación para SnRK1.1 y SnRK1.2 del 99.31% y 80.42%, del 95,47% y 95,47%, y del de 82.63% y 78.26%, para *amiRS1*, *amiRS2* y *amiRS3*, respectivamente.

Para validar las construcciones enviadas por la Dra. Confraria se realizaron experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* de *S/SnRK1.1-GFP* y *S/SnRK1.2-GFP*, en las que se evaluó tanto la expresión como la localización subcelular de dichas proteínas. Asimismo, se analizó la capacidad de silenciar la expresión tanto de *S/SnRK1.1-GFP* como de *S/SnRK1.2-GFP* por parte de cada uno de los amiRs. Como muestran las imágenes de microscopía confocal (Figura 10), *S/SnRK1.1-GFP* presentaba una localización citoplasmática en forma de estructuras puntuadas que se asemejaban a vesículas. En cambio, *S/SnRK1.2-GFP* mostraba una localización citoplasmática y nuclear, siendo predominante esta última (Figura 10a). La co-infiltración de estas proteínas junto a cada uno de los amiRs diseñados disminuyó drásticamente la expresión de éstas, hecho que se confirmó mediante la visualización de la fluorescencia (Figura 10a) y la inmunodetección de las bandas inmunogénicas que correlacionaban perfectamente con el peso molecular esperado para las proteínas de fusión (Figura 10b). Dado que el silenciamiento producido por *amiRS2* fue ligeramente superior al resto, se escogió esta construcción para ser transformada en tomate y generar plantas transgénicas con niveles disminuidos tanto de *S/SnRK1.1* como de *S/SnRK1.2*. También, y puesto que se ha demostrado que *S/SnRK1.2* tiene una actividad quinasa mucho más baja que *S/SnRK1.1*, sugiriendo la función predominante de esta última para la fisiología de la planta (90% de la actividad total) (Su & Devarenne, 2018), se escogió a *S/SnRK1.1* para la generación de plantas transgénicas sobreexpresoras mediante su transformación en plantas de tomate.

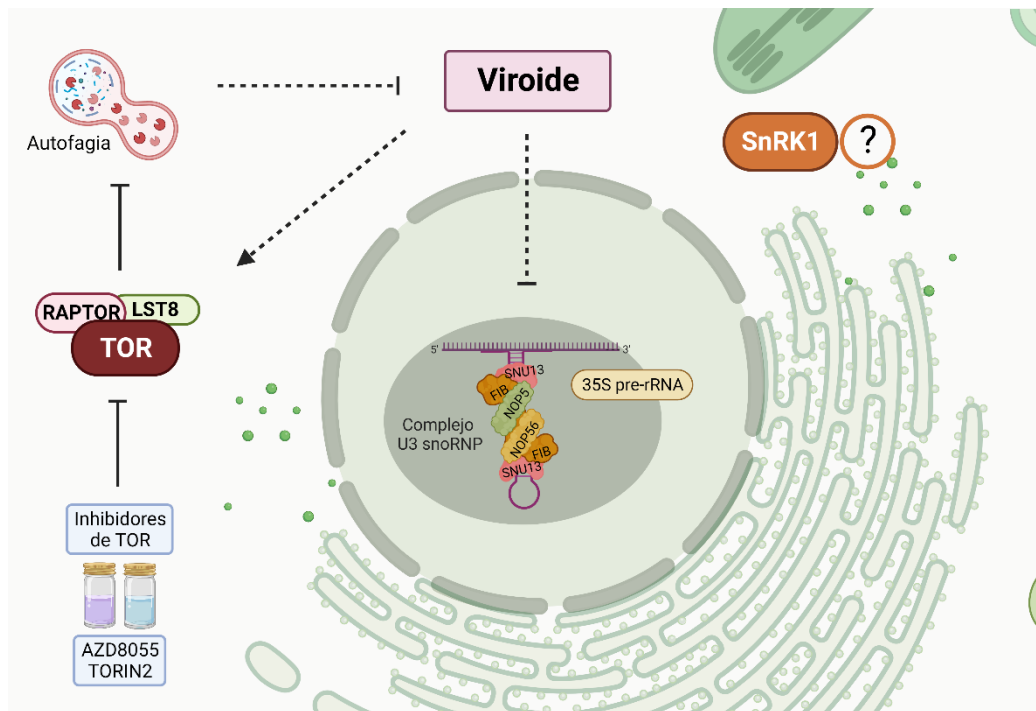
Durante este trabajo de final de máster se ha completado la transformación estable de plantas de tomate con las construcciones *S/SnRK1.1-GFP* y *amiRS2*, obteniéndose explantes resistentes para el antibiótico de selección (Figura 10c), que serán subcultivados de forma sucesiva hasta la obtención de las plantas transgénicas de interés.



**Figura 10. Validación *in vivo* de las construcciones sobreexpresoras (*S/SnRK1.1-GFP* y *S/SnRK1.2-GFP*) y silenciadoras de *SnRK1.1* y *SnRK1.2* (*amiRSI1*, *amiRSI2* y *amiRSI3*) mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. (a) Fotografías representativas capturadas mediante el microscopio confocal de fluorescencia de hojas de *N. benthamiana* expresando transitoriamente las construcciones *S/SnRK1.1-GFP* o *S/SnRK1.2-GFP*, co-infiltradas o no con las construcciones de silenciamiento *amiRSI1*, *amiRSI2* o *amiRSI3*. Cada imagen corresponde a la compilación de un intervalo de diferentes planos de enfoque (Z-stack). Barras de escala, 30  $\mu$ m. (b) Análisis inmuno-Western Blot de los niveles de *S/SnRK1.1-GFP* y *S/SnRK1.2-GFP* a partir de hojas de *N. benthamiana* para cada una de las agroinfiltraciones descritas anteriormente. Como control de carga, se muestran los niveles de la subunidad grande de la Rubisco (tinción de Ponceau). (c) Cultivo con presión selectiva de la transformación de tomate *cv. MoneyMaker* con las construcciones *S/SnRK1.1-GFP* y *amiRSI2*.**

#### 4.6 Una nueva perspectiva de la patogénesis viroidal

Los resultados de este Trabajo Fin de Máster nos permiten elaborar un esquema conceptual que expande el conocimiento de la patogénesis viroidal más allá de los amplios estudios realizados sobre variaciones en secuencia, replicación, interferencia, movimiento, silenciamiento génico u otros estudios clásicos, profundizando en las anomalías en la biogénesis de los ribosomas y abriendo nuevas perspectivas acerca de la interferencia de la replicación del viroide con el eje maestro SnRK1-TOR que controla mecanismos celulares hasta ahora no considerados en patogénesis viroidal, como son la autofagia defensiva y la redistribución de recursos energéticos para hacer frente a la infección (Figura 11).



**Figura 11. Nuevos conocimientos sobre patogénesis viroidal:** alteración de la biogénesis de ribosomas e interferencia con el eje SnRK1-TOR. TOR: *target of Rapamycin*; SnRK1: *Sucrose non-fermenting-Related protein Kinase 1*; FIB: fibrilarina. Creado con BioRender.com.

## 5 CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en este Trabajo de Final de Máster, podemos sugerir las siguientes conclusiones:

- 1- La infección del viroide PSTVd altera el patrón de expresión de la fibrilarina, factor esencial del complejo U3 snoRNP. Esto sugiere que el PSTVd podría estar alterando el procesamiento de los pre-rRNAs a través de su interferencia con el funcionamiento del U3 snoRNP.
- 2- La infección de PSTVd no parece afectar a la actividad de SnRK1 (fosforilación del *T-loop* de activación) ni a la regulación transcripcional mediada por esta quinasa en plantas de tomate.
- 3- La acumulación de los niveles del receptor de carga de autofagia selectiva NBR1, sugieren que la infección de PSTVd inhibe el proceso de autofagia selectiva en tomate.
- 4- La inhibición de TOR alivia la sintomatología viroidal en tomate, recupera el flujo autofágico (disminución de los niveles de NBR1) y disminuye la acumulación de PSTVd.
- 5- Se han validado las construcciones para producir la sobreexpresión o el silenciamiento de SnRK1 de tomate y se ha iniciado la generación de plantas transgénicas de tomate para el análisis exhaustivo de la función de SnRK1 en la patogénesis viroidal y otras interacciones planta-patógeno.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- Adkar-Purushothama, C. R., Bolduc, F., Bru, P., & Perreault, J. P. (2020). Insights Into Potato Spindle Tuber Viroid Quasi-Species From Infection to Disease. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1235. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01235/BIBTEX>
- Adkar-Purushothama, C. R., Iyer, P. S., & Perreault, J. P. (2017). Potato spindle tuber viroid infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like and Ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Scientific Reports* *2017 7:1*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08823-z>
- Adkar-Purushothama, C. R., Kasai, A., Sugawara, K., Yamamoto, H., Yamazaki, Y., He, Y. H., Takada, N., Goto, H., Shindo, S., Harada, T., & Sano, T. (2015). RNAi mediated inhibition of viroid infection in transgenic plants expressing viroid-specific small RNAs derived from various functional domains. *Sci. Rep.*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/srep17949>
- Arias, G. G. (2014). Emergencia del viroide del tubérculo ahusado de la papa (Potato spindle tuber viroid) (PSTVd) en la región del Caribe. *Fitosanidad*, *18*(3), 181–182. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0804-01>
- Avin-Wittenberg, T., Baluška, F., Bozhkov, P. V., Elander, P. H., Fernie, A. R., Galili, G., Hassan, A., Hofius, D., Isono, E., Le Bars, R., Masclaux-Daubresse, C., Minina, E. A., Peled-Zehavi, H., Coll, N. S., Sandalio, L. M., Satiat-Jeunemaitre, B., Sirko, A., Testillano, P. S., & Batoko, H. (2018). Autophagy-related approaches for improving nutrient use efficiency and crop yield protection. *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1335–1353. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY069>
- Baena-González, E., & Hanson, J. (2017). Shaping plant development through the SnRK1–TOR metabolic regulators. *Current Opinion in Plant Biology*, *35*, 152–157. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2016.12.004>
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* *2007 448:7156*, *448*(7156), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
- Belda-Palazón, B., Adamo, M., Valerio, C., Ferreira, L. J., Confraria, A., Reis-Barata, D., Rodrigues, A., Meyer, C., Rodriguez, P. L., & Baena-González, E. (2020). A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nature Plants* *2020 6:11*, *6*(11), 1345–1353. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-00778-w>
- Belda-Palazón, B., Costa, M., Beeckman, T., Rolland, F., & Baena-González, E. (2022). ABA represses TOR and root meristem activity through nuclear exit of the SnRK1 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *119*(28), e2204862119. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2204862119/SUPPL\\_FILE/PNAS.2204862119.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.2204862119/SUPPL_FILE/PNAS.2204862119.SAPP.PDF)
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLOS ONE*, *7*(10), e46907. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0046907>
- Belles, J. M., Garro, R., Pallás, V., Fayos, J., Rodrigo, I., & Conejero, V. (2006). Accumulation of gentisic acid as associated with systemic infections but not with the hypersensitive response in plant-pathogen interactions. *Planta*, *223*, 500–511.



<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0109-8>

- Biswal, B., Joshi, P., M, R., & Biswal, U. (2011). *Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation on JSTOR*. Current Science Association. <https://www.jstor.org/stable/24077862>
- Busche, M., Regina Scarpin, M., Hnasko, R., & Brunkard, J. O. (2021). TOR coordinates nucleotide availability with ribosome biogenesis in plants. *Plant Cell*, 33(5), 1615–1632. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab043>
- Carbonell, A. (2014). *Degradacion in vitro de un RNA nucleolar por un ribozima incluido en un pequeno RNA nucleolar Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos Departamento de Biotecnología Universidad Politécnica de Valencia Alberto Carbonell Olivares Valencia , 2001. May*. <https://doi.org/10.13140/2.1.1034.5284>
- Chen, L., Su, Z. Z., Huang, L., Xia, F. N., Qi, H., Xie, L. J., Xiao, S., & Chen, Q. F. (2017). The AMP-activated protein kinase kin10 is involved in the regulation of autophagy in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1201. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01201/BIBTEX>
- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death & Differentiation* 2011 18:8, 18(8), 1247–1256. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.37>
- Cottilli, P., Belda-Palazón, B., Adkar-Purushothama, C. R., Perreault, J. P., Schleiff, E., Rodrigo, I., Ferrando, A., & Lisón, P. (2019). Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Research*, 47(16), 8649–8661. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ679>
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C. A., & Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*, 5(MAY), 190. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00190/BIBTEX>
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Arplant-050213-040012>, 66, 487–511. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050213-040012>
- De Vleeschauwer, D., Filipe, O., Hoffman, G., Seifi, H. S., Haeck, A., Canlas, P., Van Bockhaven, J., De Waele, E., Demeestere, K., Ronald, P., & Hofte, M. (2018). Target of rapamycin signaling orchestrates growth–defense trade-offs in plants. *New Phytologist*, 217(1), 305–319. <https://doi.org/10.1111/NPH.14785>
- Decle-Carrasco, S., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castano, E. (2021). Plant viral proteins and fibrillarin: the link to complete the infective cycle. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4677–4686. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06401-1>
- Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R., Pallas, V., Randles, J., Sano, T., Verhoeven, J., Vidalakis, G., & Flores, R. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Avsunviroidae. *Journal of General Virology*, 99, 611–612. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>
- Di Serio, F., Owens, R., Li, S.-F., Matoušek, J., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J., Vidalakis, G., & Flores, R. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: Pospiviroidae. *Journal of General Virology*, 102, 1543. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001543>
- Ding, B. (2009). The Biology of Viroid-Host Interactions. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Phyto-080508-081927>, 47, 105–131. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-080508-081927>



- Ding, B., Itaya, A., & Zhong, X. (2005). Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(6), 606–612. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2005.09.001>
- Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, M., Robaglia, C., Ryabova, L. A., Hanson, J., & Meyer, C. (2016). The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Frontiers in Plant Science*, 7(November 2016). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.01611>
- Ellul, P., Garcia-Sogo, B., Pineda, B., Ríos, G., Roig, L. A., & Moreno, V. (2003). The ploidy level of transgenic plants in Agrobacterium-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L.Mili.) is genotype and procedure dependent. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(2), 231–238. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0928-y>
- Filipe, O., De Vleeschauwer, D., Haeck, A., Demeestere, K., & Höfte, M. (2018). The energy sensor OsSnRK1a confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22101-6>
- Flores, R., Daròs, J. A., & Hernández, C. (2000). Avsunviroidae family: Viroids containing hammerhead ribozymes. *Advances in Virus Research*, 55, 271–323. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(00\)55006-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(00)55006-4)
- Flores, R., Gago-Zachert, S., Serra, P., Sanjuán, R., & Elena, S. F. (2014). Viroids: Survivors from the RNA World? <https://doi.org/10.1146/Annurev-Micro-091313-103416>, 68, 395–414. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-091313-103416>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Pedro, J. M. B.-S., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.-L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201796697>
- Gómez, G., Martínez, G., & Pallás, V. (2008). Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity. *Plant Physiology*, 148(1), 414. <https://doi.org/10.1104/PP.108.120808>
- Góra-Sochacka, A., Wiesyk, A., Fogtmann, A., Lirski, M., & Zagórski-Ostoja, W. (2019). Root Transcriptomic Analysis Reveals Global Changes Induced by Systemic Infection of *Solanum lycopersicum* with Mild and Severe Variants of Potato Spindle Tuber Viroid. *Viruses* 2019, Vol. 11, Page 992, 11(11), 992. <https://doi.org/10.3390/V11110992>
- Greenberg, J., & Yao, N. (2004). The role of regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology*, 6(3), 201–211. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2004.00361.X>
- Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I., Gull, A., Lone, A. A., & Wani, N. U. I. (2019). Biotic and Abiotic Stresses in Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85832>
- Hafrén, A., Üstün, S., Hochmuth, A., Svenning, S., Johansen, T., & Hofius, D. (2018). Turnip Mosaic Virus Counteracts Selective Autophagy of the Viral Silencing Suppressor HCpro. *Plant Physiology*, 176(1), 649–662. <https://doi.org/10.1104/PP.17.01198>
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (2003). Geminivirus AL2 and L2 Proteins Interact with and Inactivate SNF1 Kinase. *The Plant Cell*, 15(4), 1034–1048. <https://doi.org/10.1105/TPC.009530>

- Haxim, Y., Ismayil, A., Jia, Q., Wang, Y., Zheng, X., Chen, T., Qian, L., Liu, N., Wang, Y., Han, S., Cheng, J., Qi, Y., Hong, Y., & Liu, Y. (2017). Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. *ELife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.23897>
- Herranz, M. C., Pallas, V., & Aparicio, F. (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: Nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(8), 1093–1103. [https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0079-R/SUPPL\\_FILE/MPMI-04-12-0079-RE1.PDF](https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0079-R/SUPPL_FILE/MPMI-04-12-0079-RE1.PDF)
- Jamsheer K, M., Kumar, M., & Srivastava, V. (2021). SNF1-related protein kinase 1: the many-faced signaling hub regulating developmental plasticity in plants. *Journal of Experimental Botany*, *72*(17), 6042–6065. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAB079>
- Jones, J., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* *2006* *444*:7117, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kalinina, N. O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A. J., & Taliansky, M. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 132. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00132>
- Kressler, D., Hurt, E., & Baßler, J. (2017). A Puzzle of Life: Crafting Ribosomal Subunits. *Trends in Biochemical Sciences*, *42*(8), 640–654. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2017.05.005>
- Lafontaine, D. L. J., & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2001* *2*:7, *2*(7), 514–520. <https://doi.org/10.1038/35080045>
- Ling, K. S., Li, R., Panthee, D. R., & Gardner, R. G. (2013). First Report of Potato spindle tuber viroid Naturally Infecting Greenhouse Tomatoes in North Carolina. *Plant Disease*, *97*(1), 148. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0679-PDN>
- Lisón, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., Bellés, J. M., Conejero, V., & Rodrigo, I. (2013). A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *Proteomics*, *13*(5), 833–844. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200286>
- Liu, Y., & Xiong, Y. (2020). Plant target of rapamycin signaling network: Complexes, conservations, and specificities OO. *JIPB Journal of Integrative Plant Biology*. <https://doi.org/10.1111/jipb.13212>
- Marash, I., Leibman-Markus, M., Gupta, R., Avni, A., & Bar, M. (2022). TOR inhibition primes immunity and pathogen resistance in tomato in a salicylic acid-dependent manner. *Molecular Plant Pathology*, *23*(7), 1035–1047. <https://doi.org/10.1111/mpp.13207>
- Margalha, L., Confraria, A., & Baena-González, E. (2019). SnRK1 and TOR: Modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses. *Journal of Experimental Botany*, *70*(8), 2261–2274. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz066>
- Marmier-Gourrier, N., Cléry, A., Schlotter, F., Senty-Ségault, V., & Branlant, C. (2011). A second base pair interaction between U3 small nucleolar RNA and the 5'-ETS region is required for early cleavage of the yeast pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(22), 9731–9745. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKR675>
- Mugume, Y., Kazibwe, Z., & Bassham, D. C. (2020). Target of Rapamycin in Control of Autophagy: Puppet Master and Signal Integrator. *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, *Vol. 21*, *Page 8259*, *21*(21), 8259. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218259>

- Navarro, B., Flores, R., & Di Serio, F. (2021). Advances in Viroid-Host Interactions. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev-Virology-091919-092331*, 8, 305–325. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-091919-092331>
- Ouibrahim, L., Rubio, A. G., Moretti, A., Montané, M. H., Menand, B., Meyer, C., Robaglia, C., & Caranta, C. (2015). Potyviruses differ in their requirement for TOR signalling. *Journal of General Virology*, 96(9), 2898–2903. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.000186/CITE/REFWORKS>
- Owens, R. ., & Verhoeven, J. (2009). Potato Spindle Tuber. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0804-01>
- Pérez-Cañamás, M., Taliansky, M., & Hernández, C. (2022). A Viral Suppressor of RNA Silencing May Be Targeting a Plant Defence Pathway Involving Fibrillarlin. *Plants*, 11(15), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants11151903>
- Polge, C., & Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in Plant Science*, 12(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.005>
- Potato spindle tuber viroid (PSTVD0)[Documents]* EPPO Global Database. (n.d.). Retrieved December 25, 2022, from <https://gd.eppo.int/taxon/PSTVD0/documents>
- Powers, T., & Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR- signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 10(4), 987–1000. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.4.987>
- Prol, F. V., Márquez-Molins, J., Rodrigo, I., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Gómez, G., Pallás, V., & Lisón, P. (2021). Symptom severity, infection progression and plant responses in solanum plants caused by three pospiviroids vary with the inoculation procedure. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126189>
- Puente, C., Hendrickson, R. C., & Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated phosphorylation of ATG13 inhibits starvation-induced autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), 6026–6035. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689646>
- Qi, Y., & Ding, B. (2003). Differential Subnuclear Localization of RNA Strands of Opposite Polarity Derived from an Autonomously Replicating Viroid. *The Plant Cell*, 15(11), 2566. <https://doi.org/10.1105/TPC.016576>
- Ramon, M., Dang, T. V. T., Broeckx, T., Hulsmans, S., Crepin, N., Sheen, J., & Rolland, F. (2019). Default Activation and Nuclear Translocation of the Plant Cellular Energy Sensor SnRK1 Regulate Metabolic Stress Responses and Development. *The Plant Cell*, 31(7), 1614–1632. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00500>
- Recasens-Alvarez, C., Alexandre, C., Kirkpatrick, J., Nojima, H., Huels, D. J., Snijders, A. P., & Vincent, J. P. (2021). Ribosomopathy-associated mutations cause proteotoxic stress that is alleviated by TOR inhibition. *Nature Cell Biology*, 23(2), 127–135. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00626-1>
- Roustan, V., Jain, A., Teige, M., Ebersberger, I., & Weckwerth, W. (2016). An evolutionary perspective of AMPK–TOR signaling in the three domains of life. *Journal of Experimental Botany*, 67(13), 3897–3907. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERW211>
- Sáez-Vásquez, J., & Delseny, M. (2019). Ribosome Biogenesis in Plants: From Functional 45S Ribosomal DNA Organization to Ribosome Assembly Factors. *The Plant Cell*, 31(9), 1945–

1967. <https://doi.org/10.1105/TPC.18.00874>

- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., & Ryabova, L. A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *The EMBO Journal*, *30*(7), 1343–1356. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2011.39>
- Semashko, M. A., González, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Taliany, M. E., Canto, T., & Kalinina, N. O. (2012). The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie*, *94*(5), 1180–1188. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2012.02.005>
- Shaw, P. J. (2015). Nucleolus. In *eLS* (Issue November 2015, pp. 1–11). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001352.pub4>
- Signorelli, S., Tarkowski, Ł. P., Van den Ende, W., & Bassham, D. C. (2019). Linking Autophagy to Abiotic and Biotic Stress Responses. *Trends in Plant Science*, *24*(5), 413–430. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2019.02.001>
- Soto-Burgos, J., & Bassham, D. C. (2017). SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, *12*(8), e0182591. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0182591>
- Steinberg, G. R., & Carling, D. (2019). AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, *18*(7), 527–551. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0019-2>
- Stephani, M., & Dagdas, Y. (2020). Plant Selective Autophagy—Still an Uncharted Territory With a Lot of Hidden Gems. *Journal of Molecular Biology*, *432*(1), 63–79. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2019.06.028>
- Su, D., & Devarenne, T. P. (2018). In vitro activity characterization of the tomato SnRK1 complex proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1866*(8), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2018.05.010>
- Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., & Johansen, T. (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy*, *7*(9), 993–1010. <https://doi.org/10.4161/auto.7.9.16389>
- Tsagris, E., Martínez de Alba, Á. E., Gozmanova, M., & Kalantidis, K. (2008). Viroids. *Cellular Microbiology*, *10*(11), 2168–2179. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2008.01231.X>
- Verhoeven, Jt., Jansen, C., Willems, T., Kox, L., Owens, R., & Roenhorst, J. (2004). Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, *110*, 823–831.
- Verma, S., Nizam, S., & Verma, P. K. (2013). Biotic and abiotic stress signaling in plants. *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 1*, 25–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6372-6\\_2/FIGURES/00022](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6372-6_2/FIGURES/00022)
- Wallot-Hieke, N., Verma, N., Schlütermann, D., Berleth, N., Deitersen, J., Böhrer, P., Stuhldreier, F., Wu, W., Seggewiß, S., Peter, C., Gohlke, H., Mizushima, N., & Stork, B. (2018). Systematic analysis of ATG13 domain requirements for autophagy induction. *Autophagy*, *14*(5), 743–763. [https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1387342/SUPPL\\_FILE/KAUP\\_A\\_1387342\\_SM7886.DOC](https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1387342/SUPPL_FILE/KAUP_A_1387342_SM7886.DOC)

- Wang, P., Mugume, Y., & Bassham, D. C. (2018). New advances in autophagy in plants: Regulation, selectivity and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *80*, 113–122. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.07.018>
- Weis, B. L., Kovacevic, J., Missbach, S., & Schleiff, E. (2015). Plant-Specific Features of Ribosome Biogenesis. *Trends in Plant Science*, *20*(11), 729–740. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2015.07.003>
- Xie, X., & Guan, K. L. (2011). The ribosome and TORC2: Collaborators for cell growth. *Cell*, *144*(5), 640–642. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.029>
- Xie, X., Guo, P., Yu, H., Wang, Y., & Chen, G. (2017). Ribosomal proteins: insight into molecular roles and functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene 2017 37:3*, *37*(3), 277–285. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.343>
- Yang, X., & Bassham, D. C. (2015). New Insight into the Mechanism and Function of Autophagy in Plant Cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *320*, 1–40. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2015.07.005>
- Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R., & Ding, B. (2002). Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol.*, *130*(1), 138–146. <https://doi.org/10.1104/pp.006403>

## Anexo I

**Relación del TFM “Nuevos conocimientos sobre patogénesis viroidal: Alteración de la biogénesis de ribosomas e interferencia con el eje SnRK1-TOR” con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

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

La biotecnología vegetal tiene un papel fundamental en el desarrollo de respuestas sostenibles ante la emergencia agroalimentaria y climática. Este Trabajo Final de Máster contribuye a la generación de herramientas necesarias para desarrollar y obtener plantas más productivas y mejor adaptadas a condiciones adversas como es un ataque patogénico. Esto contribuye en gran medida a alcanzar los ODS 2, 12 y 13 ya que, del conocimiento de la respuesta defensiva de las plantas, se pueden implementar nuevas estrategias que permitan obtener plantas más resistentes a plagas y enfermedades, reduciendo el uso de los plaguicidas, así como las pérdidas de producción y, por lo tanto, a alcanzar una mayor producción en plantas de interés agronómico, lo que está estrechamente relacionado con abastecer a la población de más alimentos.

Por último, también se contribuye al ODS 5, el relacionado con la igualdad de género, ya que el equipo de investigación donde se ha realizado este TFM está liderado por mujeres en un laboratorio y un instituto que practican de manera activa una política inclusiva.

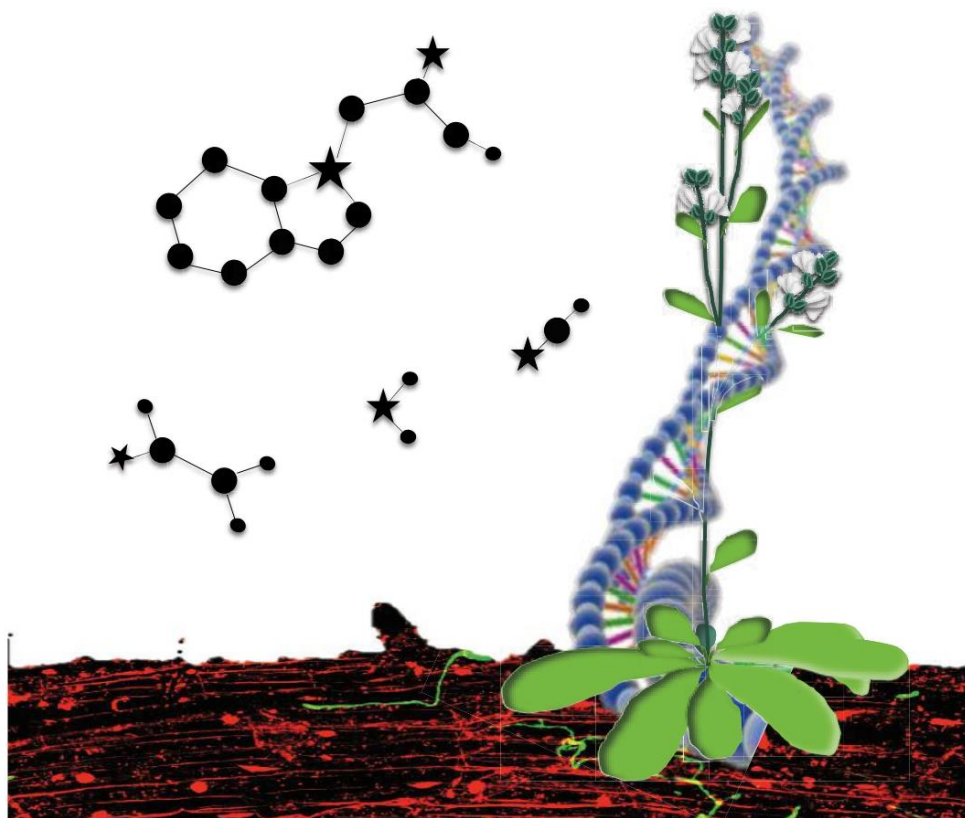
## Anexo II

Los resultados de este trabajo han sido presentados en forma de póster en el XVI Meeting of Plant Molecular Biology, Sevilla, 14-16 de septiembre de 2022.  
(<https://www.bcongresos.com/congresos/rbmp2022/>)

XVI MEETING OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY



ABSTRACT BOOK





## NEW INSIGHTS INTO THE PATHOGENESIS OF THE CITRUS EXOCORTIS VIROID IN TOMATO PLANTS

Francisco Vázquez Prol, Samanta Silva, Borja Belda-Palazón, M<sup>a</sup> Pilar López-Gresa, Ismael Rodrigo, José M<sup>a</sup> Bellés, and Purificación Lisón.

*Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València -Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain.*

Corresponding author: Purificación Lisón, [plison@ibmcp.upv.es](mailto:plison@ibmcp.upv.es)



Viroids cause very severe diseases in numerous plants, resulting in a variety of symptoms that often resemble those produced by viral infections. We have described that Citrus exocortis viroid (CEVd) causes ribosomal stress in tomato plants, thus uncovering a new dimension of viroid pathogenesis (Cottilli *et al.*, 2019). A possible relation between the plant hormone ethylene (ET), symptom development and ribosomal stress of tomato plants upon CEVd infection has been proposed (Prol *et al.* 2020).

To understand the role of ET in CEVd pathogenicity, tomato plants were treated with an ET-releasing compound (2-chloroethylphosphonic acid; ethephon) and an inhibitor of ET signalling (1-methylcyclopropene; 1-MCP). Whilst ET levels increased in ethephon-treated plants but not in CEVd-inoculated plants, ribosomal stress was observed in both. CEVd-inoculated plants displayed more severe symptoms when compared with non-infected plants. However, symptoms failed to appear in 1-MCP treated plants. Our results indicate that ET is involved in the development of ribosomal stress in viroid-inoculated plants, since ET signalling appears necessary for symptom development upon an infection by CEVd in tomato.

The protein kinase target of rapamycin (TOR), a master regulator in the coordination of cell growth, has also been described to be involved in the regulation of ET signalling (Fu *et al.* 2021). Interestingly, inhibition of TOR alleviates the proteotoxic stress caused by ribosomopathies (Recasens-Alvarez *et al.*, 2021). We hypothesized that TOR inhibition could also alleviate ribosomal stress and therefore, the symptomatology of tomato plants infected with CEVd. Indeed, treatments with TOR inhibitors AZD8055 and torin2 appear to reduce the symptomatology caused by CEVd, suggesting the involvement of the TOR signalling pathway in the development of viroid pathogenesis.

Our results provide new insights into the pathogenesis of the Citrus exocortis viroid, pointing out an important role of ET and the TOR signalling pathway in this process.

### References

- Cottilli P, Belda-Palazón B, Adkar-Purushothama CR, Perreault JP, Schleiff E, Rodrigo I, Ferrando A, Lisón P. Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Res.* 2019 Sep 19;47(16):8649-8661. doi: 10.1093/nar/gkz679.
- Prol FV, López-Gresa MP, Rodrigo I, Bellés JM, Lisón P. Ethylene is Involved in Symptom Development and Ribosomal Stress of Tomato Plants upon Citrus Exocortis Viroid Infection. *Plants (Basel).* 2020 May 2;9(5):582. doi: 10.3390/plants9050582.
- Recasens-Alvarez C, Alexandre C, Kirkpatrick J, Nojima H, Huels DJ, Snijders AP, Vincent JP. Ribosomopathy-associated mutations cause proteotoxic stress that is alleviated by TOR inhibition. *Nat Cell Biol.* 2021 Feb;23(2):127-135. doi: 10.1038/s41556-020-00626-1.
- Fu L, Liu Y, Qin G, Wu P, Zi H, Xu Z, Zhao X, Wang Y, Li Y, Yang S, Peng C, Wong CCL, Yoo SD, Zuo Z, Liu R, Cho YH, Xiong Y. The TOR-EIN2 axis mediates nuclear signalling to modulate plant growth. *Nature.* 2021 Mar;591(7849):288-292. doi: 10.1038/s41586-021-03310-y.

### Acknowledgements & Funding

This work was supported by Grant PID2020-116765RB-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Work in the lab was also supported by grant PROMETEU/2021/056 by Generalitat Valenciana. Borja Belda-Palazón is a recipient of a María Zambrano postdoctoral contract at the Universitat Politècnica de València.



## New insights into the pathogenesis of viroids in tomato plants

Vázquez Prol, Francisco; Silva, Samanta; Belda-Palazón, Borja; López-Gresa, María Pilar; Rodrigo, Ismael; Bellés, José María; Lisón, Purificación.

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Valencia, Spain

The volatile hormone ethylene plays an important role in viroid pathogenesis and symptom development. Previous work has shown a possible relation between ethylene, symptom development and ribosomal stress of tomato plants upon viroid infection. The protein kinase target of rapamycin (TOR), a master regulator in the coordination of cell growth, has also been described to be involved in the regulation of ET signaling. To understand the role of ET and TOR in viroid pathogenicity, treatments with an ethylene releasing compound (2-Chloroethylphosphonic acid; **ethephon**), an inhibitor of ethylene signaling (1-Methylcyclopropene; **1-MCP**), or TOR inhibitors (**AZD8055** and **torin2**) were used to analyze the response of tomato plants to viroids.

### 1 ETHYLENE IS INVOLVED IN RIBOSOMAL STRESS

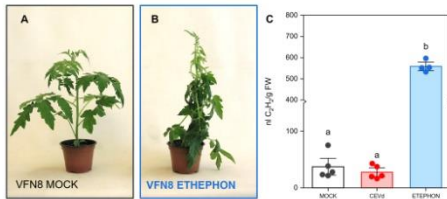


Figure 1. Plant phenotypes and ethylene levels at 20 day-old. Representative phenotypes of VFN wild type (A), ethephon-treated (5mM; 48hpt) (B).

Plants treated with **ethephon** displayed highly leaf epinasty, which is a symptom related to ethylene overproduction. When looking at ethylene biosynthesis, higher levels of ethylene were only observed in ethephon-treated plants (Figure 1C).

*Pathogenesis related 1 (PR1)* is used as a marker for defense activation upon pathogen infection. The expression of this gene (Figure 2A) was higher in both CEVd-infected and ethephon treated tomato plants.

*NAC082* is a ribosomal stress marker. This gene was induced both by ethephon and CEVd in tomato plants (Figure 2B).

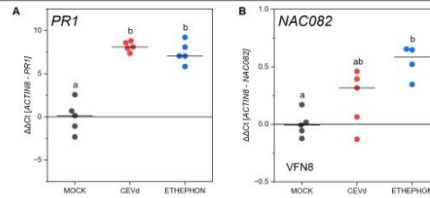


Figure 2. Expression analysis of *Pathogenesis Related 1 (PR1)* and *NAC082* at 20 dpi. Real-time PCR analysis of *PR1* (left) and *NAC082* (right) expression.

### 2 ETHYLENE SIGNALING IS NECESSARY FOR SYMPTOM DEVELOPMENT UPON CEVd INFECTION

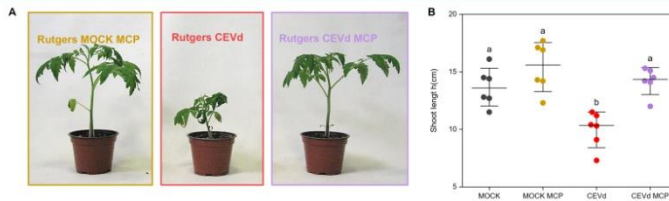


Figure 3. Symptomatology at 19 dpi. (A) Representative phenotype of mock (left), CEVd-inoculated (middle) and CEVd-inoculated + MCP-treated (right) plants. (B) Shoot length of Mock, MCP-treated mock, CEVd-inoculated and CEVd-inoculated + MCP-treated plants.

CEVd symptoms include **dwarfism** and **leaf epinasty**.

**1-MCP** is an inhibitor of ethylene signaling. CEVd-infected tomato plants treated with this inhibitor did not display characteristic symptoms and their height was similar to that displayed by mock treated plants (Figure 3A and B) (weekly treatments with 0.62 ppm).

**Blocking** ethylene signaling prevents from developing of symptoms caused by CEVd infection in tomato plants.

### 3 TOR SIGNALING IS REQUIRED FOR SYMPTOM DEVELOPMENT UPON PSTVd INFECTION

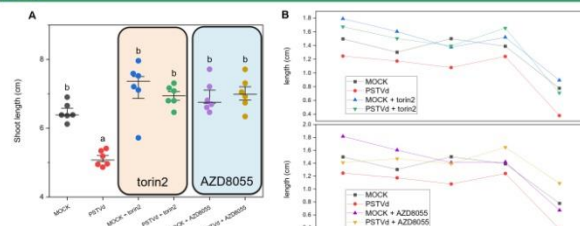


Figure 4. Symptomatology at 14 dpi. (A) Shoot length and (B) Internode length of Mock, PSTVd-inoculated, Mock and PSTVd-inoculated + torin2 treated plants, Mock and PSTVd-inoculated + AZD 8055 treated plants.

PSTVd-inoculated tomato plants at 14 dpi displayed **dwarfism**, measured as the height of the shoot and length between nodes (Figure 4A and B).

**AZD8055** and **torin2** are inhibitors of TOR signaling. Symptoms caused by PSTVd were reverted by the inhibition of TOR in plants treated with TOR inhibitors (weekly treatments with 1 µM).

### CONCLUSIONS 4

- Ethephon-treated plants and CEVd-infected plants show ethylene-related phenotypes.
- Ethephon treatments and CEVd infection activate the expression of both *PR1* and *NAC082*, thus indicating that **ethylene is involved in ribosomal stress**.
- Treatments with the ethylene signaling blocker 1-MCP revert the phenotype caused by CEVd infection, indicating that **ethylene signaling is necessary for symptom development in CEVd infections**.
- Both TOR inhibitor treatments revert the phenotype caused by PSTVd, suggesting the involvement of the **TOR signaling pathway in the development of viroid pathogenesis**.