

Trabajo Fin de Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas presentado por:

Rubén González Miguélez



Evaluación del potencial de *Caenorhabditis elegans* como huésped experimental de arbovirus.



Directores científicos:

Dra. Silvia Ambrós (Evolutionary Systems Virology Group. IBMCP, CSIC-UPV)

Prof. Daniel Ramón (Biopolis S.L.)

Prof. Santiago Elena (Evolutionary Systems Virology Group. IBMCP, CSIC-UPV)

Tutor UPV:

Dra. M^a Purificación Lisón.



Enero 2017

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haber sido realizado sin las tres cepas de *C. elegans* usadas a lo largo de la investigación. Agradezco a Silvia Llopis el haberlas solicitado y a los siguientes investigadores el haberlas facilitado:

Cepa N2: obtenida del Caenorhabditis Genetics Centre de la University of Minnesota (USA).

Cepa JU 1580: obtenida de Kruglyak, L. de la University of California (USA).

Cepa RB 2519: esta cepa fue creada por el *C. elegans* Gene Knockout Project del Oklahoma Medical Research Foundation que es parte del International *C. elegans* Gene Knockout Consortium. Los gusanos usados en este trabajo fueron proporcionados por Barstead, R. del Oklahoma Medical Research Foundation (USA).

Agradezco al Dr. Daròs, del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de Valencia, el proporcionarnos los plásmidos del fragmento S del aislado SPAIN-1 del Tomato spotted wilt virus.

Si el material más importante es el humano entonces no puedo evitar citar a todos mis compañeros, tanto del IBMCP (Anamarija, Fernando, Héctor, José Luis, Paqui, Paula Rebeca, Ruben y Susana) como de Biopolis (a todos en general y a Ángels, Nuria, Silvia, Roberto y Patricia en particular). Gracias por el gran ambiente en el que he trabajado.

Voy a continuar los agradecimientos con Daniel Ramón, que confió en mí y me dio la oportunidad de conocer y trabajar con un grupo increíble de personas. En los dos laboratorios en los que se ha desarrollado este trabajo me he sentido tremendamente formado, valorado e integrado. Si el objetivo de un TFM es la de formar creo encontré a las mejores personas para mi formación científica y humana.

Termino agradeciendo a Santiago y a Silvia toda su paciencia y dedicación más allá de lo estipulado. Gracias por impulsarme en la dirección de lo que debe ser un buen científico.

A mis padres.

"Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas." Santiago Ramón y Cajal

"This page [is] intentionally left blank."

ÍNDICE

	<u>Página(s)</u>
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
ABREVIATURAS	3
1.INTRODUCCIÓN	4-18
1.1 Un mundo microscópico: los virus	4-8
1.1.1 Generalidades	4-6
1.1.2 Virus de plantas	6-8
1.1.3 Silenciamiento génico mediado por RNA	8
1.2 La enfermedad del bronceado del tomate y su agente causal: <i>Tomato spotted wilt virus</i>	8-13
1.2.1 Sintomatología y rango de huéspedes del TSWV	9-10
1.2.2 Organización genómica del género Tospovirus: el TSWV como miembro tipo	11-12
1.2.3 Modo de transmisión de los Tospovirus	12-13
1.3 Los organismos modelo	13-17
1.3.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> : un modelo experimental único	14-17
1.4 <i>C. elegans</i> y virus	17-18
2.OBJETIVOS	19
3.MATERIAL Y MÉTODOS	20-28
3.1 Tampones principales empleados en el trabajo	20
3.2 Obtención de un stock viral adecuado	20-21
3.2.2 Método de obtención del tipo de inóculo viral	20-21
3.3 Extracciones de RNAt y cuantificación de TSWV	21-25
3.3.1 Extracción de RNA total (RNAt) a partir de tejido vegetal	21
3.3.2 Extracción de RNAt de <i>C. elegans</i>	22-24
3.3.3 Cuantificación viral mediante RT-qPCR	24-25

3.4 Manipulación de <i>C. elegans</i> en el laboratorio	25-26
3.4.1 Cepas utilizadas	25
3.4.2 Cultivo de los gusanos	25
3.4.3 Sincronización de los gusanos	25-26
3.5 Ensayos de inoculación de TSWV en <i>C. elegans</i>	26-29
3.5.1 Esperanza de vida y supervivencia	28
3.5.2 Evaluación molecular de la posible replicación de TSWV en <i>C. elegans</i>	28-29
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30-56
4.1 Obtención de un stock viral adecuado: selección de huésped y optimización de los bioensayos de TSWV en planta	30-34
4.2 Desarrollo de un protocolo de qRT-PCR para la cuantificación de TSWV	34-41
4.2.1 Diseño de la qRT-PCR	34-37
4.2.2 Cuantificación de TSWV por qRT-PCR	38-41
4.3 Manipulación de <i>C. elegans</i> en el	41-43
4.4 Ensayos de inoculación de TSWV en <i>C. elegans</i>	43-50
4.4.1 Selección de cepa	43-46
4.4.2 Evaluación cepa seleccionada	46-50
4.4.2.1 Evaluación de la esperanza de vida de la cepa <i>C. elegans</i> RB2519 inoculada con TSWV	46-49
4.4.2.2 Evaluación de supervivencia tras 24 horas	49-50
4.5 Evaluación molecular de la posible replicación de TSWV en <i>C. elegans</i>	50-57
4.5.1 Optimización de las extracciones de RNAt a partir de <i>C. elegans</i>	50-51
4.5.2 Cuantificación de TSWV en <i>C. elegans</i> : ¿replicación viral?	52-57
5. CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59-62
ANEXO	61-63

ABSTRACT

So far, *Caenorhabditis elegans* has been used as model organism in many different fields of study, but seldom used as experimental host in virology studies. The present work seeks to evaluate the potential of the nematode to support the replication of the thrip-transmitted plant ambisense ssRNA virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; genus *Tospovirus*, family *Bunyaviridae*). The choice of this phytopathogenic virus is due to its ability to persistently replicate inside its thrips vector. In order to test TSWV infectivity, several strains of *C. elegans* were inoculated with plant extracts infected with the strain PVR of the virus. Along with the wild type nematode strain N2, which is commonly used in the laboratory, the JU1580 and RB2519 strains were also evaluated. These two strains are deficient in the RNA interference (RNAi) machinery, which plays an essential role in the antiviral response of the worm. A reduction in lifespan and an increase in mortality were observed in worms treated with virus-containing plant extracts in comparison with worms treated with extracts from healthy plants, suggesting that TSWV might replicate inside the nematode with a concomitant virulence. This effect is stronger in RNAi-deficient strains JU1580 and RB2519 than in wild type N2. To confirm this point, a qRT-PCR protocol is being optimized and applied. The capacity of TSWV successfully infecting *C. elegans* opens a wide range of possibilities for the study of host-virus interactions: (i) from the evolution of host-range in RNA viruses, to (ii) the establishment of the molecular mechanisms driving this novel host-virus interaction and to (iii) the interplay between viral infection and cell differentiation and organismal development, among many others.

Key words: Arbovirus; *Caenorhabditis elegans*; Phytopathogen; Host range; *Tomato spotted wilt virus*.

RESUMEN

Hasta el momento, *Caenorhabditis elegans* se ha utilizado como organismo modelo en diferentes campos de estudio, pero rara vez se utiliza como huésped experimental en los estudios de virología. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial del nematodo para replicar un virus de planta de ssRNA ambisentido transmitido por trips: *Tomato spotted wilt virus* (TWSV, género *Tospovirus*, familia *Bunyaviridae*). La elección de este virus fitopatógeno se debe a su capacidad para replicarse persistentemente dentro de su vector trips. Para probar la infectividad de TSWV, se inocularon varias cepas de *C. elegans* con extractos de plantas infectadas con la cepa PVR del virus. Junto con la cepa salvaje N2 del nematodo, que se utiliza comúnmente en el laboratorio, se evaluaron también las cepas JU1580 y RB2519. Estas dos cepas son deficientes en la maquinaria de interferencia de RNA (RNAi), que juega un papel esencial en la respuesta antiviral del gusano. Se observó una reducción de la esperanza de vida y un aumento de la mortalidad en gusanos tratados con extractos vegetales que contenían virus en comparación con gusanos tratados con extractos de plantas sanas, lo que sugiere que TSWV podría replicarse dentro del nematodo con una virulencia concomitante. Este efecto es más fuerte en las cepas deficientes en el sistema de RNAi (JU1580 y RB2519) que en la N2 de tipo salvaje. Para confirmar este punto, se optimizó y aplicó un protocolo de qRT-PCR. La capacidad de TSWV de infectar con éxito *C. elegans* abre una amplia gama de posibilidades para el estudio de las interacciones huésped-virus como: (i) la evolución de la gama de huéspedes en los virus de RNA, (ii) el establecimiento de los mecanismos moleculares que permiten esta nueva interacción huésped-virus y (iii) la interacción entre mecanismos de la infección viral, la diferenciación celular y el desarrollo de organismos, entre muchos otros.

Palabras clave: Arbovirus; *Caenorhabditis elegans*; Fitopatógeno; Gama de huéspedes; *Tomato spotted wilt virus*

ABREVIATURA

DNA: ácido desoxiribonucleico

dpi: días post-inoculación

dsRNA: RNA de doble cadena

miRNA: microRNA

mRNA: RNA mensajero

NGM: medio de crecimiento de nematodos (*nematode growth medium*)

nt: nucleótido

pb: par de bases

PGTS: mecanismo de silenciamiento a nivel post transcripcional.

RdRp: RNA polimerasa RNA-dependiente

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RNA_t: RNA total

RT: temperatura ambiente.

siRNA: RNA de interferencia corto

sRNA: RNA ribosómico

ssRNA: RNA de cadena sencilla

TGS: mecanismo de silenciamiento a nivel transcripcional.

TWSV: *Tomato spotted wilt virus*

v: sentido complementario del virión

vc: sentido del virión

1.1. Un mundo microscópico: los virus

Los virus son agentes infecciosos que constan de un ácido nucleico (DNA o RNA) monopartito o fragmentado, circular o lineal, de cadena sencilla (ss) o doble (ds), y que se encuentra rodeado por una cubierta formada por una o varias proteínas. Son entidades con replicación autónoma, capaces de transmitir su genoma de una célula a otra parasitando la maquinaria enzimática del hospedador para su multiplicación intracelular y transmisión entre células huéspedes.

Fueron descubiertos a finales del siglo XIX, pero no se reconocieron como agentes infecciosos hasta mediados del siglo XX. En 1892, D. Ivanowski descubrió, investigando la enfermedad del mosaico del tabaco (reproducida experimentalmente seis años antes por Mayer), que el agente causal de ésta podía pasar a través de un filtro que retenía las bacterias. Gracias a este experimento, la comunidad científica descubre que se enfrenta a un agente desconocido al que M. W. Beijerinck denomina en 1989 *microorganism contagium vivum fluidum*, expresión de la que deriva el término actual de virus. No sería hasta 1956 cuando A. Gierer y G. Schramm demostraron por primera vez que el RNA desnudo era el agente infeccioso de la enfermedad (Fields et al. 2001).

Desde su descubrimiento, los virus han sido y son de vital importancia para el desarrollo de disciplinas científicas como la Biología Molecular, la Biomedicina o la Genética, así como de nuevas tecnologías aplicadas en las mismas: gracias a los virus A. Hershey y M. Chase discernieron que el DNA era el responsable de la transmisión de la información genética. A los virus también les debemos la reformulación, en su momento, del dogma central de la Biología Molecular como consecuencia del descubrimiento por H. Temin y D. Baltimore de la transcriptasa reversa. Otro ejemplo en el que los virus propiciaron avances, es el desarrollo inicial de la ingeniería genética, ya que los virus aportan como organismos modelo unos genomas pequeños y mucho más sencillos de manipular en el laboratorio que el de, por ejemplo, las bacterias.

1.1.1 Generalidades

Aunque los virus son generalmente conocidos por su patogenicidad, es decir por su capacidad de inducir enfermedades en los huéspedes que infectan, la mayoría de ellos coexisten de manera inofensiva con su huésped sin causar ninguna enfermedad, son asintomáticos o causan infecciones latentes. De hecho, los virus infectan todo tipo de organismos, desde plantas a animales, bacterias, arqueas y a otros virus (virófagos). De ahí la importancia de los virus como motor evolutivo entre especies, ya que actúan como

medio importante en la transferencia horizontal de genes, lo cual incrementa la diversidad genética e impulsa la evolución tanto de los huéspedes virales como del viroma (Suttle 2007).

Además, los virus son los organismos más abundantes y diversos del planeta. Según el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) existen 3704 especies distintas de virus en la actualidad, un número que no ha dejado de aumentar con el tiempo (Tabla. 1).

Tabla 1. Diversidad vírica según el ICTV en el 2005 y en el 2015.						
Año	Informe	Órdenes	Familias	Subfamilias	Géneros	Especies
<u>2015</u>	EC 47, London, UK, July 2015	7	111	27	609	3704
<u>2005</u>	ICTV 8th Report (MSL #23)	3	73	11	289	1899

Pero al hablar de virus, debemos de hablar de quasiespecies: poblaciones de variantes de secuencia distintas del virus que difieren en una o pocas posiciones nucleotídicas y que están estrechamente relacionadas genéticamente. De esta forma, no existe un genoma definido de modo preciso sino un genoma consenso que sería el promedio de variantes de la población viral (Domingo 2002). Esta población, se vería sometida a los principales factores de evolución como la mutación, selección natural, deriva genética, recombinación o flujo genético. Por otra parte, la alta capacidad de los virus para adaptarse a nuevos ambientes y evolucionar rápidamente radica en la elevada variabilidad genética de sus poblaciones.

De hecho, una característica común de los virus es su alta tasa de mutación: se ha estimado una tasa de error de entre 10^{-6} y 10^{-4} errores por nucleótido para los virus de RNA, siendo ésta mayor que para los virus de DNA (entre 10^{-8} y 10^{-6} errores por nucleótido) (Sanjuán et al. 2010). Esta alta tasa de mutación multiplica su efecto en genomas tan compactos como los que suelen presentar los virus: sus pequeños genomas con diversos marcos abiertos de lectura y genes multifuncionales son extremadamente sensibles a mutaciones deletéreas.

Por otra parte, los virus muestran una gran diversidad en tamaño y forma, siendo frecuente la utilización del sistema de Baltimore para clasificarlos (Fig. 1). Este sistema clasifica los virus según la estructura y composición del genoma viral, reflejando su forma de replicación y empaquetado. Así, la clasificación se basa en que cada genoma viral tiene que crear un mRNA para que pueda ser traducido por los ribosomas del hospedador.

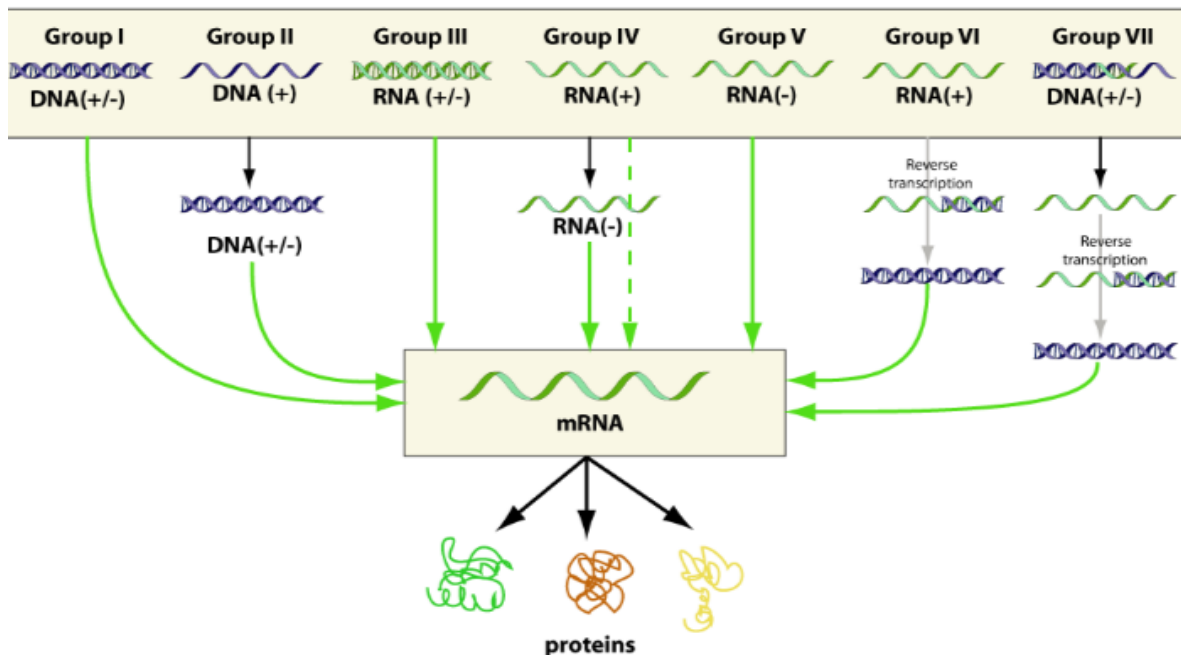


Fig. 1. Sistema de Baltimore para la clasificación de los virus (<http://viralzone.expasy.org/>)

1.1.2 Virus de plantas

Entre los virus conocidos hasta el momento, existen más de 2000 especies de virus que infectan plantas englobados en 21 familias y 8 géneros. Algunas de estas especies virales causan daños y cuantiosas pérdidas económicas anualmente en cultivos muy importantes para la humanidad (Hull, 2011). Por ello, el estudio de los virus de plantas es de gran relevancia económica, social y científica, permitiendo su estudio el avance de la ciencia en diversos campos (Tabla 2).

Tabla 2. Principales descubrimientos empleando la virología de plantas que han sido pioneros en ciencia (Fields et al. 2001).

Descubrimiento	Virus	Año
Virus es un agente filtrable	TMV	1892
Virus es un agente filtrable nuevo y no es una bacteria	TMV	1898
Estructura química de los virus: proteína cristalina	TMV	1935
Virus es una proteína con pequeñas cantidades de carbohidratos y fosforo.	TMV	1936
Microscopía electrónica de partículas virales	TMV	1939
Cristalografía de rayos X de partículas virales	TMV, TBSV	1941

Autoensamblaje de un virión	TMV	1955
RNA viral desnudo puede ser infeccioso	TMV	1956
RNA subviral circular e infeccioso (viroide)	PSTVd	1971
Secuenciación completa del genoma de un patógeno de eucariota	PSTVd	1978
Estructura de resolución atómica de un virus icosaédrico	TBSV	1978
Transcritos infecciosos de un genoma clonado de un RNA virus	BMV	1984
Mecanismos de síntesis de mRNA subgenómico por una cadena positiva de RNA virus	BMV	1985
Ingeniería genética de resistencia a un patógeno	TMV	1986
Ribozimas con dianas en gen	STobRV	1988
Resistencia a virus mediante RNAi trasngénico	TEV	1993
Deriva ribosómica	CaMV	1993
Resistencia natural a virus mediada por RNA	TBRV	1997
Supresión viral del sistema de resistencia RNAi	TEV	1998
Pequeños RNAs intervienen en el RNAi	PVX	1999
Estructura de resolución atómica de un supresor del silenciamiento	TBSV	2003
<i>TMV: Tobacco mosaic virus / TBSV: Tomato bushy stunt virus / PSTVd: Potato spindle tuber viroid / BMV: Brome mosaic virus / STobRV: Satellite tobacco ringspot virus / TEV: Tobacco etch virus / CaMV: Cauliflower mosaic virus / TBRV: Tomato black ring virus / PVX: Potato virus X</i>		

La mayoría de los virus de plantas necesitan un vector para ser transmitidos de un organismo vegetal a otro. Normalmente este vector es un insecto, pero se ha demostrado que diversos organismos como hongos y nematodos también actúan como vectores. Actualmente, sabemos que especies de los géneros *Nepovirus* y *Tobravirus* utilizan nematodos como vectores (Lamberti y Roca 1987). El nematodo puede adquirir un virus de este tipo, dependiendo de su forma de alimentarse, en periodos de unas pocas horas o de varios días. Una vez adquirido el virus (aunque éste no se replique en su interior) puede ser retenido en el nematodo hasta un año, tiempo durante el cual puede transmitirlo (transmisión persistente no propagativa).

1.1.3 Silenciamiento génico mediado por RNA

Como respuesta frente a patógenos, y en concreto frente a la infección viral, las plantas inducen mecanismos de defensa elaborados y eficientes. Uno de los mecanismos moleculares se basa en el silenciamiento génico mediado por RNA. Este proceso está mediado por RNA de interferencia (RNAi) que se complementa con un RNA transcrito promoviendo la degradación de éste y reduciendo sus niveles de traducción. Los RNAi son moléculas de dos tipos distintos: RNA de interferencia corto (siRNA) y microRNA (miRNA), que son RNAs altamente estructurados con porciones de doble cadena. Estas dos moléculas se generan a partir de monómeros de RNA de doble cadena (dsRNA) derivados de transcritos endógenos (miRNAs) o exógenos (siRNAs) (Krulko et al. 2009), que son fragmentados por enzimas tipo DICER (una ribonucleasa perteneciente a la familia de las RNAasas de tipo III) en fragmentos pequeños, entre 17-25 nucleótidos (Ricaño et al. 2014).

Este mecanismo de defensa puede actuar a nivel transcripcional (TGS) o post transcripcional (PGTS) (Martínez de Alba et al. 2013).

El TGS se da en el núcleo de la célula y provoca el silenciamiento de genes por la metilación (adición de un grupo $-CH_3$) de dichos genes. Este proceso de metilación promovido por el RNAi altera la eucromatina convirtiéndola en heterocromatina. De esta forma se impide el acceso de la maquinaria transcripcional, lo que conlleva a la no expresión de los genes.

En el PGTS la molécula efectora es el multicomplejo RISC, formado por un complejo enzimático con actividad nucleasa y el siRNA, que funciona como determinante específico. El núcleo de RISC está formado por proteínas pertenecientes a la familia argonauta (AGO). RISC se encarga de la degradación del RNA a través de su actividad helicasa: separa las dos hebras del siRNA, permaneciendo sólo una de ellas unida al complejo. Estando activado el complejo RISC el objetivo de la degradación son los RNA mensajeros homólogos a dichos siRNAs. Este proceso post transcripcional cuenta con una etapa de amplificación en plantas gracias a la intervención de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que se encarga de producir copias del RNA que originó el silenciamiento o directamente de replicar los siRNA producidos como respuesta. Este siRNA es además la molécula sospechosa de llevar la señal de silenciamiento desde el punto donde se originó el silenciamiento hasta otros tejidos, provocando el desencadenamiento del silenciamiento en tejidos lejanos a su origen.

1.2 La enfermedad del bronceado del tomate y su agente causal: *Tomato spotted wilt virus*

La enfermedad del bronceado del tomate fue descrita por primera vez en 1919 en cultivos de tomate en Australia (Brittlebank 1919). Sería en el año 1930 cuando el equipo de G. Samuel determina que el agente etiológico de esta enfermedad es un virus, al que se denominó *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Samuel et al. 1930).

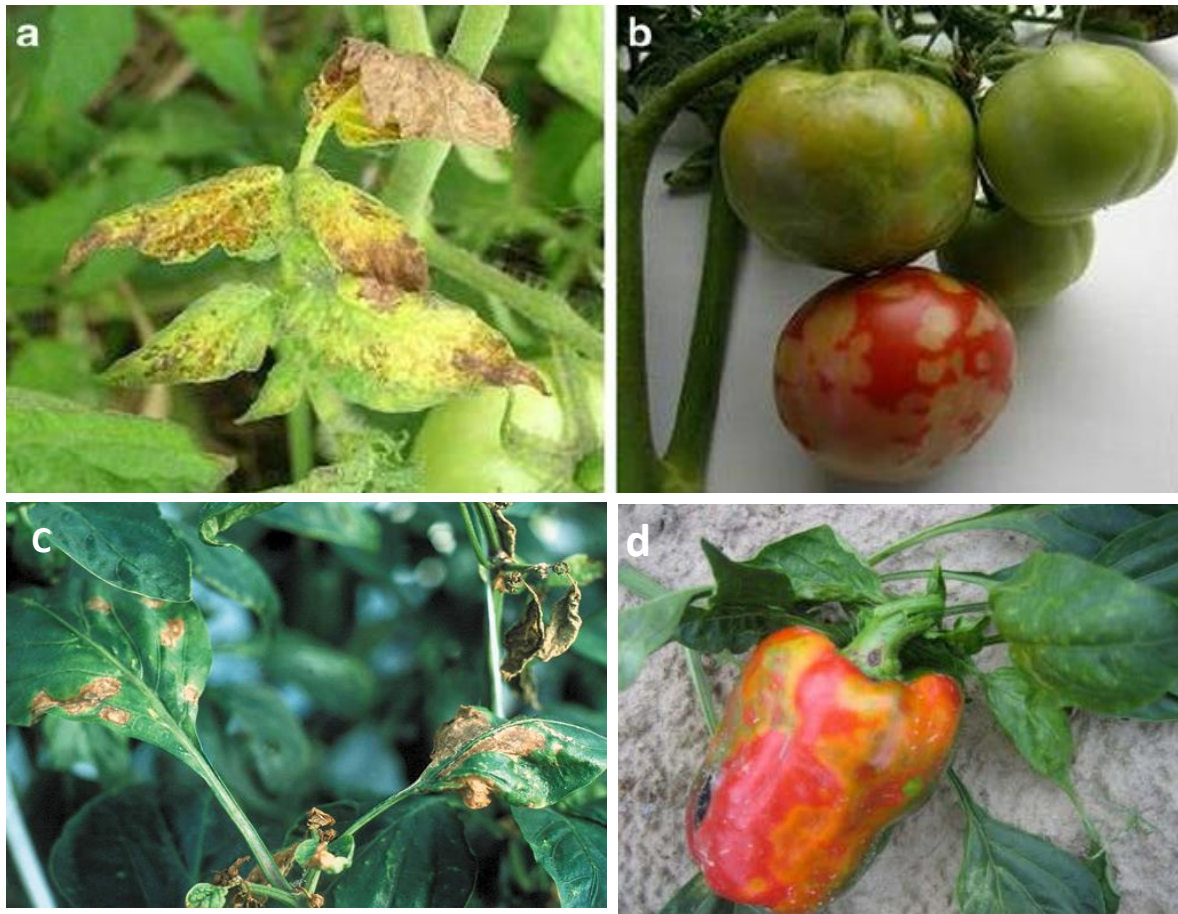


Fig. 5 Síntomas de TSWV en la hoja (a) y el fruto (b) de tomate y en la hoja (c) y fruto de pimiento.

Este virus es responsable de elevadas pérdidas anuales en las cosechas al causar graves daños en los cultivos, teniendo huéspedes de elevada importancia agronómica: TSWV es uno de los diez virus de plantas más destructivos, provocando a nivel mundial pérdidas de mil millones de dólares cada año (Adkins 2000). Además, es un virus con gran capacidad de adaptación a nuevos huéspedes y que causa virosis emergentes al generar nuevos aislados capaces de superar las resistencias utilizadas en los cultivos comerciales (Aramburu et al. 2003; López et al. 2011).

Además de su importancia en la agricultura, TSWV es el modelo principal de los tospovirus. El género *Tospovirus* pertenece a la familia *Bunyaviridae*, que posee un amplio rango de huéspedes: infecta más de 550 especies de plantas superiores, tanto mono como dicotiledóneas, que representan más de 60 familias botánicas (Sether 1992). De entre ellas, más de 100 especies que pertenecen a familias de importancia agronómica como las *Solanaceae*, *Compositae* y *Leguminosae* (Peters 1998), se ven ampliamente afectadas por infecciones de tospovirus.

1.2.2 Organización genómica del género *Tospovirus*: el TSWV como miembro tipo

Entre los virus de plantas, los tospovirus, parecen tener una organización genómica única (Fig. 6). Su genoma es tripartito y está constituido por tres fragmentos de RNA de cadena sencilla: el fragmento S (small = pequeño) de 2916 nt, el fragmento M (medium = mediano) de 5200 nt y el fragmento L (large = grande) de 8897 nt. Los RNA virales son encapsidados por la proteína de la nucleocápside (N) para formar los complejos de ribonucleoproteína (RNP). Las RNP se asocian con la RdRp, y son empaquetadas en la envoltura lipídica. Las dos glicoproteínas, Gn y Gc, cubren la superficie del virión y atraviesan la membrana. Las glicoproteínas atraviesan la bicapa lipídica y se ha demostrado que las colas citoplasmáticas interactúan con la proteína N (Rotenberg et al. 2015).

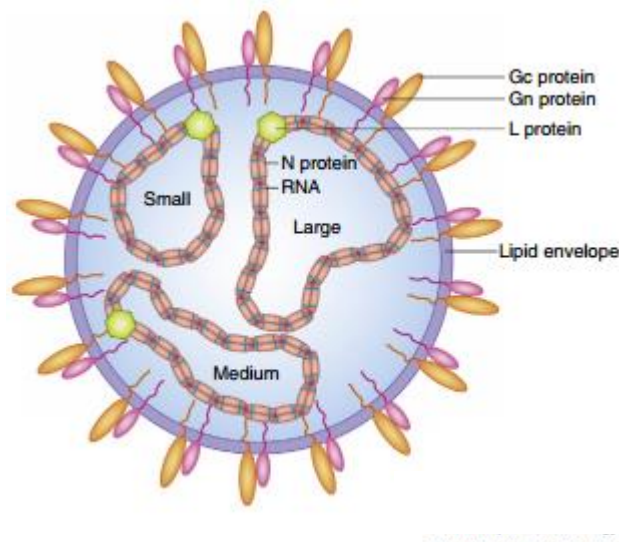


Fig. 6. Representación esquemática de un virión de tospovirus (Rotenberg et al. 2015).

En el TSWV el segmento L tiene polaridad negativa mientras que el M y el S codifican en los dos sentidos. La función genómica (Fig. 7) es la siguiente: la RdRp está codificada en el segmento L en el sentido complementario del virión (**vc**, negativo), la proteína de movimiento célula a célula (NSm) y los precursores de las glicoproteínas G1-G2 se codifican en el segmento M, en el sentido del virión (**v**) la primera y en el sentido **vc** las segundas, mientras que el segmento S codifica en el sentido **v** la proteína NSs (implicada en la supresión del silenciamiento génico de RNA) y en el sentido **vc** la proteína N (proteína estructural de cubierta que encapsida el RNA viral) (Aramburu et al. 2007).

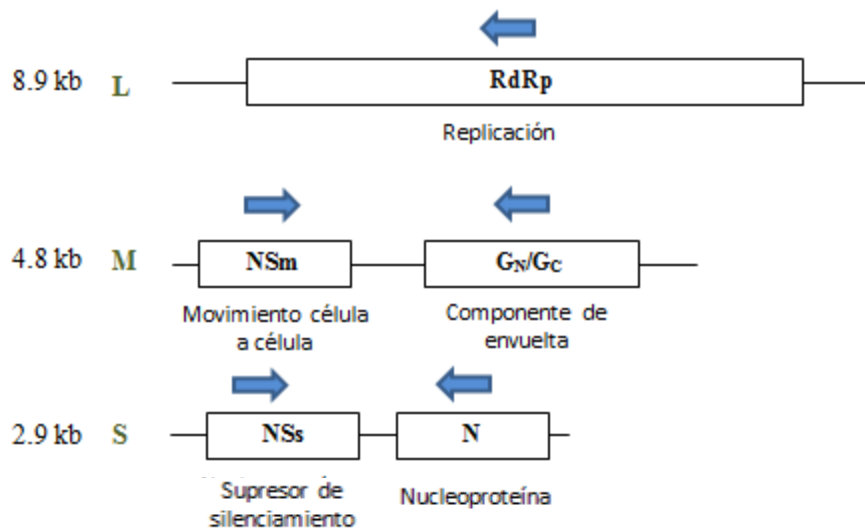


Fig. 7. Organización genómica de TSWV con la función anotada de cada gen.

1.2.3 Modo de transmisión de los tospovirus

Aunque los tospovirus pueden transmitirse mecánicamente en el laboratorio, en la naturaleza sólo se transmiten de planta a planta a través de diversas especies de trips (del orden Thysanoptera, del suborden Terebrantia y dentro de ese suborden, de la familia *Thripidae*).

TSWV es transmitido por varias especies de trips pero su vector principal es *Frankliniella occidentalis* (Orden: Thysanoptera, Familia: *Thripidae*). Este trip disemina el virus y resulta de interés porque se ha demostrado que es de los pocos virus capaces de replicarse en el vector (transmisión persistente circulativa o propagativa), siendo además el modelo del patosistema tospovirus-trips (Rotenberg et al. 2015). La transmisión de tospovirus por trips tiene varias características inusuales. Sólo las primeras y segundas fases larvarias pueden adquirir el virus (Fig. 8) y la competencia para adquirirlo disminuye con la edad de las larvas. TSWV puede ser adquirido o transmitido por ninfas de *F. occidentalis* en periodos de alimentación (adquisición) de tan sólo 5 minutos. Aunque los trips puedan retener la infectividad de por vida su capacidad de transmitir el virus puede ser errática. Una vez adquirido, el periodo de latencia del virus varía con la temperatura, durando entre 84 horas a 27 °C o prolongarse hasta 171 horas a 20°C (Hull 2011).

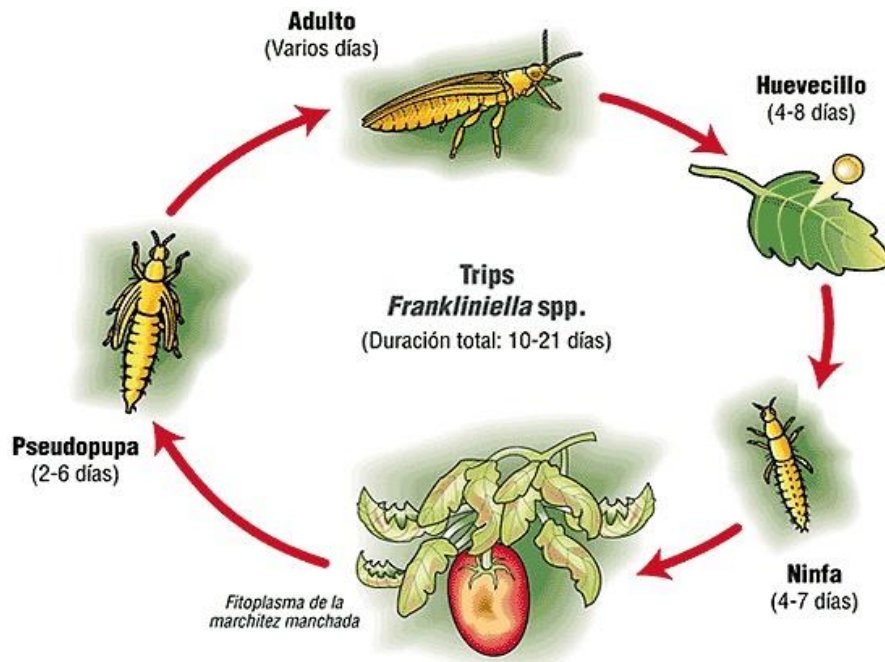


Fig. 8. *F. occidentalis* y su ciclo biológico.

1.3 Los organismos modelo

Se considera que un organismo modelo es aquella especie fácil de mantener, manipular y reproducir en un entorno controlado en un centro de investigación, teniendo ciertas ventajas experimentales que la conviertan en una especie que puede ser ampliamente estudiada.

Los organismos modelo son una potente herramienta experimental para investigar y comprender una gran diversidad de procesos biológicos, además de ser necesarios para investigar las causas, diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades. Así, esta clase de especie modelo nos permite obtener información que poder extrapolar a otras especies relacionadas con las que resulta más difícil o imposible experimentar.

Ya a finales del siglo XIX, con los primeros trabajos sobre la selección natural y la herencia genética, comenzó a hacerse necesaria la búsqueda de estándares para comparar organismos. Estos estándares fueron introduciéndose a lo largo del siglo XX cuando los primeros organismos modelo comenzaron a usarse en los laboratorios. A principios del siglo XX, *Drosophila melanogaster* entró en los laboratorios y abrió las puertas a otras especies modelo como el virus del mosaico del tabaco (TMV), *Escherichia coli*, etc. (Muller y Grossniklaus 2010). En la actualidad, la cantidad de organismos modelo disponibles es mayor y más diversa (Fig. 9).

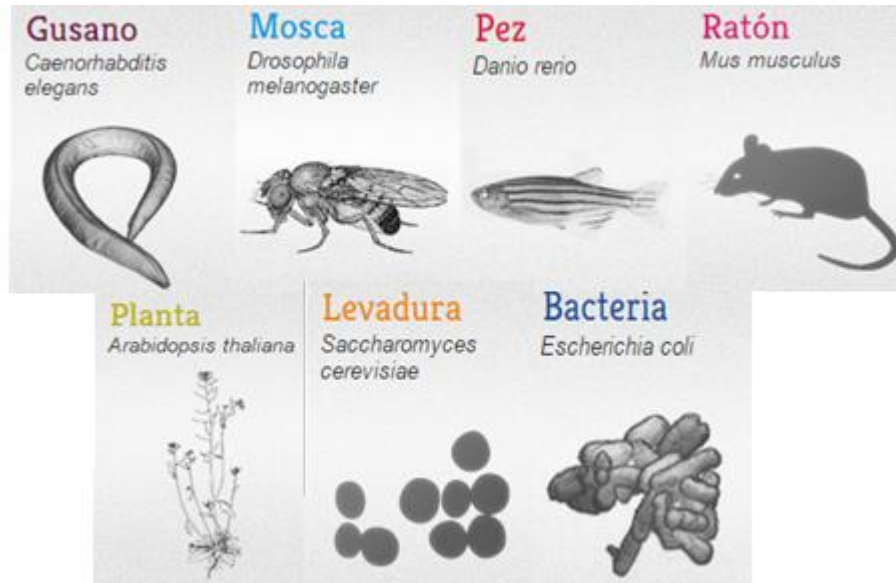


Fig. 9. Principales organismos modelo utilizados en la actualidad.

En la actualidad, el número de recursos disponibles para este tipo de organismos se ha multiplicado recientemente gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y en la bioinformática, disponiendo ya de amplia y diversa información sobre estos organismos en la propia web (Tang et al. 2015).

En este sentido, la mayor base de datos disponible para el nematodo *Caenorhabditis elegans* es WormBase (www.wormbase.org), que contiene información que va desde la secuencia y el fenotipo de los alelos individuales, hasta los estudios del genoma obtenidos mediante tecnologías de secuenciación de próxima generación. Además de una gran cantidad de información sobre su biología, se pueden encontrar también numerosas herramientas y protocolos para la experimentación con el gusano (Harris et al. 2013).

1.3.1 *C. elegans*: un modelo experimental único

C. elegans es un nematodo de la familia *Rhabditidae* que en la naturaleza coloniza hábitats ricos en microorganismos de los que se alimenta, siendo su principal fuente de alimento las bacterias (Félix y Braendle 2010). Este nematodo presenta dimorfismo sexual. La mayor parte de la población es hermafrodita (XX) lo que resulta útil para mantener la línea homocigota, mientras que el 0,2% son machos (X0) que favorecen la variabilidad genética.

Tras los trabajos iniciales de E. Maupas a principios del siglo XX sobre la reproducción y desarrollo de *C. elegans*, y de V. Nigo a mediados de siglo, los experimentos llevados a cabo

por S. Brenner y sus colaboradores en las décadas de 1960 y 1970, consiguieron elevar a este organismo al estatus de organismo modelo (Frézal y Félix 2015). Brenner, fundador de las investigaciones modernas en *C. elegans*, probó también a experimentar con diversos protistas y animales, llegando incluso a trabajar con otra especie de nematodo, *Caenorhabditis briggsae*, aunque ésta era más difícil de cultivar. La importancia de estas investigaciones se vio reconocida con la concesión en 2002 del premio Nobel de Medicina y Fisiología para S. Brenner, J. E. Sulston y R. Horvitz, por sus trabajos sobre la muerte celular programada y el establecimiento de *C. elegans* como modelo animal para el estudio de éste y otros procesos relevantes y fundamentales del desarrollo (nobelprize.org).

El uso de *C. elegans* en el laboratorio se ha extendido debido a que las investigaciones científicas se ven facilitadas por sus inusuales características: reducido tamaño (apenas 1 mm), transparencia, corto tiempo de generación y fácil cultivo. Por ejemplo, la transparencia permite el uso de muchas herramientas biotecnológicas basadas en fluorescencia con la observación directa de los gusanos. Otra gran ventaja es que posee un corto ciclo de vida de 21 días (Fig. 10), lo que permite obtener resultados en un periodo de tiempo menor que con otros organismos (de 2 a 5 años en ratones, por ejemplo). Trabajar con este organismo implica también una mayor robustez estadística en los ensayos, al poder emplear grandes cantidades de individuos sin requerir un gran espacio o instalaciones especiales.

Los recursos genéticos en esta especie son asombrosos: se dispone de un genoma secuenciado en su totalidad que comparte una homología de casi un 70% con el humano y la colección de mutantes disponibles es inmensa y fácil de obtener. Esto supone un elevado valor añadido al uso de esta especie como modelo, por ejemplo, para el estudio de muchas enfermedades humanas difíciles de investigar: el 40% de los genes relacionados con enfermedades humanas se encuentran presentes en el nematodo.

Otra característica que facilita los estudios biológicos en el nematodo es el reducido número de células que lo conforman: 959 células somáticas formando órganos y sistemas simples (1031 en el caso de los machos, X0) que unido a la transparencia del gusano facilita los estudios de desarrollo. De entre estas células, 302 (381 en los machos) son neuronas que conforman un sistema nervioso primitivo que permite realizar también estudios de comportamiento. *C. elegans* tiene respuesta sensitiva al tacto, al sabor, olor y a la temperatura, además de otros comportamientos complejos: apareamiento, comportamiento social, aprendizaje y memoria (Rankin 2002). En este sentido, están siendo utilizados como modelo para estudios de patologías de la conducta humana o enfermedades de degeneración neuronal entre otras.

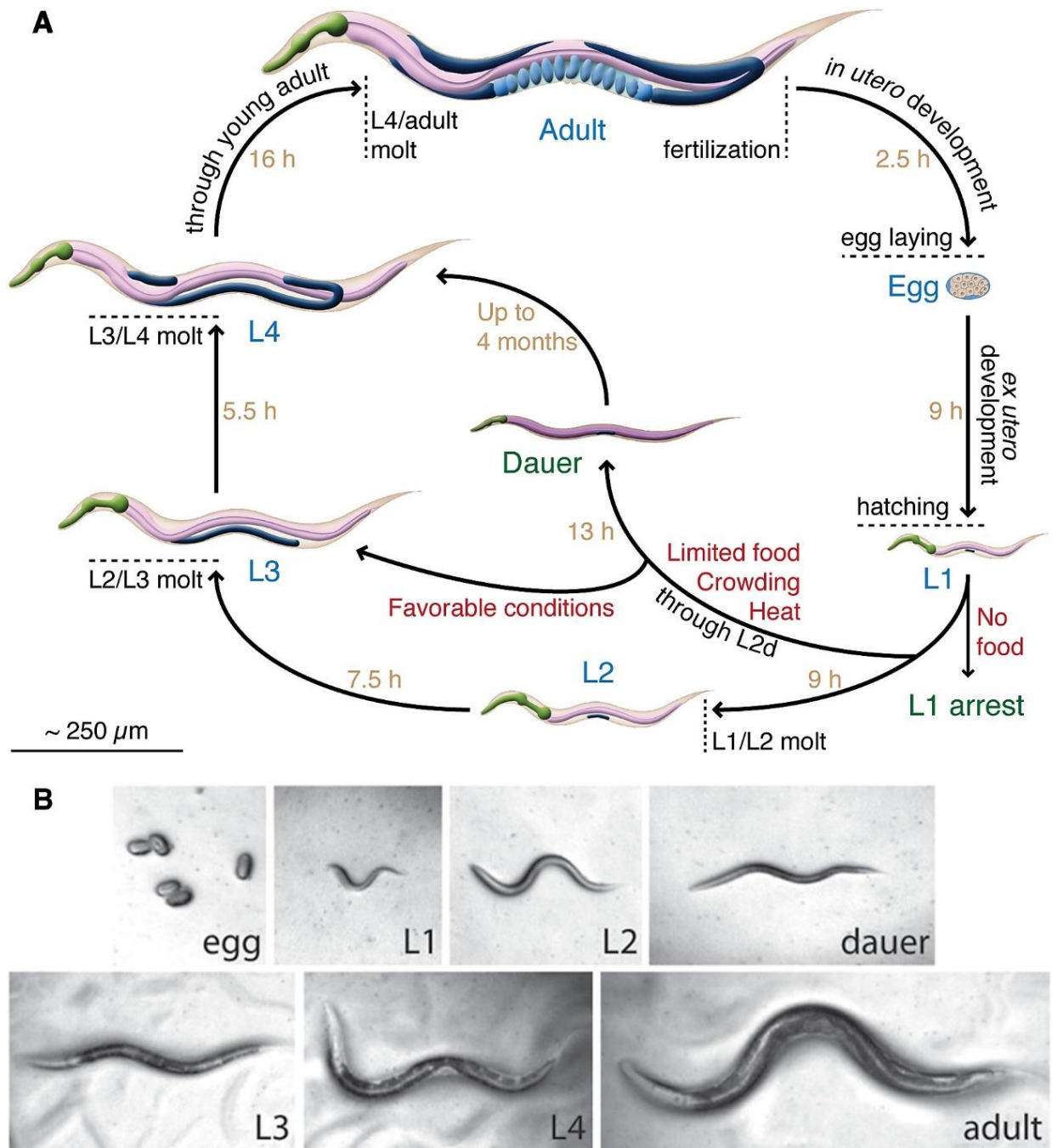


Fig. 10. A. Ciclo de vida de *C. elegans* a 25°C. El tiempo 0 se considera el momento de la fertilización. Los números amarillos en las flechas indican el tiempo que el gusano se encuentra en cada estadio. Modificado de Altun y Hall (2012). **B.** Micrografías de huevos, estadios larvales y adultos. Modificado de Fielenbach y Antebi (2008).

Cabe destacar que *C. elegans* no presenta problemas éticos en los proyectos pues legalmente no es considerado un animal (RDL 1201/2005, de 21 de octubre de 2005)

Todas estas ventajas permiten que *C. elegans* pueda ser empleado en diversos campos de investigación como el estudio de la obesidad (Martorell et al. 2016), la diabetes (Zhu et al. 2016), el envejecimiento (Luyten et al. 2016) o el Alzheimer (Kumar et al. 2015).

El nematodo ha sido propuesto desde hace años como organismo para el estudio de infecciones microbianas con el fin de conocer los mecanismos de infección y el desarrollo o búsqueda de tratamientos contra éstas (Strauss 2000). Sin embargo, no ha sido hasta los últimos años (Marsh y May 2012) cuando se ha observado que el nematodo también es susceptible a patógenos humanos (hongos y bacterias). Desde entonces, sus genes y mecanismos de defensa han sido identificados y caracterizados, compartiendo éstos una fuerte homología con los de otras especies, lo que sugiere un origen evolutivo común (Irazoqui et al. 2010).

1.4 *C. elegans* y virus

El principal sistema de defensa antiviral de *C. elegans* es el mediado por RNAi. Aunque este mecanismo del nematodo es similar al descrito en otros eucariotas, en el gusano también interviene en procesos fisiológicos además de en la defensa frente a patógenos (Ashe et al. 2013).

Este fuerte sistema de silenciamiento unido a las barreras físicas y a comportamientos de huida frente a moléculas microbianas, es responsable de que *C. elegans* difícilmente se infecte con virus de forma natural, por lo que los estudios realizados sobre posibles infecciones virales (Anexo 1) son muy escasos (Diogo y Bratanich 2014). La fortaleza del mecanismo de RNAi en el gusano es tal, que el primer virus cuya replicación se ha descrito en *C. elegans* en condiciones naturales ha sido el del virus de Orsay, descubierto en la cepa *C. elegans* JU1580, que curiosamente es deficiente en el sistema antiviral de RNAi. Este virus se descubrió tras analizar nematodos con anomalías en sus células intestinales. Siguiendo la misma estrategia en *C. briggsae*, una especie muy próxima filogenéticamente, se descubrió el virus de Santeuil en larvas de la cepa JU1264. Estos virus, aunque divergentes genéticamente, se parecen a los nodavirus (familia *Nodaviridae*), cuyo genoma de RNA de cadena sencilla es pequeño y bipartito. Las infecciones de estos virus causan alteraciones morfológicas en el intestino del gusano, y se ha observado que éstos sólo infectan las células intestinales (Fig. 11) (Felix et al. 2011). Recientemente se ha descrito la infección de un virus en larvas de la cepa JU1498 de *C. briggsae*, el virus de Le Blanc (Franz et al. 2012). De momento, no se han descrito otras infecciones naturales causadas por virus en *C. elegans*.

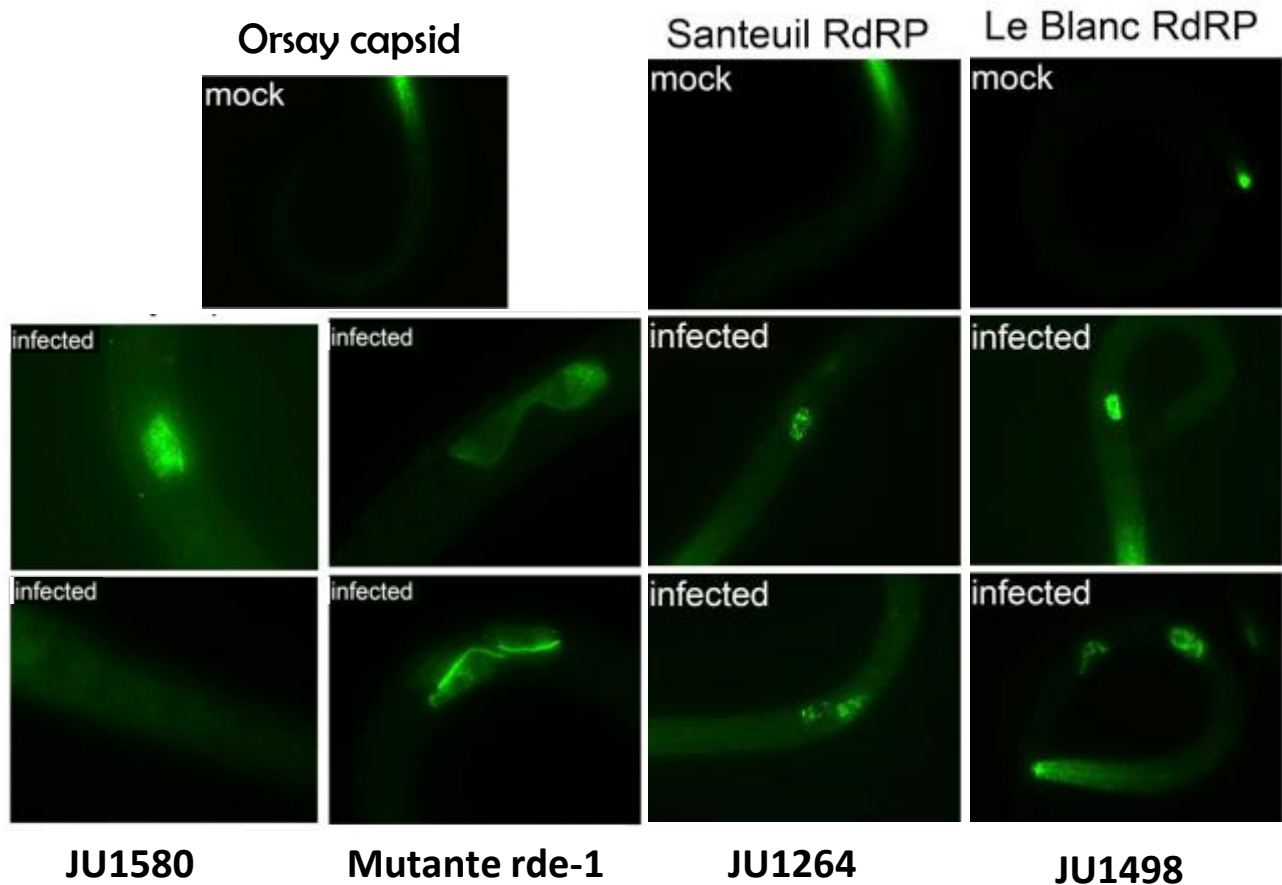


Fig. 11. Inmunofluorescencia de los virus capaces de infectar *C. elegans* y *C. briggsae*. Se emplearon anticuerpos anti-cápside para *C. elegans* y anticuerpos anti-RdRP para *C. briggsae*. La cepa de nematodo empleada en cada caso figura al pie de las imágenes. “Mock” es un control tratado de la misma manera excepto que sin el virus. (Modificado de Franz et al. 2014).

La función del RNAi en la defensa antiviral en plantas, hongos y animales llevó a proponer que las infecciones virales eran la principal fuerza conductora de la evolución de este mecanismo de defensa dado que: el silenciamiento obtenido es sistémico (permite a los siRNA antivirales moverse e impedir la expansión del virus) y heredable (la transmisión del silenciamiento a través de varias generaciones provoca una efectiva vacuna antiviral). Sin embargo, y de forma sorprendente, se ha visto cómo los genes requeridos en el silenciamiento sistémico y transgeneracional no tienen función en la defensa antiviral contra la infección del virus de Orsay (Ashe et al. 2015). Esta respuesta del RNAi es además no sistémica y no heredable.

De esta forma, los últimos resultados obtenidos sugieren que el mecanismo antiviral en *C. elegans* es distinto al mecanismo que opera en plantas, y que los genes implicados en él aún deben ser descubiertos. En trabajos recientes se han descrito genes nuevos y sin caracterizar que se expresan diferencialmente en los procesos de infección, y que parecen estar implicados en una nueva ruta de RNAi o en respuesta a estrés (Ngo et al. 2016).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la interacción entre virus de plantas, sus huéspedes vegetales y sus vectores artrópodos; en particular, para virus que incorporan una fase de replicación en el vector y que, desde un punto de vista ecológico, representan la gama de huéspedes más amplia descrita hasta la fecha: plantas y animales.

En concreto, en este trabajo se abordará la viabilidad de la interacción entre el arbovirus fitopatógeno TSWV y *C. elegans* como huésped experimental. Analizaremos el potencial de TSWV-*C. elegans* como patosistema modelo de estudio en interacciones virus-*C. elegans*, determinando:

- i) sí la infección viral es viable utilizando el nematodo como vector,
- ii) sí ésta afecta negativamente al nematodo
- iii) sí se detecta replicación viral en el mismo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Tampones principales empleados en el trabajo

M9: 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO_4 y H_2O hasta 1 litro. Esterilización por autoclave y filtración de alícuotas mediante poros de 0,22 μm antes de su uso inmediato.

RES B: 10 mM NaH_2PO_4 ajustado a pH 7,0 y 10 mM Na_2SO_3 . Autoclave de 40 minutos para RNA.

3.2 Obtención de un *stock* viral adecuado

Para seleccionar un huésped herbáceo y obtener el *stock* viral para todos los ensayos del trabajo, se inocularon al menos 3 lotes de 15 plantas de especies susceptibles a TSWV: pimiento (*Capsicum annuum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), *Nicotiana benthamiana* y quinoa (*Chenopodium quinoa*). Se inocularon 2 hojas por planta con una mezcla consistente en: 7 μl de un extracto vegetal crudo (*sap*) 1/10 (peso/volumen) en tampón RES B, procedente de plantas de *N. benthamiana* infectadas con TSWV, material cedido por el Dr. J. A. Daròs (IBMCP-CSIC/UPV, Valencia) y 7 μl de Carborundum al 10% en tampón RES B. La gota resultante se esparció con un dedo protegido con un guante de plástico. Al cabo de 7-14 días se observaron los síntomas característicos en la hoja inoculada y/o en las hojas superiores. Se recogió el material con síntomas y congeló inmediatamente en N_2 líquido manteniéndolo a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Alternativamente, en algunos bioensayos de *N. benthamiana* se varió el método de inoculación, y se inocularon dos hojas por planta con 7 μl de extracto crudo (*sap*) o semipurificado viral y 7 μl de carborundum al 10% (ambos 1/10 peso/volumen en RES B) utilizando un bastoncillo empapado en tampón.

3.2.1 Método de obtención del tipo de inóculo viral

Sap

De 3 a 10 g de tejido vegetal infectado con TSWV (denominado TSWV-*sap*) o procedente de planta sana (*sap*-sano) se congeló en N_2 líquido y se homogeneizó por agitación mecánica utilizando un molino de bolas (Retsch MM400) y 1 pulso de 20 s a una frecuencia de 30 s^{-1} . El polvo resultante se suspendió en tampón RES B a razón de 1/10 peso/volumen.

Semipurificado viral

Los inóculos de semipurificado viral se obtuvieron a partir de 0,25 g de tejido vegetal infectado con TSWV o de planta sana, previamente congelados en nitrógeno líquido. La homogeneización se realizó en molino de bolas como se ha indicado anteriormente. El protocolo de semipurificación de las partículas virales fue el siguiente:

1. Añadir 2 volúmenes de tampón de extracción RES B a un tubo con 0,25 g de tejido vegetal triturado y agitar vigorosamente en un vortex.
2. Transferir el contenido a un tubo Eppendorf y añadir medio volumen de una mezcla de cloroformo: butanol (1:1).
3. Agitar vigorosamente el tubo en un vortex durante 1 min.
4. Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 14000 rpm.
5. Mezclar suavemente con 1/5 de volumen de PEG20000 al 30%.
6. Dejar 15 min en hielo, volteándolo cada 3 minutos para facilitar la mezcla.
7. Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 6500 rpm.
8. Resuspender el precipitado obtenido en 200 µl de tampón RES B en hielo de forma suave durante 20 min.
9. Centrifugar a 4 °C durante 5 min a 6500 rpm.
10. Tomar el sobrenadante y pasar a un nuevo tubo previamente enfriado en hielo.

3.3 Extracciones de RNA total y cuantificación de TSWV

3.3.1 Extracción de RNA total (RNAt) a partir de tejido vegetal

Para la extracción de RNAt de los tejidos inoculados o sanos de *N. benthamiana* y de pimiento, se empleó un protocolo adaptado del *kit* comercial *Plant RNA Isolation Mini Kit* (Agilent) consistente en:

- 1) Añadir 600 µl de tampón de lisis a cada muestra (50-70 mg). Agitar en vortex durante 30 s.
- 2) Traspasar el volumen a la columna de prefiltración. Centrifugar a 13000 rpm durante 3 min.
- 3) Recuperar el volumen de flujo y añadirle un volumen de isopropanol frío. Mezclar hasta que se homogenice. Incubar durante 5 min.
- 4) Traspasar el volumen en dos tandas a la columna de purificación y centrifugar durante 30 s a 13000 rpm. Descartar el eluido y conservar en el mismo tubo la columna cargada con el RNA unido.
- 5) Añadir 450 µl de solución de lavado a la columna y centrifugar durante 30 s a 13000 rpm. Descartar el eluido y conservar la columna. Repetir el lavado.
- 6) Añadir 400 µl de solución de lavado a la columna y centrifugar durante 2 min a 13000 rpm.

- 7) Pasar la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Eluir el RNA unido añadiendo 10-50 µl de agua libre de nucleasas. Incubar durante 2 min y centrifugar 1 min a 13000 rpm. Cuantificar la concentración de RNA en las muestras con un Nanodrop 2000.

3.3.2 Extracción de RNAt de *C. elegans*

Se adaptó y optimizó un protocolo tomando como base el protocolo de He (2011). Para ello, se comprobaros diversos cambios en los pasos a seguir, aunque el punto de partida fue siempre el lavado de los gusanos antes de realizar la extracción. Los pasos realizados fueron los siguientes:

- 1) Disponer los nematodos en tubos de Eppendorf (2 ml).
- 2) Añadir a los tubos 1 ml de tampón M9 frío y centrifugar a 2115 rpm durante 10 min (sin freno) a 4 °C.
- 3) Eliminar el sobrenadante y recoger los gusanos. Lavar 2 veces con tampón M9 frío (1 ml), agitando suavemente la muestra hasta comprobar que está limpia. Centrifugar en las mismas condiciones en cada paso de lavado.

Una vez lavada la muestra se añade el tampón de lisis, que fue distinto según el método de extracción empleado y consistió en:

- 4) Añadir 600 µl de tampón de lisis¹ a cada muestra. Agitar en un vortex durante 30 s.
- 5) Eliminar la cutícula del nematodo, para lo cual se utilizaron dos métodos:
 - A) Sonicador: se aplicaron 3 pulsos de 20 s a una potencia de 10 W. Las muestras se sonicaron mantenidas en hielo y se esperó 30 s entre cada pulso (en hielo).
 - B) N₂ líquido: con los tubos congelados en nitrógeno líquido, que contienen las muestras, se dejaron descongelar a 37 °C y se agitó fuertemente en un vortex. Se repitió este procedimiento varias veces (al menos entre 3 y 6). Después, se dejaron descongelar a 37 °C de nuevo y se agitaron de nuevo en un vortex durante 30 s. Se mantuvieron en hielo otros 30 s. Este paso vortex-hielo se repitió otras 6-7 veces. Se dejó a temperatura ambiente (RT) durante 5 min.

¹ El tampón empleado varió según la extracción realizada:

- Ribozol® (Amresco) en el caso del protocolo de extracción manual.
- Tampón de lisis en el caso de la extracción con el *kit* comercial de *Plant RNA Isolation Mini Kit* (Agilent).
- Tampón RLT en el caso de la extracción con el *kit* comercial *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen).

Para la extracción del RNA^t se probaron dos kits y un protocolo manual.

-Protocolo manual

- 6) Extracción con cloroformo: añadir 2 ml de cloroformo por cada ml de gusanos (50-100 gusanos), invertir el tubo durante 15 s y dejar 3 min a RT. Centrifugar durante 15 min a 13000 rpm y 4 °C. El RNA^t se queda en la fase acuosa del sobrenadante.
- 7) Repetir la extracción con cloroformo.
- 8) Precipitación con isopropanol: transferir la fase acuosa del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Añadir 7 µg de glicógeno y 0,7 volúmenes de isopropanol, mezclándolo intensamente. Dejar a RT durante 10 min tras los cuales centrifugar durante 10 min a 13000 rpm y 4 °C. Retirar el sobrenadante preservando el precipitado.
- 9) Lavado del precipitado: añadir 900 µl de etanol 70% frío e invertir 2-3 veces. Centrifugar durante 5 min a 7500 rpm y 4 °C. Tras la centrifugación, eliminar el etanol del tubo y dejar secar durante 5 min.
- 10) Resuspender el precipitado en 25 µl de H₂O libre de nucleasas, incubando el tubo durante 10 min a 60 °C para disolver el pellet. Cuantificar la concentración de RNA en las muestras con un Nanodrop 2000.

- Plant RNA Isolation Mini Kit (Agilent) (se procedió como se ha indicado en el apartado 2.3.1).

-RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

- 6) Transferir el volumen muestra-tampón RES B a una columna QIAshredder colocada en un tubo colector de 2 ml. Centrifugar 2 min a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.
- 7) Añadir 0,5 volumen de etanol (96%) al sobrenadante recogido y homogeneizar con pipeta.
- 8) Transferir el volumen a una columna *RNeasy Mini Spin* colocada en un tubo colector de 2 ml. Centrifugar 15 s a ≥ 10000 rpm. Descartar el eluido.
- 9) Añadir 700 µl de tampón RW1 a la columna. Centrifugar 15 s a ≥ 10000 rpm. Descartar el eluido.
- 10) Añadir 450 µl de tampón RPE a la columna. Centrifugar 15 s a ≥ 10000 rpm. Descartar el eluido.
- 11) Añadir 450 µl de tampón RPE a la columna. Centrifugar 15 s a ≥ 10000 rpm. Descartar el eluido.

- 12) Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Eluir el RNA añadiendo 10-50 μ l de agua libre de nucleasas. Incubar 2 min y centrifugar 1 min a 13000 rpm. Cuantificar la concentración de RNA en las muestras con un Nanodrop 2000.

3.3.3 Cuantificación viral mediante qRT-PCR

Se utilizó como punto de partida un plásmido pBS KS II (+) que contenía el fragmento S (un inserto de \sim 3 kb) del aislado PVR (GenBank KP008134.1) del TSWV obtenido por el laboratorio del Dr. JA Daròs (IBMCP-CSIC/UPV, Valencia). Este plásmido se linealizó por digestión 12 h con la enzima *Sall* a 37°C. Tras este proceso el plásmido lineal se purificó con el *kit* comercial *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit* (Zymo Research).

El plásmido lineal purificado (300-500 ng) se utilizó para llevar a cabo una transcripción *in vitro* con el *kit* comercial *mMESSAGE mMACHINE Kit T7* (Ambion) en un volumen de reacción de 50 μ l que contenía, una solución 1x de la mezcla NTP/CAP (15 mM de ATP, CTP y UTP, 3 mM de GTP y 12mM del análogo de CAP), 1x del tampón de reacción que contiene sales, DTT y otros componentes, 4 μ l de la RNA polimerasa T7 junto a un inhibidor de RNAsas.

- 1) Tras 2h de incubación a 37 °C, se añadieron 8 μ l de la enzima *TURBO DNase free* (Ambion) para eliminar el molde de transcripción. Se incubó 30 min a 37 °C.
- 2) Se añadió después un volumen de solución de precipitación que contiene LiCl 7.5 M y 50 mM de EDTA. Se enfrió a -20°C al menos por 2h.
- 3) Se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 13.000 rpm. Se lavó el precipitado con etanol al 70% libre de RNAsas, se dejó secar y se resuspendió en agua libre de RNAsas. Se cuantificó la concentración de RNA en las muestras con un Nanodrop 2000.

Este transcrito se ha utilizado como *stock* para realizar todas las curvas estándar del trabajo a partir de diluciones seriadas del mismo. Para realizar la curva estándar se diluyó 1 μ l de dicho transcrito ($3,08 \times 10^{10}$ segmentos S de TSWV + colas transcritas) en 30,8 μ l de H₂O libre de RNAsas, para obtener así el primer punto de la curva estándar (SC1). A partir de este punto se diluyeron 5 μ l de la SC1 en 20 μ l de H₂O libre de RNAsas para obtener la SC2, realizando de igual forma y de forma sucesiva una dilución seriada para obtener el resto de puntos de la curva estándar.

Para cuantificar TSWV mediante qRT-PCR, se utilizaron la pareja de cebadores directo (5'-GCTTCCCACCTTTGATTC-3') y reverso (5'-ATAGCCAAGACAACACTGATC-3'), con los que se obtiene un amplicón de 144 pb del gen N del fragmento S del virus.

Las reacciones de qRT-PCR fueron llevadas a cabo en volúmenes de 20 μ l usando microplacas y el *kit* comercial *GoTaq Mix StepOnePlus System* (Promega) siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las cuantitativas se corrieron en *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). El *StepOne Software v2.2.2* (Applied Biosystems) fue empleado para analizar los datos. El programa de PCR empleado

consistió en un ciclo de 20 min a 45 °C para la RT, seguido de un ciclo de desnaturalización de 2 min a 95 °C y un *touchdown* consistente en 3 ciclos de 2 etapas: desnaturalización durante 15 s a 95 °C y anillado-extensión durante 1 min a 67 °C, seguido de 40 ciclos con una etapa de 95 °C durante 15 s y otra de 1 min a 65 °C. La etapa de elongación final fue de 5 min a 65 °C.

3.4 Manipulación de *C. elegans* en el laboratorio

La manipulación y ensayos realizados con *C. elegans* a lo largo de este trabajo se desarrollaron en un laboratorio de Biopolis SL (Parque Científico de Valencia) bajo la supervisión de los Drs. Daniel Ramón, Patricia Martorell y Silvia Llopis.

3.4.1 Cepas de *C. elegans* utilizadas

Las cepas empleadas en este trabajo fueron las siguientes:

- **N2**: genotipo silvestre utilizado en los laboratorios, cepa de referencia.
- **JU 1580**: aislado natural en el que se ha descrito la infección del virus de Orsay (Felix et al. 2011).
http://www.wormbase.org/species/c_elegans/strain/JU1580#02--10
- **RB 2519**: cepa homocigótica con una deleción de unos 600 pb en el gen *drh-1* obtenida mediante tratamiento con EMS.
http://www.wormbase.org/species/c_elegans/strain/RB2519#02--10

3.4.2 Cultivo de los gusanos

Las cepas de *C. elegans* se mantuvieron a 20 °C en placas de medio de crecimiento de nematodos (NGM) con un césped de bacterias *E. coli* OP50 de las que se alimentan los gusanos (Lewis y Fleming 1995).

3.4.3 Sincronización de los gusanos

Con el fin de que todos los gusanos empleados se encontrasen en el mismo estado de desarrollo, se llevaron a cabo sincronizaciones (Fig. 12). En estas sincronizaciones, 10 gusanos adultos fueron colocados en una placa NGM durante 3 horas. Transcurrido este periodo de tiempo, los gusanos parentales fueron eliminados dejando tan sólo los huevos que hubiesen puesto durante dicho tiempo. De esta forma, todos los gusanos de la placa se encontraban en la misma fase de su ciclo vital.

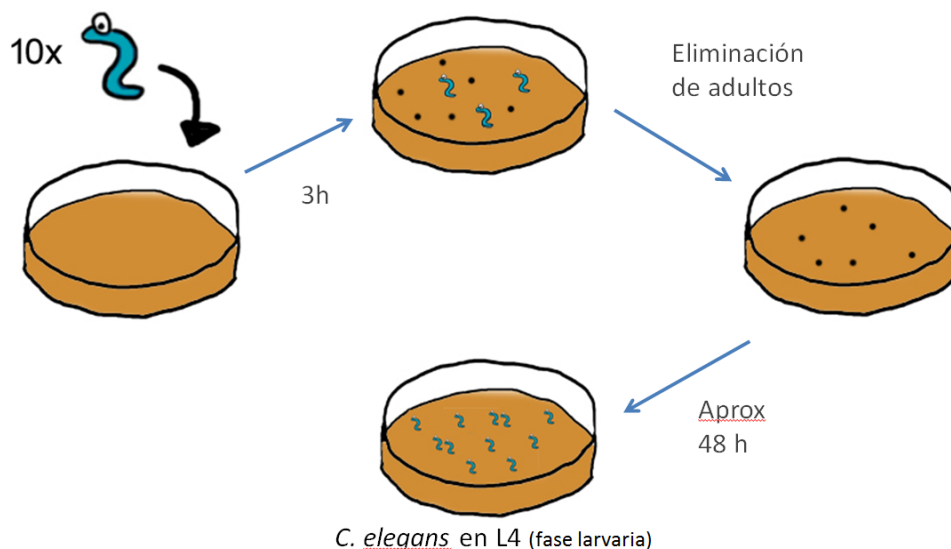


Fig. 12. Proceso de sincronización de *C. elegans*.

3.5 Ensayos de inoculación de TSWV en *C. elegans*

En los ensayos se comprobaron diversas condiciones con el fin de observar cuál era el efecto de la inoculación con diversas muestras de TSWV. Para ello, los tratamientos empleados y su nomenclatura fueron los siguientes:

- **Control:** mezcla de 0,5 ml de tampón M9 + 0,5 ml de tampón RES B.
- **Sap-sano:** mezcla de 0,5 ml de tampón M9 + 10 mg de tejido sano de *N. benthamiana*, previamente homogeneizado + 0,5 ml de tampón RES B.
- **TSWV-sap:** mezcla de 0,5 ml de tampón M9 + 10 mg de tejido infectado con TSWV de *N. benthamiana* homogeneizado + 0,5 ml de tampón RES B.
- **Semipurificado-sano:** mezcla de 0,5 ml de tampón M9 + 0,5 ml de semipurificado obtenido a partir de tejido sano de *N. benthamiana*, siguiendo el protocolo previamente descrito en el apartado 2.2.1.
- **TSWV-semipurificado:** mezcla de 0,5 ml de tampón M9 + 0,5 ml de semipurificado obtenido a partir de tejido de *N. benthamiana* infectado con TSWV, siguiendo el protocolo del apartado 2.2.1.

Los ensayos (Fig. 13) se realizaron con nematodos en estado larvario L4, obtenidos a partir de placas sincronizadas antes de empezar el ensayo. Un número variable entre 25-100 gusanos (según el ensayo) se traspasaron a tubos que contenían 0,5 ml de M9 a los que se añadió el mismo volumen del inóculo a ensayar.

Los tubos se incubaron a 25 °C durante 24 horas en agitación (empleando un agitador horizontal) y después se lavaron los gusanos. Para ello, se dejó decantar durante 10 min el contenido del tubo, eliminando el sobrenadante. Una vez eliminado, se añadió 1 ml de tampón M9, homogeneizando la muestra. Tras dejar precipitar los gusanos de nuevo, se

repetió el lavado. Una vez lavados se traspasaron con pipeta a una placa NGM. Una vez se evaporó de la placa el tampón arrastrado en el pipeteo de los gusanos, se procedió a pasar con aguja los gusanos a nuevas placas NGM con *E. coli*. Para cada uno de los ensayos realizados en gusano se llevó en paralelo un bioensayo de inoculación en 15 plantas de *N. benthamiana*. Esto permitió detectar en uno de los ensayos la contaminación de una muestra sana utilizada para inocular los gusanos, lo que explicaba los resultados anómalos obtenidos en el ensayo correspondiente de esperanza de vida (Anexo 2).

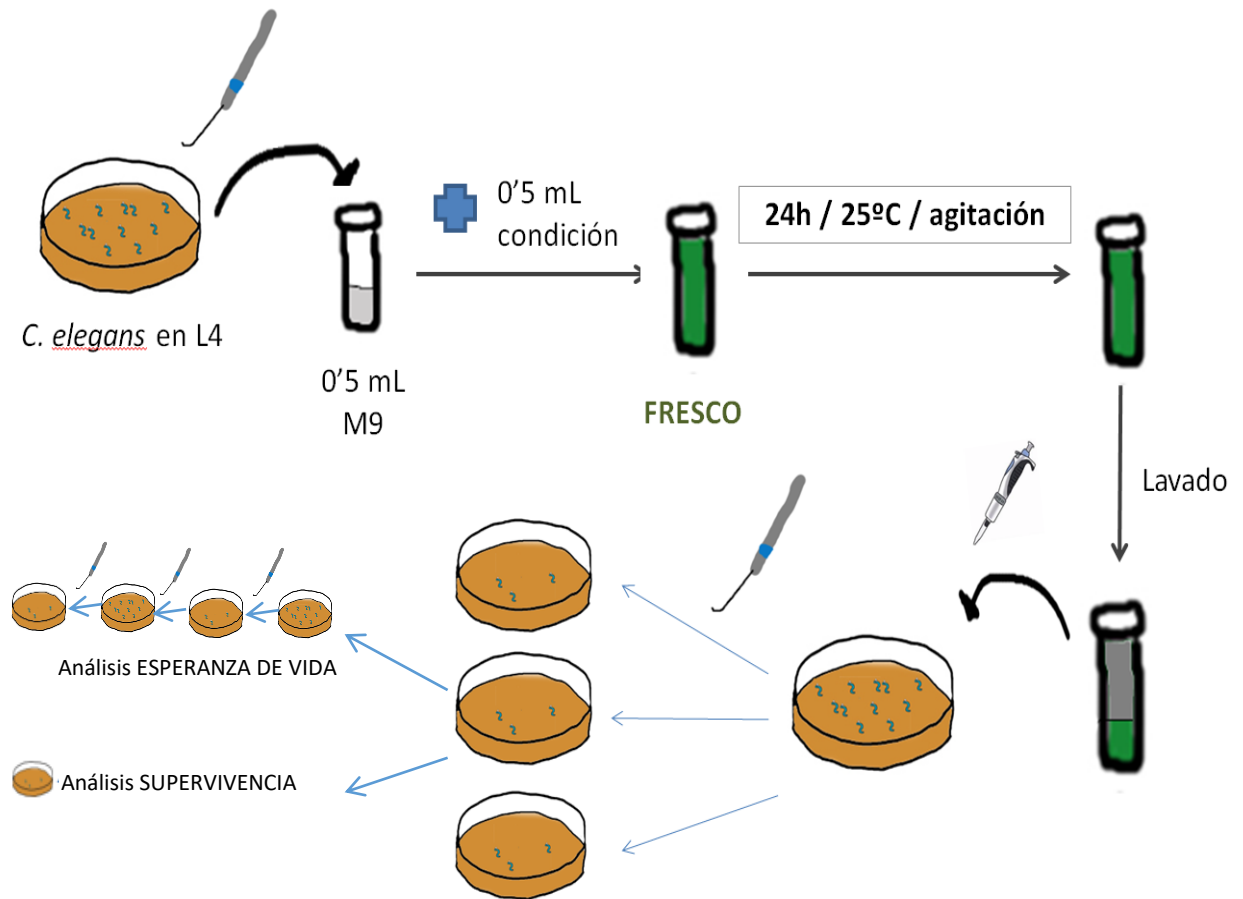


Fig. 13. Esquema general del protocolo de incubación-inoculación de *C. elegans* con diversos tipos de muestras a ensayar.

3.5.1 Esperanza de vida y supervivencia

Previamente a la realización de estudios moleculares sobre la posible infección en gusano, se realizaron evaluaciones del efecto de los inóculos virales en la supervivencia de la población de gusanos. Para ello, se utilizaron como parámetros de medida la esperanza de vida y la supervivencia de los nematodos tras 24 horas (h) de inoculación.

Ensayo de esperanza de vida

Evaluación de la supervivencia en una población de *C. elegans* a lo largo del tiempo a través del recuento de los gusanos vivos presentes en la placa, cada día durante 9-12 días. Los gusanos desaparecidos se computaron como muertos.

En caso de observar descendencia en la placa, se traspasaron los gusanos parentales a nuevas placas para evitar confundir a éstos con su progenie.

Medida de supervivencia

Se obtiene mediante el recuento del número de *C. elegans* que sobreviven al final del ensayo de inoculación de 24 h, partiendo de una población inicial de número conocido (100 gusanos). La resta implica el número de gusanos desaparecidos/muertos.

3.5.2 Evaluación molecular de la posible replicación de TSWV en *C. elegans*

La posible replicación de TSWV en el interior del gusano, se evaluó determinando la cantidad de partículas virales en los gusanos incubados previamente con el inóculo TSWV-*sap* a lo largo de un tiempo concreto. En 9 tubos que contenían 0,5 ml de M9 se depositaron 50 gusanos de la cepa RB2519 contados uno a uno con aguja. Se preparó un volumen suficiente de TSWV-*sap* y se filtró mediante Miracloth. A cada uno de los tubos con los nematodos se transfirió 0,5 ml del inóculo. Los 9 tubos con gusano y 9 tubos preparados en paralelo únicamente con 0,5 ml de TSWV-*sap*, que eran el control del ensayo, se incubaron juntos a 25 °C en agitación (agitador horizontal). Cada cierto periodo de tiempo (Fig. 14) un tubo con gusanos y un tubo TSWV-*sap* se retiraron de la incubación y se conservaron en N₂ líquido para su posterior análisis. Tras retirar periódicamente todos los tubos a lo largo de 24 h, se procedió a la extracción del RNAt de las muestras con el protocolo de choque térmico para eliminar la cutícula del gusano (congelación-descongelación) descrito en el apartado 2.3.2, y el protocolo con Ribozol para extraer el RNAt. Una vez obtenido el RNAt se cuantificaron las partículas virales mediante qRT-PCR según se ha descrito en el apartado 2.3.3.

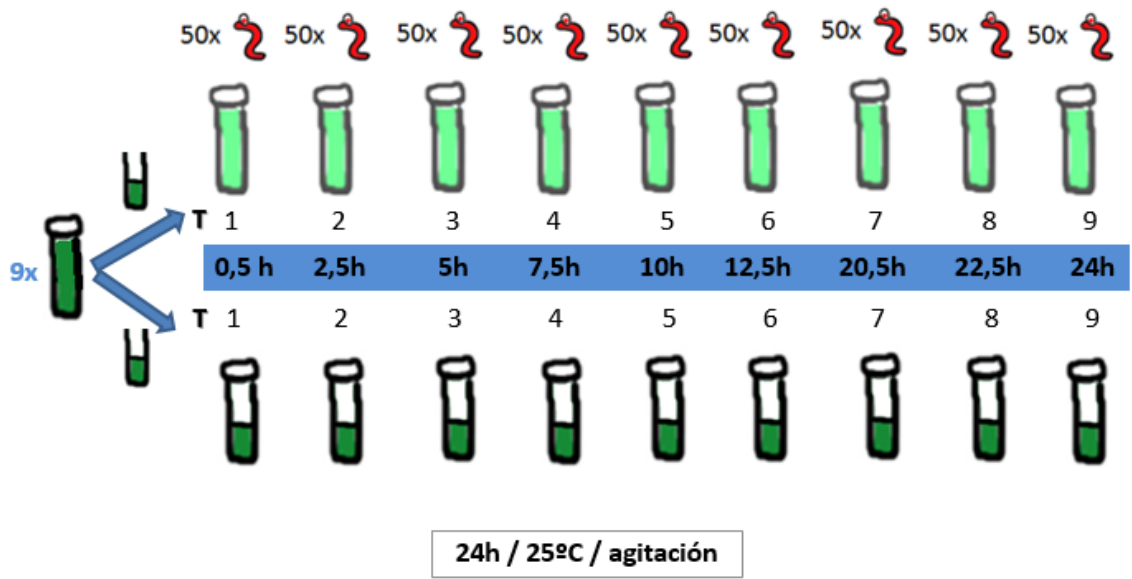


Fig. 14. Esquema del ensayo de inoculación de *C. elegans* con muestras de TSWV-sap a lo largo de 24 h.

4.1 Obtención de un *stock* viral adecuado: selección de huésped y optimización de los bioensayos de TSWV en planta

Para disponer de un *stock* viral uniforme, que nos proporcionase suficiente cantidad de inóculo viral para todos los ensayos de esta memoria, se necesitaba obtener una gran cantidad de tejido vegetal infectado con TSWV. Para ello, se inocularon extractos vegetales infectados con TSWV en distintas especies vegetales. El objetivo era determinar el tipo de huésped en el que las infecciones fueran más eficientes, reproducibles y en las que la cantidad de partículas virales fuese más significativa.

Se conoce que la eficiencia de transmisión mecánica del virus se ve afectada por diversos factores (Mandal et al. 2001). Algunos de estos factores son el estado de desarrollo de la planta a inocular, las condiciones de crecimiento de ésta o el tipo de inóculo. Así, estos aspectos deben tenerse en cuenta a la hora de desarrollar un protocolo de inoculación eficiente.

Para seleccionar la especie vegetal más apropiada para replicar el virus, se inocularon diversos huéspedes susceptibles a TSWV: huéspedes naturales sistémicos del virus como pimiento y tomate y experimentales como *N. benthamiana*, y el huésped de lesión local *C. quinoa*. Del mismo modo, se testaron varios métodos de inoculación y se utilizaron dos tipos de inóculos: *sap* y semipurificado viral.

De todas las especies inoculadas, las únicas que mostraron síntomas de infección sistémica fueron tomate, pimiento y *N. benthamiana*, mientras que en *C. quinoa* se observaron las típicas lesiones locales, muy parecidas a las observadas en *N. benthamiana* y tomate (Fig. 14A y B). Posteriormente, se confirmó que estos síntomas eran los causados por TSWV al detectar el virus en esas muestras por qRT-PCR (ver apartado 3.2). Dado que los resultados observados en tomate no fueron satisfactorios, seguimos con pimiento y *N. benthamiana* como huéspedes más susceptibles.

Tras la inoculación, *N. benthamiana* presentó síntomas de infección local como preámbulo a la infección sistémica que caracteriza a TSWV en esta especie. Estos consistían en pequeñas manchas circulares cloróticas en el haz de la hoja inoculada (Fig. 15A). Una vez aparecieron estos síntomas la planta desarrolló una infección sistémica en un periodo que osciló entre los 5-15 días (Fig. 15B y Fig. 16). En la infección sistémica la clorosis se extendió por toda la hoja, volviéndose ésta amarilla en gran parte y rugosa en su totalidad. La planta mostró epinastia y arrugamiento apical, seguido de clorosis generalizada y necrosis (Fig. 15). En pimiento los síntomas se retrasaban mucho más, detectándose en una ventana entre 10-21 dpi, siendo similares a los observados en las infecciones de *N. benthamiana* pero menos intensos (Fig. 15A).

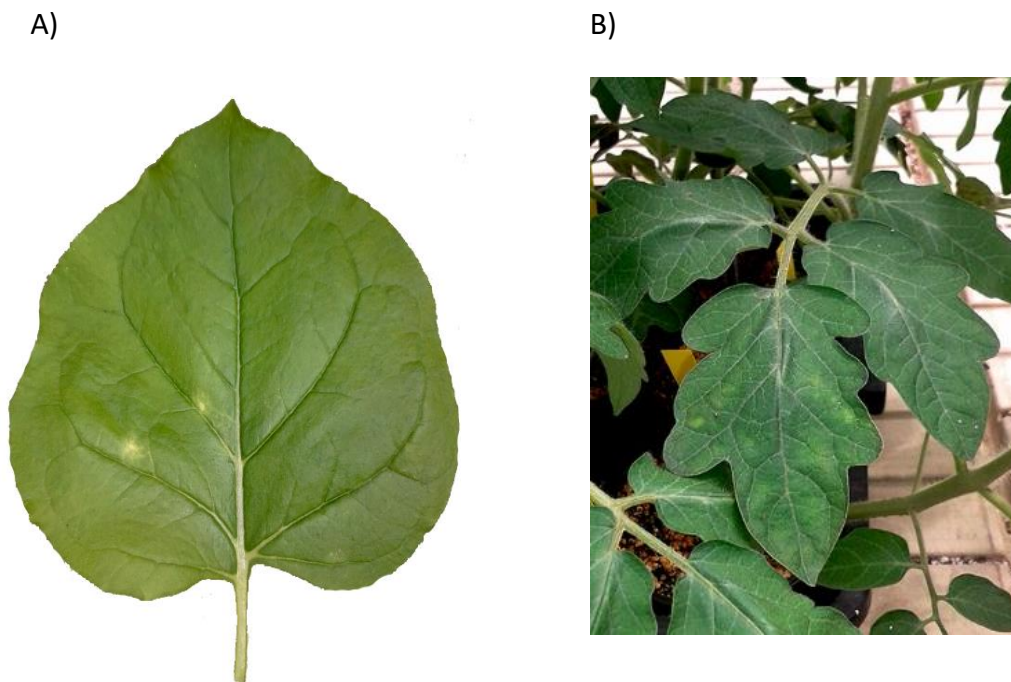


Fig. 15. A) Síntomas iniciales de infección local de TSWV en *N. benthamiana* a los 7 dpi. B) Síntomas de lesiones en hojas sistémicas de tomate infectado con TSWV a los 21 dpi

El periodo de tiempo en el que la planta mostró estos síntomas fue variable debido a factores externos: estado de las plantas, condición de las cabinas, etc. Por ello, se realizaron diversos bioensayos en condiciones controladas de luz y temperatura creciendo las plantas inicialmente en fitotrón (luz artificial) y/o en cabinas de invernadero (luz natural suplementada con artificial).

Los resultados de un grupo de estos bioensayos se muestran en la Tabla 3. La tasa de infección fue baja en ambas especies: $25,90 \pm 17,76$ % en *N. benthamiana* y $21,54 \pm 2,17$ % en *C. annuum*. Entre las dos especies *N. benthamiana* fue la que demoró más tiempo en producir síntomas tras la inoculación, tardando 21 días en lograr el lote su máximo porcentaje de infección. Este periodo se redujo solo a 14 días en la otra especie.

Tabla 3. Comparación de la eficiencia de infección con TSWV lograda al inocular *C. annuum* y *N. benthamiana* en fitotrón 21 dpi en el caso del primer huésped y 14 dpi en el segundo.

Especie	Plantas inoculadas	Plantas infectadas	Tasa infección (%)	Promedio infección
<i>N. benthamiana</i>	15	2	13,33	25,90 ±17,76%
<i>N. benthamiana</i>	26	10	38,46	
<i>C. annuum</i>	15	3	20,00	21,54 ±2,17%
<i>C. annuum</i>	26	6	23,08	

A) PLANTAS DE PIMIENTO INFECTADAS CON TSWV A 17 DPI



B) PLANTAS DE *N. benthamiana* INFECTADAS CON TSWV A 16 DPI



Fig. 16. Comparación de los síntomas observados en plantas de *C. annuum* y *N. benthamiana* en bioensayos realizados en fitotrón.

Los síntomas sistémicos observados en fitotrón (Fig. 16) se producían entre 10-20 dpi en *N. benthamiana* y 15-21 en pimiento. Sin embargo, en las condiciones de cabina, las infecciones fueron más reproducibles y eficientes, detectándose los primeros síntomas visibles a partir de 4-7 dpi en *N. benthamiana* y 10-17 dpi en pimiento (Fig. 16). Con el fin de homogeneizar las infecciones y debido a los resultados más eficientes obtenidos, las plantas se crecieron en cabinas de invernadero con condiciones controladas de luz y temperatura, en lugar de en fitotrón.

A) PLANTAS DE *N. benthamiana* INFECTADAS CON TSWV A 7 DPI



B) PLANTAS DE PIMIENTO INFECTADAS CON TSWV A 11 DPI



Fig. 17. Comparación de los síntomas observados en plantas de *N. benthamiana* (A) y *C. annuum* (B) en bioensayos realizados en cabina. En B, panel izquierdo se muestra una planta infectada de pimiento frente a una planta sana inoculada con tampón. En B, panel derecho se muestra otra planta individual del mismo bioensayo

En cabina se lograron síntomas de infección en un porcentaje superior al de fitotón y en tiempos más cortos tanto en *N. benthamiana* (Fig. 17A) como en *C. annuum* (Fig. 17B). El promedio de infección logrado en cabina ($35,83 \pm 15,32\%$) en *C. annuum* fue ligeramente superior que el logrado en fitotón ($21,54 \pm 2,17\%$): en cabina *C. annuum* volvió a mostrar una tasa de infección baja y poco reproducible. En el caso de *N. benthamiana* el porcentaje $25,90 \pm 17,76 \%$ alcanzado en fitotón fue mejorado en cabina hasta conseguir una tasa de $79,12 \pm 10,44\%$.

De entre las dos especies, es *N. benthamiana* la que presenta mayores tasas de infección, siendo en cabina el doble que en fitotrón (Tabla 4). Además, estos resultados fueron más consistentes a lo largo de los ensayos, por ello se inocularon diversos lotes de *N. benthamiana* con el fin de obtener una gran cantidad de tejido vegetal infectado con TSWV que fue el stock viral uniforme utilizado a lo largo del trabajo.

Tabla 4. Comparación de la eficiencia de infección con TSWV lograda al inocular *C. annuum* y *N. benthamiana* en cabina de invernadero.

Espece	Plantas inoculadas	Plantas infectadas	Tasa infección (%)	Promedio infección
<i>N. benthamiana</i>	14	9	64,29	79,12 ±10,44%
<i>N. benthamiana</i>	15	13	86,67	
<i>N. benthamiana</i>	29	25	86,21	
<i>N. benthamiana</i>	29	23	79,31	
<i>C. annuum</i>	12	3	25,00	35,83 ±15,32%
<i>C. annuum</i>	15	7	46,67	

Finalmente, con todo el material obtenido de *N. benthamiana* se realizaron inicialmente dos mezclas distintas de tejido vegetal: el A, que agrupaba los tejidos con síntomas más pronunciados, y el B, que englobaba los tejidos con síntomas menos intensos que los de A. Este material fue utilizado para cuantificar el virus mediante qRT-PCR (ver apartado siguiente) y confirmar la detección específica de TSWV. Se cuantificaron también los tejidos de *C. annuum* para averiguar si la carga viral se encontraba en el mismo orden de magnitud que en *N. benthamiana*.

4.2 Desarrollo de un protocolo de qRT-PCR para la cuantificación de TSWV

4.2.1 Diseño de la qRT-PCR

Con el fin de obtener un método con el cual poder cuantificar la cantidad de moléculas virales presentes en una muestra de RNAt, se utilizó la técnica de qRT-PCR para detectar TSWV.

Para ello, se partió de un plásmido pBS KS II (+) que contenía el fragmento S (2922) del aislado PVR del TSWV (Fig. 18). Se seleccionó dicho plásmido porque al digerirlo con *Sall* y transcribir con la RNA polimerasa del fago T7, se obtienen transcritos de polaridad directa (viral o **v**) del tamaño del segmento S completo. Esta orientación es la referenciada como

la orientación que se acumula en exceso en los viriones frente a su forma complementaria o vc.

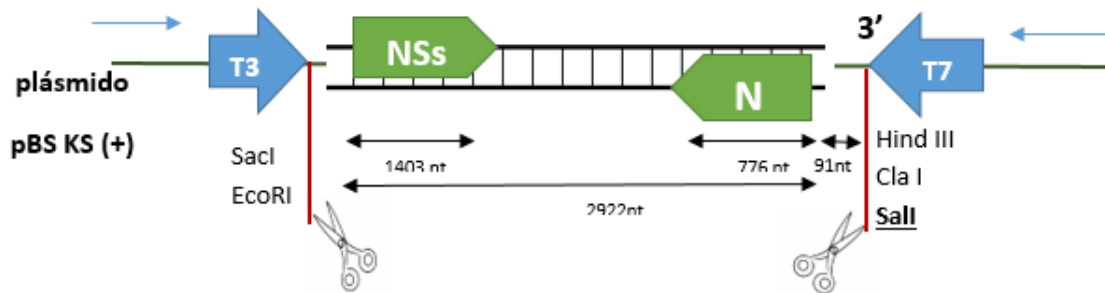


Fig. 18. Representación del plásmido pBS KS II (+) con el gen NSs en orientación directa. Se indican las longitudes de las ORFs, sus orientaciones y los tamaños.

Con el plásmido lineal purificado se realizó una transcripción *in vitro* (Fig. 19) comprobando que el transcrito obtenido tenía la longitud deseada (segmento S completo más cola de 91 nt del polylinker)

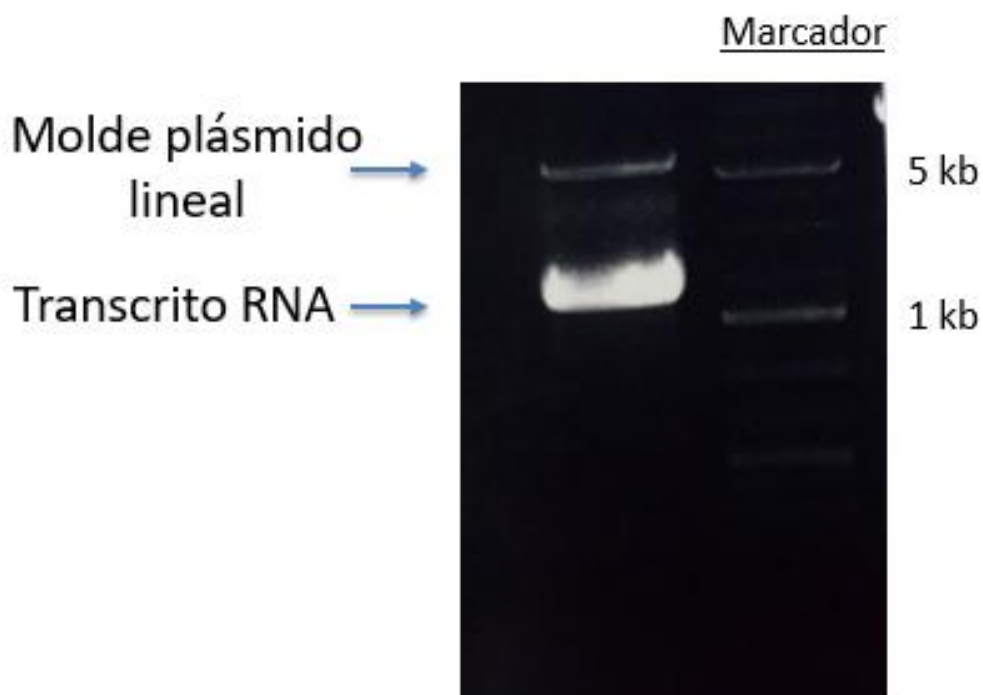


Fig. 19. Gel de agarosa al 0.8%, TAE x 1 el que se aprecia el transcrito del plásmido lineal y el marcador marcador 1 Kb Plus (Fisher).

A partir de este transcrito purificado adecuadamente, se obtuvo un *stock* suficiente con el que realizar una curva estándar mediante diluciones seriadas en extracto vegetal de planta sana. La cantidad de moléculas S conocidas presentes en dichas diluciones (Tabla 5) nos permitió calcular el número de moléculas presentes en las muestras problema utilizando una curva estándar. A continuación, se indica el número de moléculas de cada dilución utilizada

Tabla 5. Número de copias de moléculas virales S en cada uno de los puntos de la curva estándar realizada para la cuantificación de TSWV.		
Punto curva estándar	Nº moléculas TSWV	Factor de dilución
SC1	5 x 10 ⁸	-
SC2	1 x 10 ⁸	1/5
SC3	2 x 10 ⁷	1/5
SC4	4 x 10 ⁶	1/5
SC5	8 x 10 ⁵	1/5
SC6	1,6 x 10 ⁵	1/5
SC7	3,2 x 10 ⁴	1/5
SC8	6,4 x 10 ³	1/5
SC9	1,28 x 10 ³	1/5
SC10	2,56 x 10 ²	1/5
SC11	51,2	1/5

Con una curva estándar ya definida fue preciso utilizar unos cebadores para amplificar específicamente una región pequeña del gen N del fragmento S de TSWV. Para ello, se utilizaron los siguientes primers que amplifican un fragmento de 144 nt (Fig. 20:

```

2281  attttgcacactgatatatagccaagacaacactgatcatctcaaagctatcaactgaag
2341  caataagaggtaagctacctccagcattatggcaagcctcacagactttgcatcatcga
2401  gaggtaatccataggcttgaatcaaagggtggaagcaatcttagatttgatagtattga

```

Fig. 20. Región amplificada en el fragmento S de TSWV. El primer directo (azul) y el reverso (verde) amplifican una zona de 144 nt.

Con los datos obtenidos de la qRT-PCR (Fig. 21) se puede observar la alta eficiencia ($R^2 = 0,994$, eficacia del 101 %) de la curva estándar que se estableció para las cuantificaciones.

En las curvas de fusión del amplicón generado sólo se observa un único producto específico, con $T_m \approx 81$ °C. En este producto no hay presencia de dímeros de cebadores ni otros productos inespecíficos. Con los valores C_T obtenidos se pudo ver que la curva patrón permite cubrir los rangos de acumulación viral de las muestras problema de *N. benthamiana* infectadas por TSWV. Estos valores también nos permiten determinar la sensibilidad de la curva patrón, estando el límite establecido al menos en la SC10, que corresponde a la detección específica de $2,56 \times 10^2$ moléculas de TSWV por ng de RNAt.

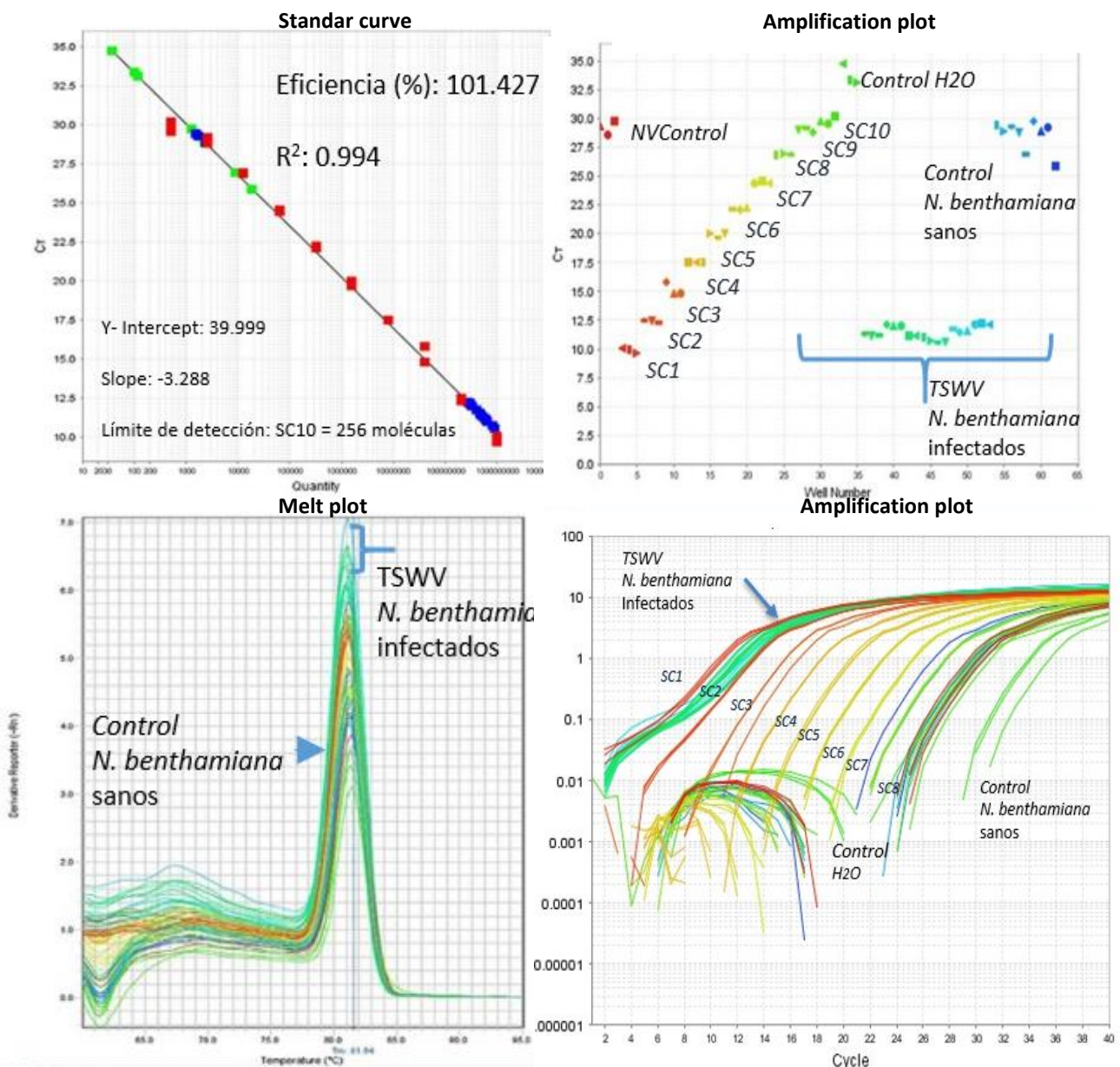


Fig.21. Datos obtenidos de la qRT-PCR. Panel superior: a la izquierda podemos observar las curvas de amplificación en función del valor C_T , y a la derecha la recta patrón con las las muestras problema interpoladas en la misma. Panel inferior: a la izquierda, curvas de fusión y T_m de los productos de la amplificación y a la derecha, rangos de los valores C_T obtenidos de las muestras problema cubiertas por la curva estándar en comparación con los controles sanos de planta y negativo de la qRT-PCR.

4.2.2 Cuantificación de TSWV por qRT-PC

Cuantificación de TSWV en bioensayos realizados en huéspedes distintos

En nuestros primeros ensayos de infección, distintos lotes de *N. benthamiana* y *C. annuum* fueron inoculados con una muestra de TSWV-*sap* proporcionada por el Dr. Daròs (Fig. 22). La cuantificación de este inóculo inicial fue de $12 \pm 0,45 \times 10^6$ moléculas de TSWV por ng de RNAt.

Con este inóculo se logró infectar lotes de *C. annuum* y *N. benthamiana*, mostrando los tejidos de pimiento una acumulación mayor de moléculas de TSWV ($16 \pm 2,7 \times 10^6$ y $11 \pm 2,1 \times 10^6$) que los tejidos de *N. benthamiana* ($5 \pm 0,67 \times 10^6$ y $6 \pm 0,42 \times 10^6$).

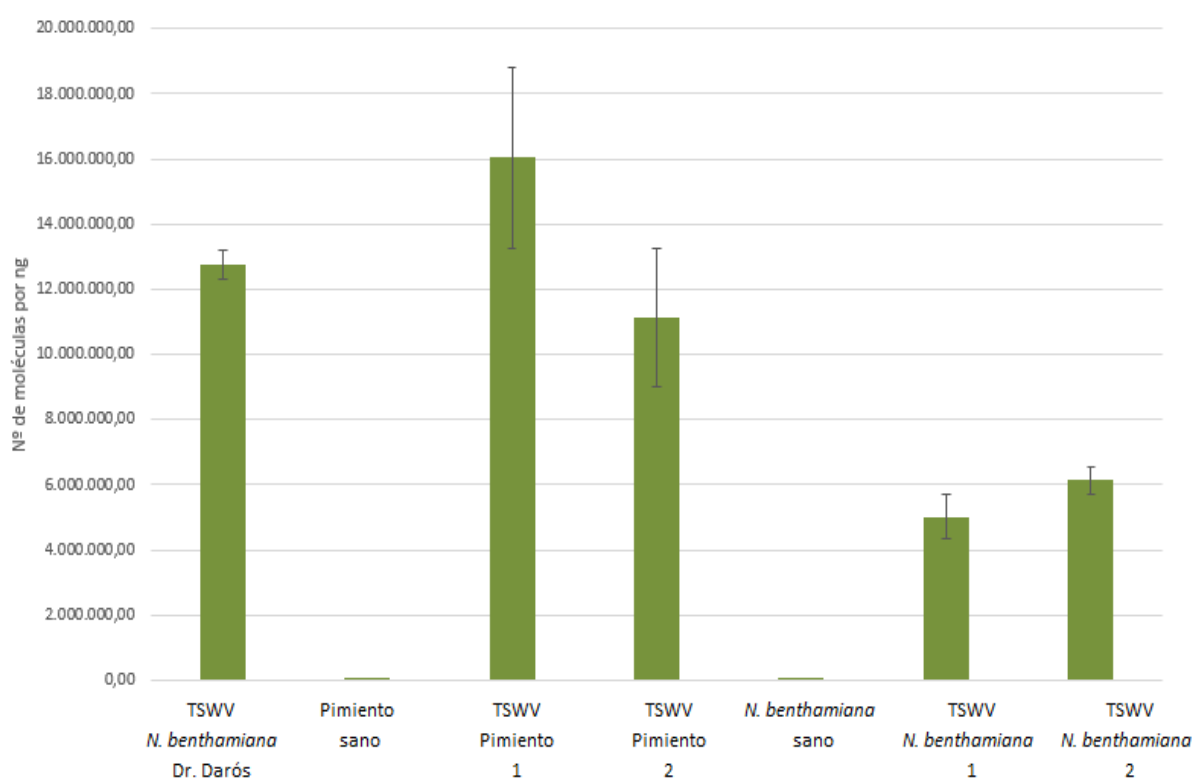


Fig. 22. Comparación de la carga viral en el inóculo TSWV-*sap* original (Dr. Daròs), en el tejido de plantas control sanas (C-) de ambos huéspedes y en el tejido de muestras problema de *C. annuum* y *N. benthamiana* con síntomas típicos de infección por TSWV. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Como se observa en la Fig. 23 el producto de PCR cuantitativa amplificado a partir de muestras infectadas de pimiento, era igual de específico que el de *N. benthamiana* (Fig. 23 panel inferior) detectándose un único pico en las curvas de fusión de estos productos.

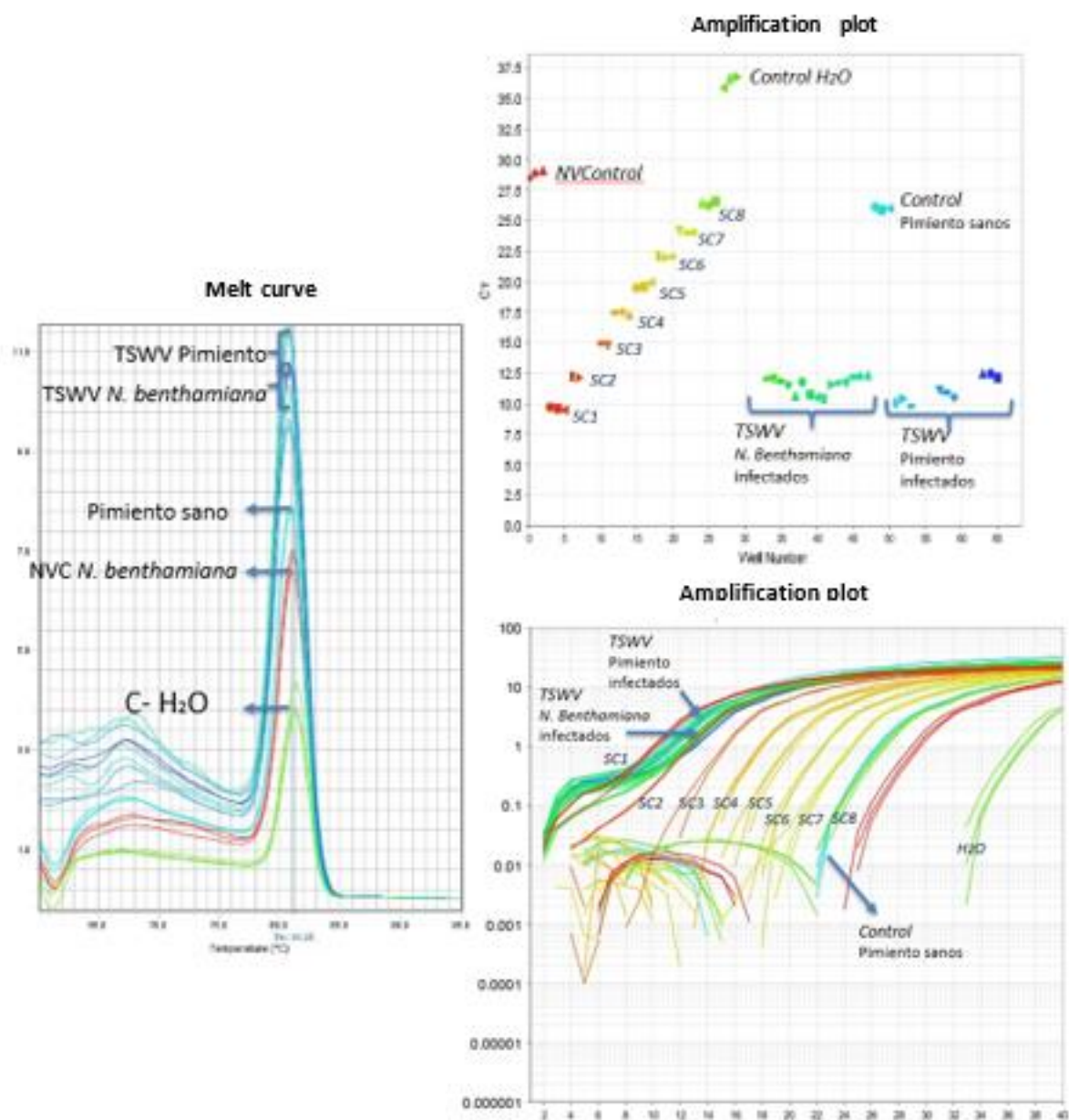


Fig. 23. Datos obtenidos de la qRT-PCR. Panel superior: a la izquierda podemos observar los rangos de valores C_T de las muestras problema cubiertas por la curva estándar; a la derecha las curvas de amplificación. Panel inferior: productos de las curvas de fusión y su T_m .

A pesar de tener una mayor carga viral, la cantidad obtenida de tejido de pimiento infectado era menor que la de *N. benthamiana*, el RNA_t era más difícil de extraer limpio y los bioensayos más lentos, por lo que la cantidad de tejido disponible era un factor clave a la hora de seleccionar el huésped. Cabe señalar que en los tejidos de *N. benthamiana* que mostraron infección, la carga viral cuantificada fue inicialmente inferior (la mitad) a la carga viral del inóculo original.

Fluctuación de los títulos virales de TSWV según avanza la infección

La carga viral varió no sólo entre especies sino dentro de la misma especie según los síntomas presentados (siguiente apartado) y el momento de recolección. Esto puede verse en la cuantificación de tejidos de *N. benthamiana* recogidos a los 18 dpi ($8 \pm 0,18 \times 10^6$ moléculas TSWV/ng RNAt) frente a tejidos del mismo ensayo recogidos a los 25 dpi ($3 \pm 0,66 \times 10^6$ moléculas TSWV/ng RNAt) (Fig. 24). La demora de 7 días en la recolección de tejido supuso la pérdida de más de la mitad de la carga viral en éste. De esta forma, se comprobó cómo el momento de recolección es un aspecto clave para lograr una buena carga viral.

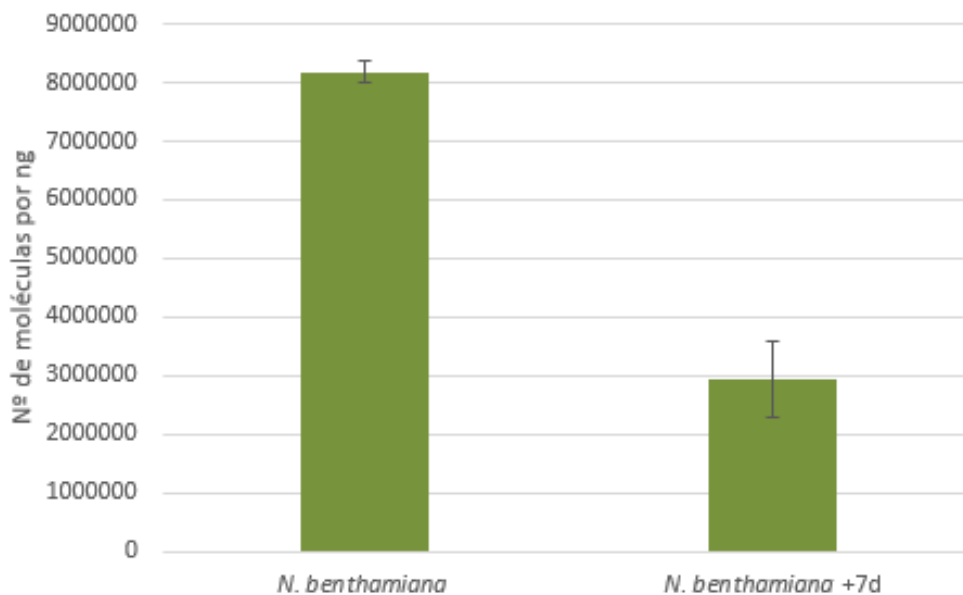


Fig. 24. Comparación de tejidos de *N. benthamiana* infectados con TSWV del mismo ensayo muestreados con 7 días de diferencia. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Título viral del stock de referencia

Tras lograr una eficiente tasa de infección de TSWV en cabina utilizando *N. benthamiana*, se logró disponer de una gran cantidad de tejido vegetal con síntomas, que se agruparon en dos mezclas como se ha sido descrito en el apartado 3.1. La mejor eficiencia de infección lograda también en cabina para *C. annuum*, permitió disponer de cierta cantidad de tejido infectado para esta especie. Las mezclas de *N. benthamiana* A (NB-A), B (NB-B) y de pimiento, fueron cuantificadas por qRT-PCR para determinar la carga viral de los stocks (Fig. 25). El número absoluto de moléculas de TSWV/ng RNAt osciló entre $1,5 \times 10^6 - 3,5 \times 10^6$. La mayor cantidad de moléculas de TSWV se detectó en los tejidos A de *N. benthamiana* ($3,5 \pm 0,115 \times 10^6$) y la menor en la mezcla B de la misma especie ($1,5 \pm 0,115 \times 10^6$), mientras que con $2,7 \pm 0,32 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng RNAt el tejido de pimiento mostró una carga viral intermedia.

Los tejidos de *N. benthamiana* con mayor cantidad de síntomas sistémicos (NB-A) presentaron una mayor carga viral que aquellos con una sintomatología menos acentuada (NB-B), señalando la probable correlación entre elevadas cargas virales de TSWV con una mayor intensidad en los síntomas causados. Existió un compromiso a la hora de recoger el material con síntomas. Cuánto más clara fuese la sintomatología sistémica mayor sería, *a priori*, la carga viral del tejido recogido. Sin embargo, no recoger el material vegetal infectado en el momento en el que los síntomas sistémicos son claros, conllevaba a la necrosis de la hoja al cabo de 3-5 días. La presencia de tejido necrótico en el material recogido inutilizaba el uso de ese tejido para posteriores inoculaciones, y como ya se ha mostrado en la Fig. 24 también la carga viral disminuía.

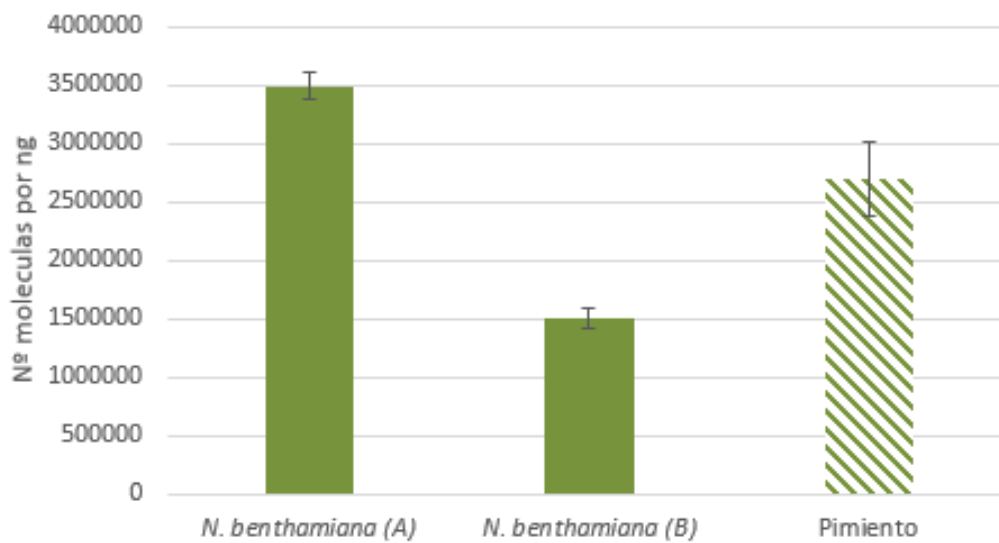


Fig. 25. Cuantificación de la carga viral mediante qRT-PCR de los tejidos que conformaron el *stock*. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Teniendo en cuenta estos resultados, el tejido infectado de *N. benthamiana* fue el elegido para desarrollar las inoculaciones en el nematodo. Su elección se debió a que su carga viral era similar a la del pimiento, pero se disponía de mayor cantidad de tejido, las infecciones eran más eficientes y tempranas y las extracciones de RNA_t eran más limpias. Al observar que las diferencias entre ambos *stocks* NB-A y B no eran muy elevadas (estando en el mismo orden de magnitud), se juntaron ambas de forma homogénea para el resto de ensayos del trabajo.

4.3 Manipulación de *C. elegans* en el laboratorio

La necesidad del aprendizaje en el manejo del gusano y las circunstancias experimentales, conllevaron diversas mejoras en el protocolo de inoculación-incubación de *C. elegans* con diversos inóculos virales obteniendo finalmente un protocolo de inoculación optimizado.

En una primera instancia, el traspaso de nematodos a los tubos condición se realizó mediante pipeteo de cantidades cercanas a 100 individuos. A pesar de no ser lo habitual en los ensayos con el nematodo, conocer el número exacto de individuos de partida permite evaluar la posible mortalidad ocurrida durante las 24 h posteriores a la inoculación. Por ello, cuando se empezó a sospechar de una posible mortalidad en ese periodo, se procedió a fijar un número exacto de nematodos de partida mediante su recuento exacto. Para ello, éstos empezaron a ser transferidos uno a uno con una aguja al tubo condición, hasta alcanzar un total de 100 por tubo.

A lo largo de la investigación detectamos la importancia del momento de preparación de los extractos vegetales: en los ensayos iniciales, los inóculos se preparaban en el laboratorio del IBMCP y después se trasladaban en hielo hasta Biopolis. Puesto que el inóculo no podía ser utilizado hasta el recuento de los gusanos para cada condición de ensayo (lo que podía alargarse hasta 3 h), los inóculos virales podían perder infectividad. Con el fin de maximizar la capacidad infectiva de TSWV y evitar la variabilidad en la capacidad intra-ensayo, se procedió a preparar los inóculos directamente en Biopolis (*sap* Biopolis), suspendiendo los polvos previamente congelados en N₂ líquido justo antes de cada inoculación. Este efecto en la pérdida de capacidad infecciosa del inóculo se comprobó en un ensayo en gusano. Se comparó el efecto de los dos inóculos TSWV-*sap*, *sap* Biopolis o suspendido en el IBMCP y mantenido 2-3 h en hielo (*sap* IBMCP), en la supervivencia de 100 nematodos.

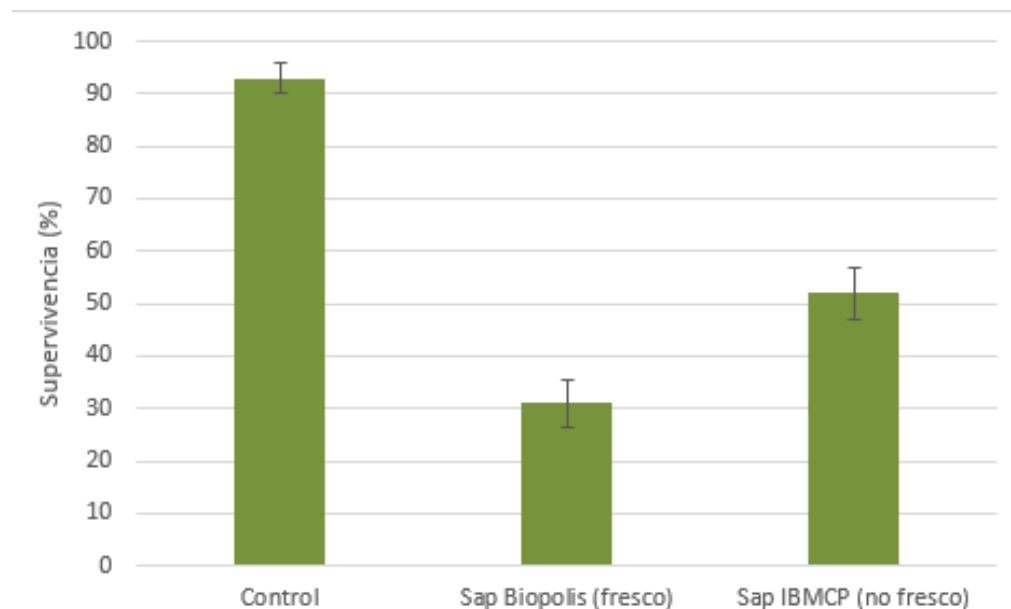


Fig. 26. Comparación del efecto causado sobre la supervivencia de *C. elegans* tras 24 horas de incubación con un inóculo de TSWV *sap* preparado justo antes de la inoculación (fresco) frente a otro preparado horas antes (no fresco). Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Como puede observarse en la Fig. 26, la disminución en la supervivencia es más acentuada en los gusanos incubados con el inóculo TSWV-*sap* Biopolis, que fue preparado en el momento, por lo que a partir de entonces siempre se empleó este tipo de inóculo en el trabajo.

4.4 Ensayos de inoculación de TSWV en *C. elegans*

4.4.1 Selección de cepa

Con el fin de comprobar la susceptibilidad del nematodo a una posible infección por TSWV, se seleccionaron tres cepas como objeto de estudio: la cepa silvestre N2, que es la cepa de referencia en los laboratorios de investigación, y dos cepas mutantes para el sistema de defensa basado en RNAi, RB2519 y JU1580, en la última de las cuales se ha descrito la infección natural por el virus de Orsay (Felix et al. 2011).

Al necesitar comprobar diversas condiciones (siendo necesario disponer de una gran cantidad de gusanos por cada una) se decidió focalizar los ensayos en una cepa de gusano. Para ello, se realizó un primer ensayo con el fin de descubrir qué cepa de nematodo era la más adecuada para nuestra investigación. La complicada adaptación inicial en el manejo del nematodo reduce la cantidad de gusanos con los que trabajar. En este primer ensayo la cantidad de nematodos se vio limitada a 30 nematodos. Para esta prueba se evaluó la esperanza de vida, método frecuentemente empleado para evaluar el efecto de patógenos, a lo largo de 6 días. Las condiciones comprobadas además del control fueron incubaciones con *sap*-sano, TSWV-*sap* y TSWV semipurificado. Por las limitaciones con el número de gusanos no fue posible introducir un control para el purificado. Debido a las limitaciones técnicas, el carácter exploratorio del estudio tenía por objetivo recabar datos que lograsen centrar los ensayos posteriores en un tipo de cepa o inóculo. Por esta razón, a pesar de la carencia de un control, nos pareció interesante la introducción del TSWV semipurificado para comprobarlo.

En la supervivencia de los gusanos de la cepa N2 (Fig. 27) no se apreciaron grandes diferencias en función de los tratamientos/incubaciones. Los gusanos incubados con el control, el *sap*-sano y el TSWV-*sap* ofrecieron resultados similares los primeros días y apenas se apreció una ligera diferencia del 7% entre TSWV semipurificado y el resto de tratamientos en los días 2 y 3. Observando las mínimas diferencias entre tratamientos y siendo conocedores del fuerte sistema antiviral de esta cepa, dicha cepa fue descartada en ensayos posteriores.

Ante los resultados obtenidos con N2, se decidió repetir ensayos similares con las dos cepas de gusano deficientes en su sistema de defensa.

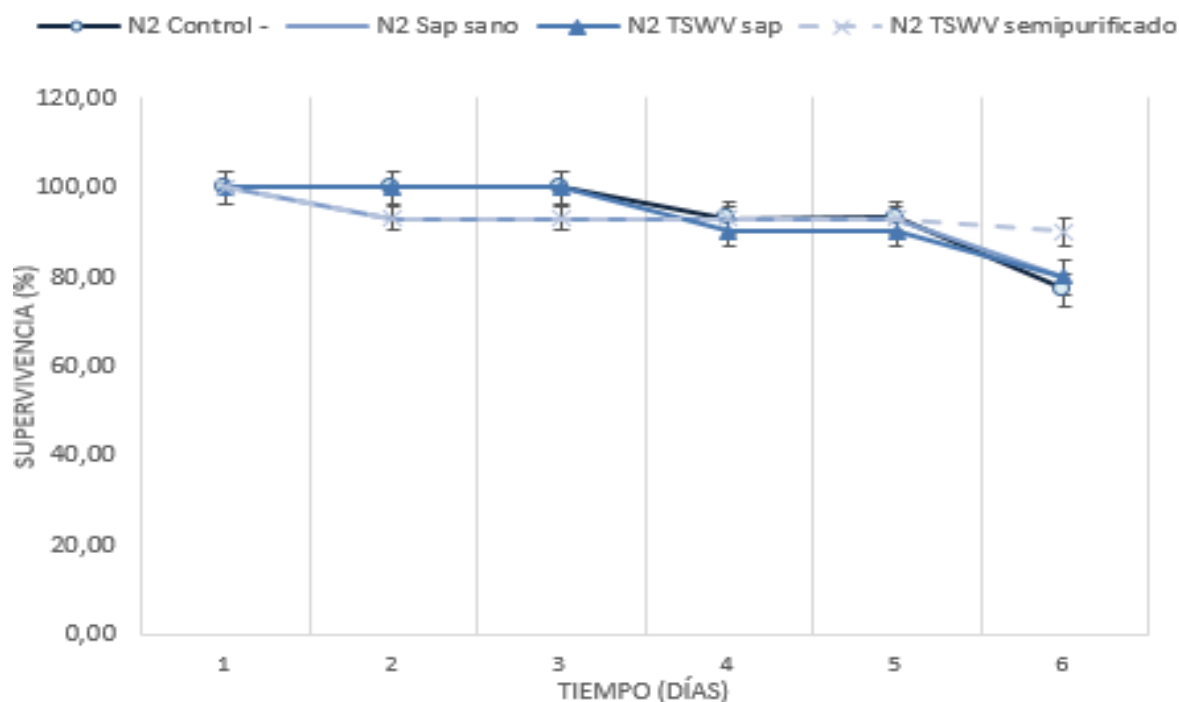


Fig. 27. Evaluación de la influencia de las incubaciones con diferentes inóculos vegetales y/o virales en la esperanza de vida de 30 individuos de la cepa N2. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

La cepa JU1580 (Fig. 28) mostró diferencias evidentes de supervivencia tras la incubación con los distintos *sap* (TSWV-*sap* vs TSWV-semipurificado vs *sap*-sano). Gusanos incubados con el *sap*-sano mostraron unos porcentajes de supervivencia similares a los incubados con el control (93% en el segundo día tanto en el control como en el *sap*) que se mantuvieron de forma parecida a lo largo del tiempo (47% de supervivencia en el control y un 53% en el *sap*-sano al sexto día). Esos resultados se parecieron a los observados en los gusanos incubados con TSWV semipurificado.

Sin embargo, el tratamiento con TSWV-*sap* mostró una incidencia negativa en la supervivencia de estos nematodos, provocando unas diferencias de alrededor de un 20% con el *sap*-sano.

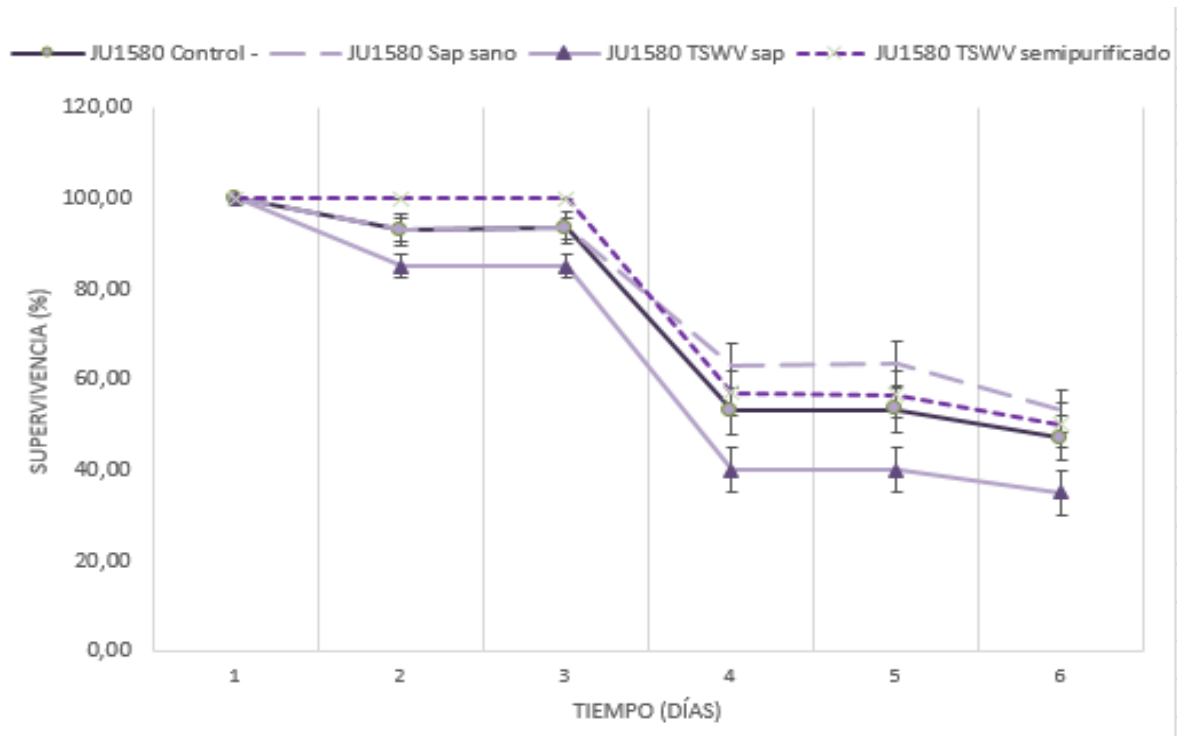


Fig. 28. Evaluación de la influencia de las incubaciones con diversos tratamientos en la esperanza de vida de 30 individuos de la cepa JU1580. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

El descenso diferencial observado en la supervivencia de los gusanos JU1580 tratados con el inóculo TSWV-*sap*, hacía de esta cepa una buena opción para profundizar los análisis. Sin embargo, durante su evaluación esta cepa mutante mostró un desarrollo anómalo, provocando que su manejo en el laboratorio fuese muy complejo, ya que tenía una morfología atípica que hacía muy difícil distinguir bien los adultos de los miembros juveniles. Por ello, aunque podría tratarse de una cepa interesante para su estudio, se decidió descartar su uso en este trabajo por el momento.

En un ensayo similar utilizando la cepa RB219 (Fig. 29) se observó un efecto negativo en la supervivencia de los gusanos incubando con ambos tratamientos de TSWV (*sap* y semipurificado viral). Al igual que en lo observado con la cepa JU1580, el mayor descenso en la supervivencia se observó al cuarto día. Las diferencias en ese momento de tiempo entre el control (87%) y el TSWV-*sap* (73'33%) fueron evidentes. En la comparación entre el TSWV-*sap* y su control, *sap*-sano, las diferencias eran más reducidas: de tan sólo un 7%. Sin embargo, en ese mismo día 4 el tratamiento de los gusanos con TSWV semipurificado provocó una bajada de supervivencia hasta el 63%. Estos resultados sugerían un posible efecto de la inoculación de TSWV en esta cepa. Además, al observar la posible mayor incidencia del semipurificado sobre la supervivencia, se decidió seguir testando su uso, esta vez empleando en los próximos ensayos un control sano para el semipurificado.

El desarrollo morfológico de la cepa RB2519, a pesar de ser una cepa mutante, se asemejó al de la cepa silvestre N2. Esto facilitó la experimentación, por lo que esta cepa fue la ideal para profundizar en la investigación.

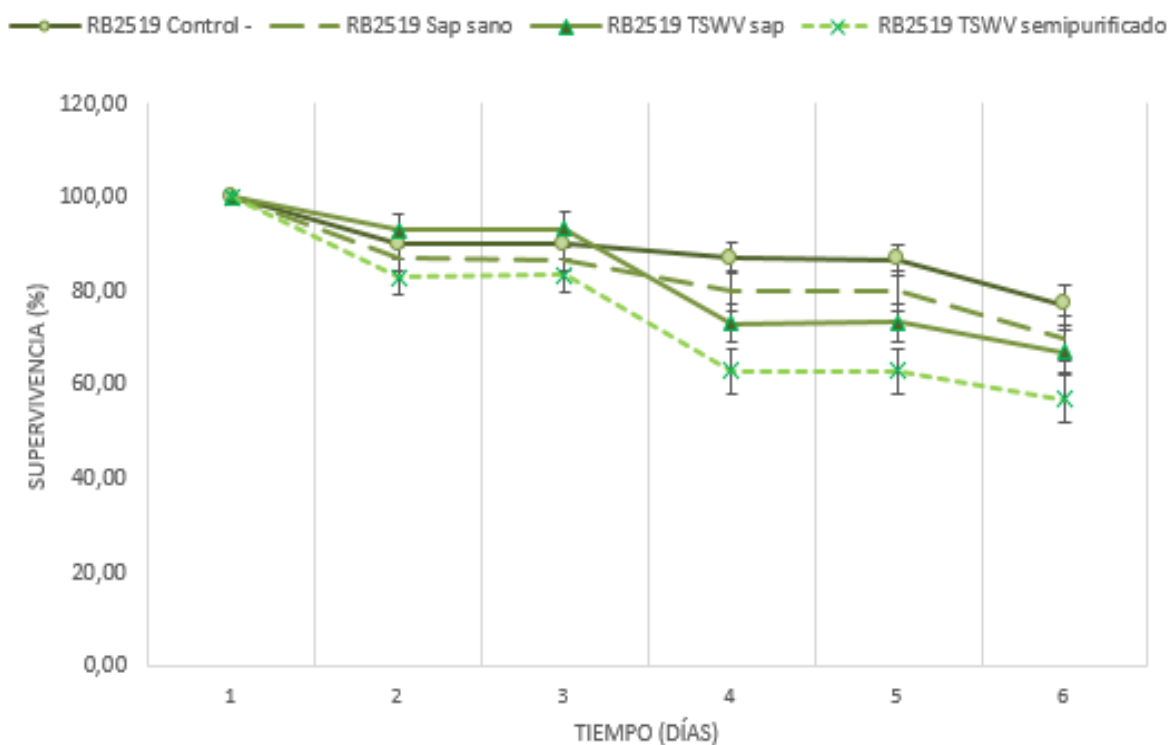


Fig. 29. Evaluación de la influencia de las incubaciones con diversos tratamientos en la esperanza de vida de 30 individuos de la cepa JU1580. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

4.4.2 Evaluación de la esperanza de vida de la cepa *C. elegans* RB2519 inoculada con TSWV

Una vez seleccionada la cepa RB2519 como la más indicada para su evaluación, se procedió a valorar el efecto de los tratamientos de TSWV en su esperanza de vida. A partir de este momento se trabajó con 100 gusanos de partida por condición, salvo indicación contraria.

En el primer ensayo de esperanza de vida (Fig. 30 se observó como la inoculación con tratamiento, tanto de extracto *sap* como semipurificado viral, causó un descenso en la supervivencia frente a los gusanos incubados con el inóculo control, sea ésta una inoculación con tejido sano o tejido con TSWV. Sin embargo, pudieron observarse diferencias entre las condiciones TSWV y sano, tanto en el inóculo *sap* como en el de semipurificado. De entre los dos tipos de inóculos, fue el de *sap* el que mostró diferencias más claras entre tratamiento sano (63% de supervivencia tras 24 horas) y conteniendo TSWV (45% de supervivencia tras 24 horas). Estas diferencias fueron constantes a lo largo de los días que duró la evaluación la esperanza de vida.

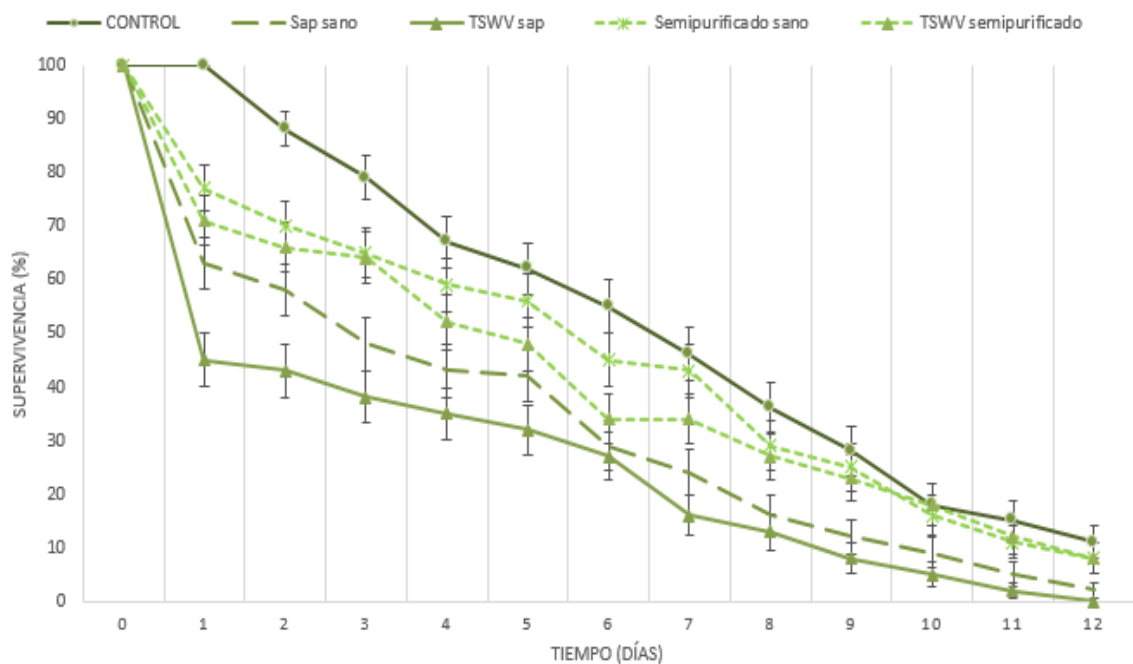


Fig. 30. Evaluación de la influencia de los tratamientos en la esperanza de vida de 100 individuos de la cepa RB2519. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

En la supervivencia de los gusanos incubados con el semipurificado, las diferencias fueron menores: a pesar de tener el inóculo de TSWV un mayor efecto negativo en la supervivencia que el inóculo sano, las diferencias entre éstos sólo fueron significativas en el día 6, cuando los gusanos incubados con TSWV semipurificado redujeron su supervivencia al 34% frente al 45% de su control. Cabe destacar que en todos los ensayos realizados con los nematodos RB2519 incubando con estos tratamientos, las tendencias en la supervivencia de los gusanos se mantuvieron.

La elaboración del semipurificado además de ser costosa en términos de tiempo y recursos, empezó a no resultar exitosa y su infectividad en *N. benthamiana* no era muy eficiente y reproducible. Está descrito que los viriones purificados de TSWV son bastante lábiles. Esto unido a los resultados observados en la primera evaluación de la esperanza de vida, llevaron al descarte de los tratamientos de los gusanos con el inóculo de semipurificado viral. Así, los tratamientos estudiados a partir de ahora se focalizaron en los inóculos de TSWV-*sap* y *sap*-sano. A partir de este ensayo es cuando el TSWV-*sap* se elaboró justo antes de su inoculación. Descartado el uso del semipurificado y teniendo la posibilidad así de evaluar otras condiciones, se procedió a introducir de nuevo la cepa N2 a modo de control en los ensayos (Fig. 31).

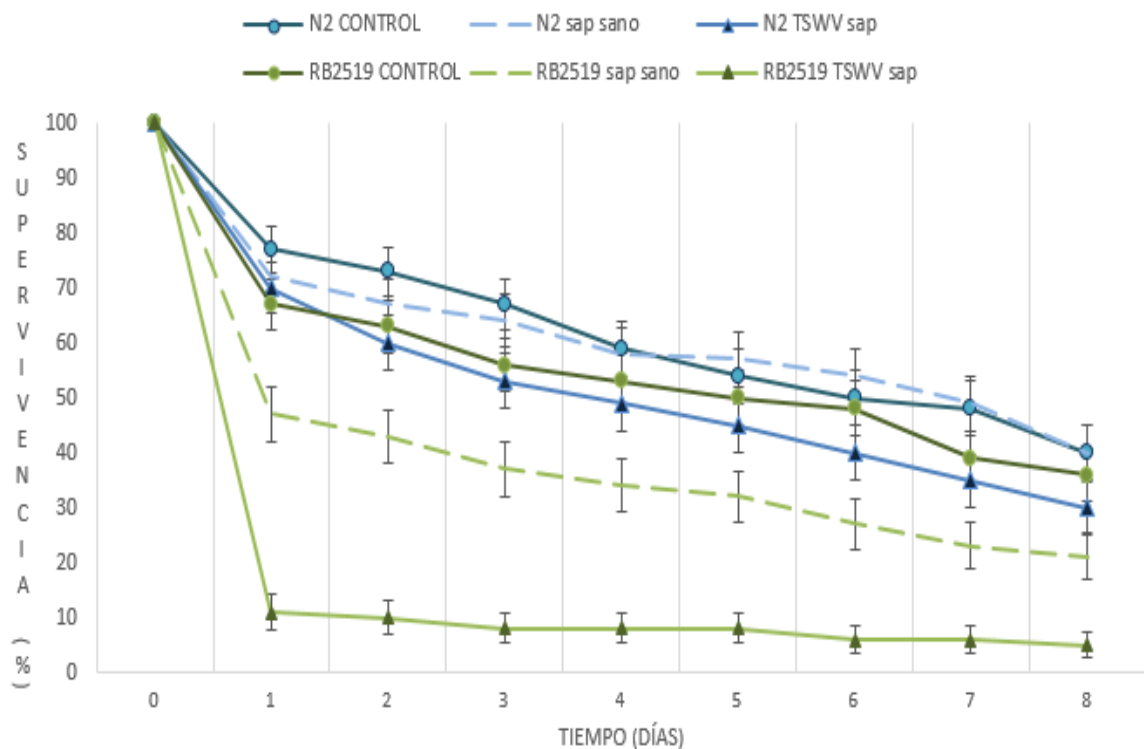


Fig. 31. Evaluación de la influencia de los tratamientos en la esperanza de vida de 100 individuos de las cepas RB2519 y N2. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

En esta evaluación de la esperanza de vida, la cepa N2 mostró, a lo largo del tiempo, ligeras diferencias de supervivencia entre las inoculaciones con *sap*-sano y TSWV. En los primeros días de evaluación, no se observaron estas diferencias. Sin embargo, en el día 6 se pudo observar una diferencia en el efecto causado en la supervivencia de los gusanos N2 inducida por el tratamiento con TSWV-*sap* (40%) frente al de *sap*-sano (54%). Estas diferencias entre ambos tipos de *sap*, fueron sustancialmente mayores en el caso de los gusanos de la cepa RB2519. La influencia del inóculo TSWV-*sap* en la disminución de la supervivencia, se apreció de forma muy clara tras las 24 h de inoculación (día 1). Las

diferencias entre los diversos tratamientos se observaron claramente tras estas 24 h y se mantuvieron constantes a lo largo de la medición de la esperanza de vida: en el día 6 el control de RB2519 mostró un 36% de supervivencia frente al 21% mostrado en las incubaciones con *sap*-sano o el 5% de TSWV-*sap*.

4.4.3 Evaluación de supervivencia tras 24 horas

Como puede observarse en el primer ensayo de esperanza de vida realizado, las diferencias en la supervivencia de los gusanos se observaron ya tras el periodo de 24 h de inoculación (Fig. 32), tanto con *sap* como con el semipurificado, entre las condiciones TSWV y sano. Este hecho se repite en el segundo ensayo realizado: las diferencias observadas en el día 1 se mantienen constantes a lo largo del ensayo.

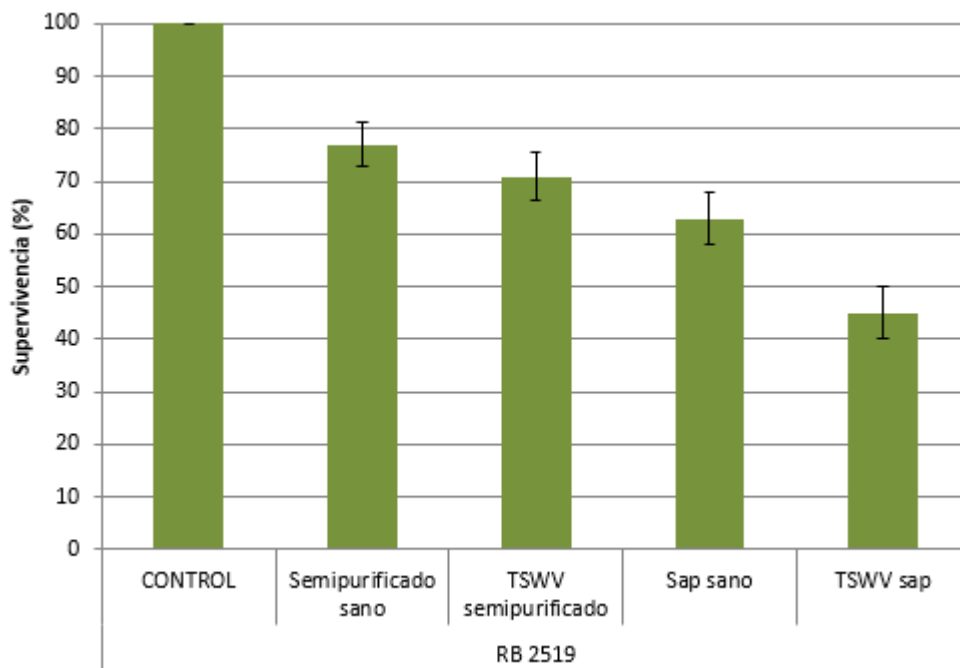


Fig. 32. Evaluación de la influencia de los tratamientos en la supervivencia tras 24 h en individuos de la cepa RB2519. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Por ello, para evaluar el efecto de los diversos tratamientos en los gusanos RB2519, se centraron los ensayos en el efecto de las condiciones sobre la supervivencia tras 24 h. De esta forma se realizaron tres ensayos (Fig. 33) estudiando los efectos de incubación de gusanos de las cepas N2 (como control) y RB2519 con los inóculos *sap* sano y TSWV *sap*.

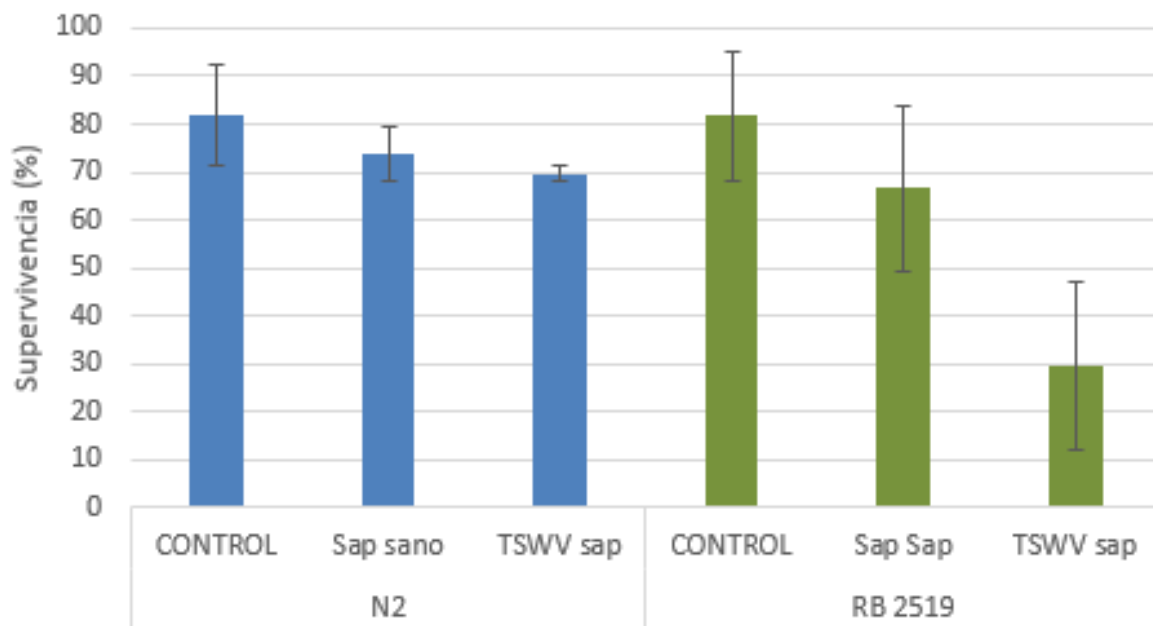


Fig. 33. Resultado de la supervivencia de la cepa mutante RB2519 y la cepa silvestre N2 tras 24 h de incubación con los diversos tratamientos estudiados. Media de tres inter-ensayos. Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Analizando la supervivencia promedio de los nematodos a lo largo de los tres ensayos, se observó como en la cepa control N2 las diferencias en la supervivencia no eran significativas entre los tratamientos realizados (82% control vs 74% *sap-sano* vs 70% TSWV-*sap*).

En la cepa mutante RB2519 se apreció un descenso de la supervivencia en el tratamiento con TSWV-*sap* (29%) frente al mismo tratamiento realizado con *sap-sano* (67%) o con el control (82%). En este caso las diferencias entre los tratamientos sí mostraron diferencias significativas cuando fueron evaluados empleando la prueba exacta de Fisher ($P < 0,05$).

4.5 Evaluación molecular de la posible replicación de TSWV en *C. elegans*

4.5.1 Optimización de las extracciones de RNAt a partir de *C. elegans*

Para poder cuantificar el número de partículas virales en una muestra, previamente es necesario realizar una extracción de RNAt. En este trabajo fue necesaria la puesta a punto de la extracción de RNAt del nematodo *C. elegans*.

Lograr extraer una buena cantidad de RNAt de *C. elegans* requiere manipular y disponer de una cantidad elevada de gusanos. En nuestros ensayos (ver más adelante) los gusanos eran muy complejos de manejar, y su incubación con extractos virales añadía suciedad a las

muestras en las que los gusanos se encontraban, procedente de los restos vegetales. Debido a estas circunstancias, fue necesario comprobar varios protocolos de extracción, con diversas optimizaciones para hallar el más apropiado para nuestros experimentos.

En todos los protocolos de extracción comprobados fue necesario primero eliminar la gruesa y fuerte cutícula del nematodo para poder extraer el material genético del mismo. Dos métodos mecánicos fueron comprobados en este trabajo: sonicación y rotura por choque térmico. Ésta segunda implica largos procesos de congelación-descongelación y agitación violenta con un vortex para romper la cutícula. Después de varios ensayos sin obtener un rendimiento aceptable utilizando sonicación, se decidió emplear la rotura con choque térmico.

En cuanto a la extracción y purificación de RNAt del nematodo, el protocolo de extracción manual utilizando Ribozol, fue el que mejores resultados nos dio. Al partir de un número reducido de gusanos de los que obtener una cantidad razonable de RNAt, se realizaron dos extracciones con cloroformo y se adicionó glicógeno en el paso de precipitación final, lo que resultó clave.

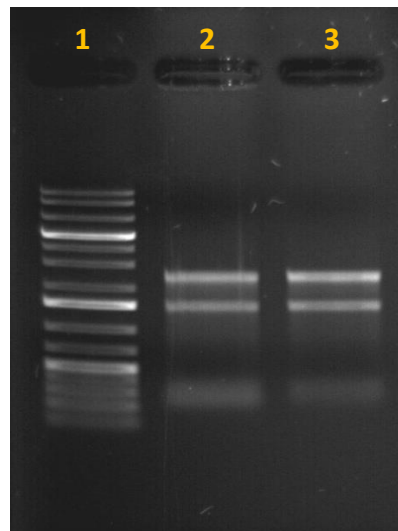


Fig. 34. Gel de agarosa 1%, TAE x 1. Se observa el RNAt (rRNAs) purificado a partir de ≈ 100 gusanos (2) y de ≈ 200 gusanos (3) junto al marcador 1 Kb Plus (Fisher).

Con la rotura por choque térmico y el protocolo de extracción indicado, se consiguió una cantidad reducida pero suficiente de RNAt, entre 60 y 200 ng/ μ l. Al correr este RNA en geles de agarosa se observó la ausencia de DNA genómico y la presencia de las bandas de los principales rRNAs (Fig. 34), por lo que a pesar de no disponer de una elevada cantidad de RNA, la preservación de éste era buena.

4.5.2 Cuantificación de TSWV en *C. elegans*: ¿replicación viral?

Una vez obtenido el RNAt de las muestras tomadas a lo largo de 24 h, en éstas se cuantificaron de forma absoluta las partículas virales mediante qRT-PCR (Tabla 4 y Fig. 35).

Tabla 6. Resultados de las cuantificaciones de TSWV mediante qRT-PCR en muestras tomadas a lo largo de 24 h. Las dos primeras columnas indican el nombre de cada muestra junto a la abreviatura empleada para identificarlas en la Fig. 35. Los datos se muestran en número de moléculas de TSWV /ng RNAt junto a su desviación estándar (SD). En la última columna se indican los datos de cuantificación (número de moléculas de TSWV /ng RNAt) normalizados respecto al dato obtenido en TSWV sap T1.

Muestra	Abreviatura	Tiempo de muestreo	Cuantificación	SD	Normalizado a TSWV sap T1
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T1	1W	0,5 h	3.138.896,10	245.146,84	1.166.152,48
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T2	2W	2,5 h	3.103.814,12	260.907,81	1.131.070,50
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T3	3W	5 h	2.188.593,48	575.387,87	215.849,86
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T4	4W	7,5 h	3.500.195,38	199.376,19	1.527.451,76
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T5	5W	10 h	2.216.803,08	33.073,22	244.059,46
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T6	6W	12,5 h	1.690.254,38	222.637,03	-282.489,24
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T7	7W	20,5 h	1.831.668,33	240.901,43	-141.075,29
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T8	8W	22,5 h	1.073.623,05	199.097,46	-899.120,56
<i>C. elegans</i> + TSWV sap T9	9W	24 h	2.357.503,44	64.850,07	384.759,82
TSWV sap T1	1	0,5 h	1.972.743,62	111.169,45	0,00
TSWV sap T2	2	2,5 h	2.379.529,54	247.502,22	406.785,92
TSWV sap T3	3	5 h	2.531.586,67	135.280,45	558.843,05
TSWV sap T4	4	7,5 h	1.573.320,94	218.724,02	-399.422,68
TSWV sap T5	5	10 h	2.285.250,03	202.052,28	312.506,41
TSWV sap T6	6	12,5 h	1.440.768,99	164.993,44	-531.974,63
TSWV sap T7	7	20,5 h	1.350.093,16	111.974,39	-622.650,46
TSWV sap T8	8	22,5 h	2.715.612,00	646.439,77	742.868,38
TSWV sap T9	9	24 h	1.028.486,27	98.870,41	-944.257,34
<i>C.elegans</i>	Nematodo	-	2,19	0,01	-1.972.741,43
RNAt TSWV	TSWV Nb	-	1.474.986,01	104.812,22	-497.757,61

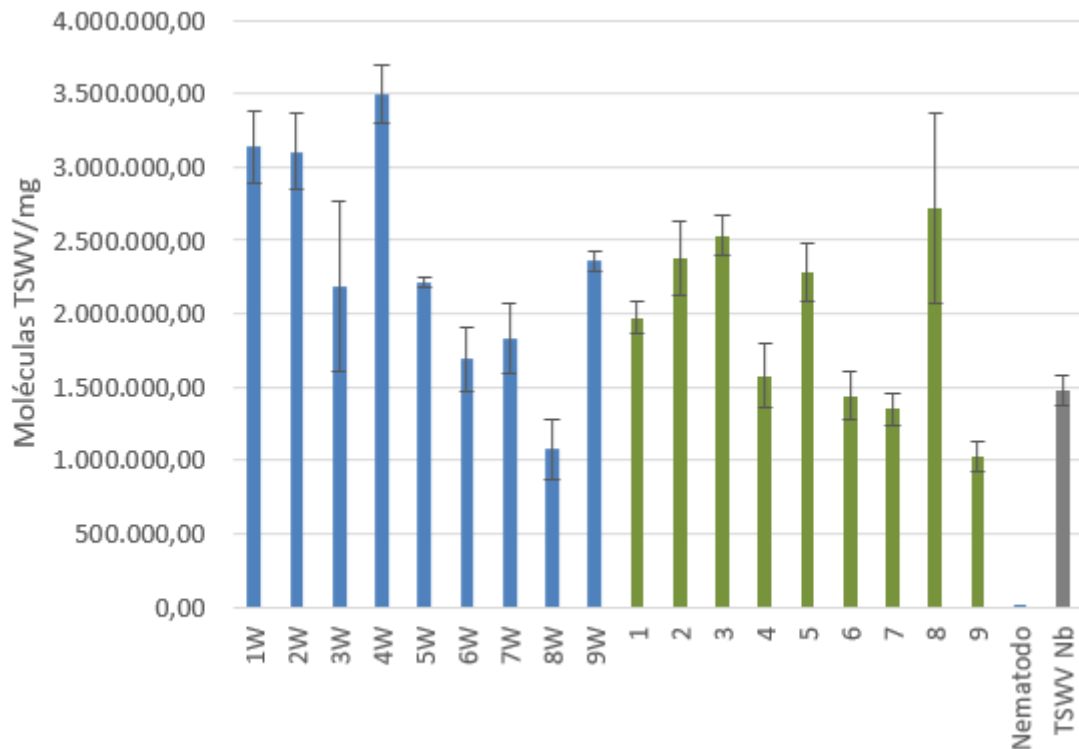


Fig. 35. Resultados de las cuantificaciones de TSWV en las muestras de *C. elegans* + *sap* (en azul, desde T1 a T9), en *sap* (en verde, desde T1 a T9), en muestras de *C. elegans* y en una extracción (en gris) de RNAt del material vegetal empleado en las inoculaciones (TSWV Nb). Las barras de error representan \pm desviación estándar (SD).

Los datos obtenidos muestran una detección de TSWV en las muestras en un rango que oscila entre 1 y $3,5 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng de RNAt. Esta detección se da en todas menos en la muestra control, que contenía solamente nematodos, en la cual no se amplificó el virus ($2 \pm 0,01$ moléculas de TSWV/ng). En el control positivo con tejido de *N. benthamiana* (Nb) infectado con TSWV se detectaron $1,47 \pm 0,10 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng de RNAt

Las muestras de *C. elegans* incubados con TSWV-*sap* sufrieron un descenso en la cantidad de moléculas de TSWV/ng detectadas desde 0,5 h hasta 5 h sufriendo un repunte tras 7,5 h donde se alcanza un valor máximo de $3,5 \pm 0,19 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng. A partir de ese momento la cantidad de moléculas vuelve a descender hasta tener otro ligero repunte tras las 24 h, con $2,3 \pm 0,06 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng. En los mismos tiempos la tendencia en el *sap* sin gusano se mostró contraria o con valores de acumulación de dos a tres veces inferiores. Las muestras de TSWV-*sap* mostraron su máximo a 5 h con $2,5 \pm 0,13 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng.

Al comparar los valores Ct en las gráficas de la cuantitativa (Fig. 36), podemos observar cómo la detección de TSWV de las muestras que contenían solo *C. elegans* sanos, se mantuvieron a niveles del NVC de planta sana. Además, los valores de las muestras problema gusano-*sap* (W) o sólo *sap*, quedaban dentro del rango de detección cubierto por

la curva estándar (panel A), siendo éste entre la dilución SC2 y la SC3. En el panel B se observa cómo la cantidad de TSWV detectado en dichas muestras oscila entre 1×10^8 moléculas de TSWV/ng RNAt y 2×10^7 moléculas de TSWV/ng RNAt. Las curvas de fusión de ambos tipos de productos, corroboran que el amplicón obtenido es muy específico, detectando únicamente TSWV en las muestras de gusano.

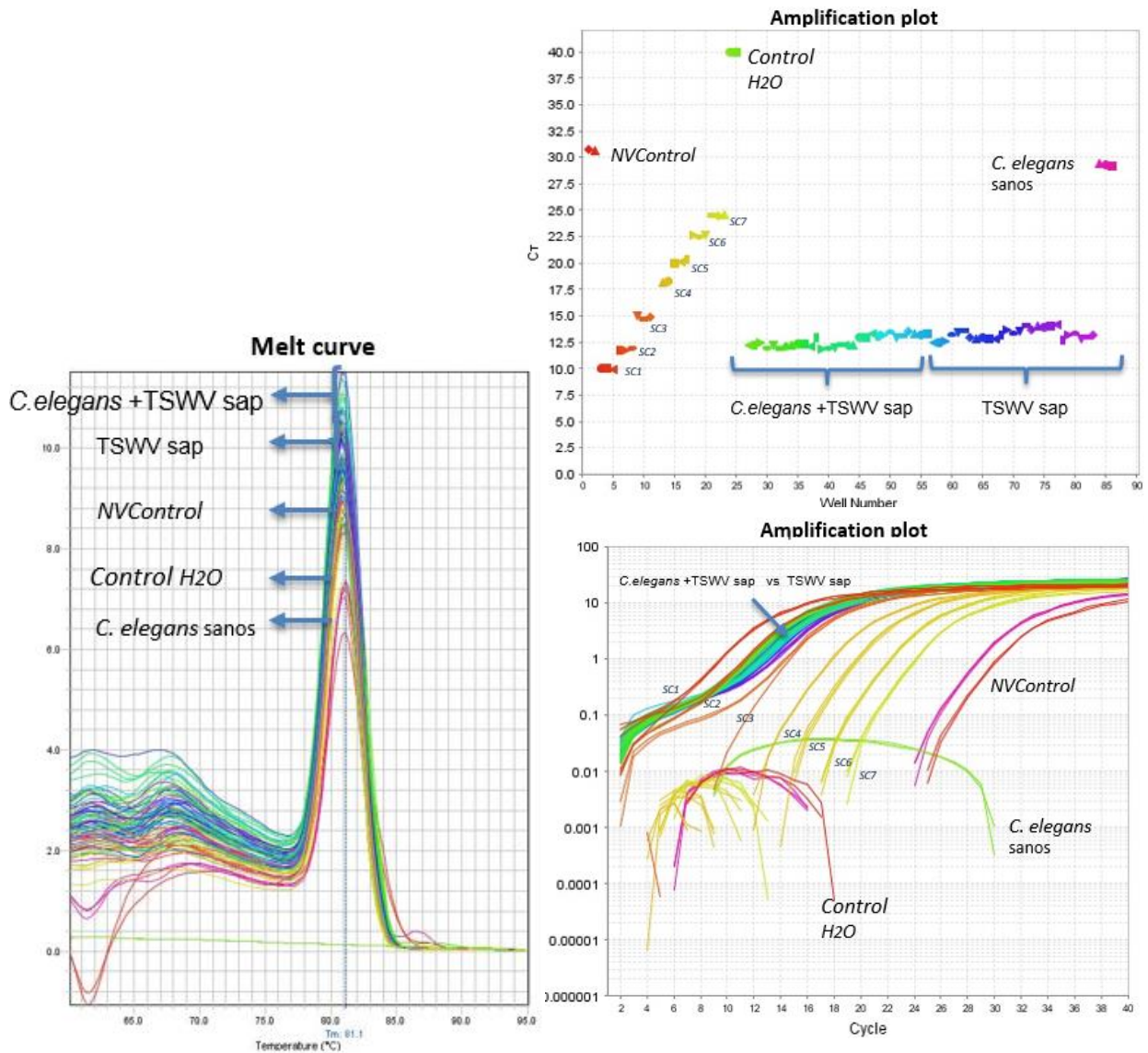


Fig. 36. Datos obtenidos de la qRT-PCR. Panel superior: a la izquierda podemos observar los rangos de valores C_T de las muestras problema cubiertas por la curva estándar; a la derecha las curvas de amplificación. Panel inferior: productos de las curvas de fusión y T_m .

En algunos tiempos se observaron valores anómalos. Estos valores podrían explicarse por la suciedad que, a pesar de las optimizaciones llevadas a cabo, mostraron las extracciones. Además, debe tenerse en cuenta que la cuantificación es absoluta y es posible que se hayan arrastrado inhibidores de la extacción a la qRT-PCR. De entre estos valores anómalos, la muestra que más se distanció de la tendencia mostrada por el resto de su serie fue 5 h en *C. elegans* +TSWV-*sap*, con $2,1 \pm 0,57 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng RNAt. En TSWV-*sap* se observó una anomalía en 22,5 h con $2,7 \pm 0,64 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng RNAt. Cabe destacar que justo en estas dos medidas es donde la SD es mayor, con valores de 0,57 y 0,64 x 10⁶ cuando el resto de valores SD oscila entre 0,03 y 0,26 x 10⁶.

Con el fin de poder comparar de una forma más apropiada las muestras de *C. elegans* incubados con TSWV-*sap* con las muestras TSWV-*sap* se procedió a normalizar los datos en función de los datos de muestra TSWV-*sap* a tiempo 0,5 h, que eran los datos de la primera muestra tomada del periodo de inoculación. Los datos de esta normalización pueden verse en la Tabla 6 y están representados en la Fig. 37. En los datos normalizados podemos ver cómo, exceptuando los valores anómalos anteriormente comentados (5 y 22,5 h), los valores de *C. elegans* incubados con TSWV-*sap* son siempre mayores a los de TSWV-*sap*, sugiriendo ésto una posible replicación de TSWV dentro del gusano que resulte en una mayor cantidad de moléculas virales detectadas, o una protección de los genomas virales en presencia del gusano.

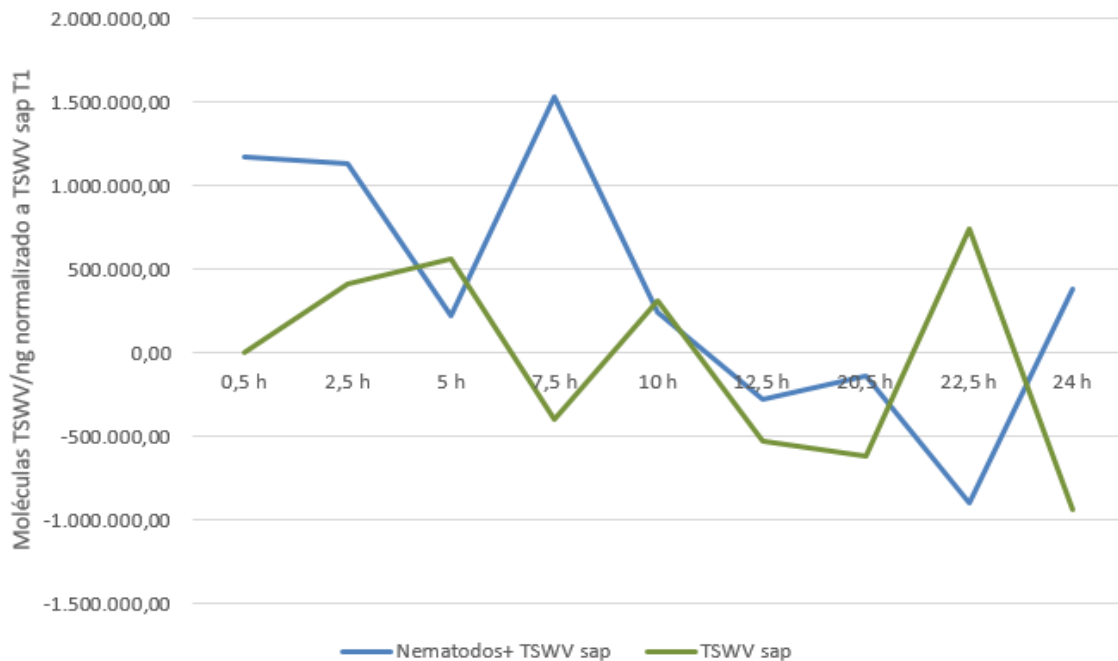


Fig. 37. Resultados de las cuantificaciones de TSWV normalizado al valor de acumulación observado para TSWV-*sap* a las 0.5 h. Se muestran los datos de *C. elegans* + TSWV *sap* (en azul) y en *sap* (en verde) a lo largo de 24 horas.

La normalización de los datos obtenidos es un paso importante a la hora de analizar los mismos. En los estudios de infección de trips con TSWV, la acumulación de éste se suele realizar de forma relativa empleando un gen de expresión constitutiva como el gen de actina del trip para minimizar el posible efecto de los inhibidores en la qRT-PCR. De realizar estudios adicionales con el nematodo, sería conveniente investigar la posibilidad de realizar la normalización respecto a uno o más genes constitutivos de *C. elegans*. Los datos obtenidos de las muestras a lo largo de 24 h, unidos al efecto negativo del virus fitopatógeno TSWV en la supervivencia de *C. elegans*, sugieren una posible infección del virus en los nematodos de cepas mutantes cuyo sistema de defensa RNAi está comprometido.

Es importante señalar que este estudio fue realizado a lo largo de 24 h, puesto que los datos obtenidos en los ensayos exploratorios nos indicaban que este primer periodo de 24 h era en el que mayor mortalidad se producía (Fig. 30). Sin embargo, no debe descartarse que la replicación y acumulación en el gusano pueda producirse en otro periodo de tiempo: basta recordar la mayor mortalidad a día 6 causada por el inóculo con TSWV en los ensayos de esperanza de vida (Fig. 30 y Fig. 31). Sería interesante evaluar la replicación a distintos tiempos, más allá de las 24 h, con el fin de conocer qué está sucediendo. En el trip (su vector animal natural) el periodo de adquisición (el equivalente a nuestro periodo de incubación) es un factor que provoca diferencias en los valores de incidencia del virus (Ullman et al. 1992).

Además del periodo de incubación, en la infección de TSWV en trip (su vector animal natural) también resulta fundamental el estado de desarrollo del insecto. La importancia de este factor es tal que en *F. occidentalis* la adquisición del virus está restringida al primer y segundo estadio larvario (Margari et al. 2014), acumulándose el virus en estos estadios mientras que en adultos la acumulación es muy baja. La importancia del estadio larvario en el insecto parece ser clave también en el caso de *C. elegans*. Como modelo infeccioso de hongos y bacterias *C. elegans* ha mostrado una mayor receptividad a la infección en estados larvarios, demostrándose diferencias en el éxito infectivo incluso entre las propias cuatro fases larvarias (Sun 2015), aunque su efecto sobre la replicación y acumulación viral no ha sido estudiado.

Otro factor que influye en el éxito de replicación en trips es su sexo, mostrando valores de acumulación entre $2,76 \times 10^5$ a $1,40 \times 10^7$ moléculas de TSWV/ng en hembras y entre $6,7 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^6$ en machos (Rotenberg et al. 2009). Estas cuantificaciones en trips están dentro del rango de moléculas detectadas, a lo largo del trabajo, en los nematodos de la cepa mutante RB2519: siendo de 1 a $3,5 \times 10^6$ moléculas de TSWV/ng de RNAt, un dato que resulta muy interesante. Sería interesante realizar el mismo ensayo a lo largo de 24 h con la cepa silvestre N2 con el fin de observar si se produce una amplificación del virus en dichos nematodos y, de ser así, en que rango se encuentra. En el trabajo de Félix et al.

(2011) en el que se describe una infección vírica en JU1580, la replicación en dicha cepa proporciona valores de acumulación entre 50 y 100 veces superiores a los de N2.

Como se ha explicado a lo largo del trabajo, son numerosos los factores que pueden favorecer o limitar el éxito infeccioso de TSWV. Aún es desconocido el por qué en trips algunos individuos de la misma cohorte expuestos a condiciones similares expresan una carga viral distinta entre ellos (Rotenberg et al. 2009). Con el avance técnico y la cantidad de recursos disponibles para *C. elegans* resultaría posible la inoculación con TSWV y posterior estudio de grandes sumas de nematodos a nivel individual. El empleo de maquinaria de última generación (como el WorMotel que próximamente Biopolis dispondrá en funcionamiento) permitiría realizar un seguimiento de la esperanza de vida individual y con mayor toma de datos, conociendo así con mayor detalle los efectos causados por el virus en el gusano. Perfeccionando la obtención de RNA, también podríamos conocer si esta diferencia de carga viral entre individuos está sucediendo también en *C. elegans*. Además, también nos permitiría evaluar el porcentaje de gusanos infectados sobre el total y la persistencia de este porcentaje de gusanos portando el virus a lo largo del tiempo. En trips se sabe que el porcentaje de individuos que retienen el virus desciende drásticamente tras dejar de estar en contacto con él (Ullman et al. 1992).

Los resultados obtenidos en este trabajo son fruto de una investigación realizada con el fin de explorar las posibles condiciones en las que una infección viral en el nematodo pudiese ser factible. La escasa información sobre infecciones virales en *C. elegans*, que es un organismo modelo, y la necesidad de optimizar la mayoría de los protocolos a este nuevo modelo virus-huésped, hacen de los datos obtenidos de este trabajo una base muy interesante para futuros proyectos. En todo caso, para confirmar de forma definitiva la infección y replicación es necesario realizar (siguiendo las pautas ya establecidas en esta investigación) ensayos adicionales con sus respectivas pruebas moleculares.

La capacidad de TSWV de infectar con éxito *C. elegans* abre una amplia gama de posibilidades para el estudio de las interacciones huésped-virus: (i) la evolución del rango de huéspedes en los virus de ARN, (ii) el establecimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en esta interacción huésped-virus y (iii) la interacción entre la infección viral y la diferenciación celular y el desarrollo del organismo, entre muchos otros.

5. CONCLUSIONES

- Para investigar la posible infección de *C. elegans* con TSWV, se realizaron un conjunto de optimizaciones imprescindibles. Se desarrolló un protocolo de inoculación eficiente del virus en los huéspedes vegetales *N. benthamiana* y pimiento, consiguiendo ensayos reproducibles y sensibles en cabinas de invernadero. Se maximizó la tasa infectiva en la primera especie determinando el inóculo viral más eficiente y consiguiendo un *stock* viral de referencia.
- Se puso a punto la cuantificación absoluta de TSWV. Para ello, se optimizaron: las condiciones de extracción de RNAt de las muestras de *C. elegans*, estableciendo la extracción por choque térmico y la purificación manual con Ribozol como la metodología más eficiente y, la técnica de qRT-PCR. Esto permitió disponer de una técnica eficaz, específica y sensible, que permitía de detectar el virus en un rango comprendido entre las 5×10^8 y las 256 moléculas de TSWV.
- Se estableció el *sap* viral, preparado justo antes de la inoculación, como el mejor inóculo en los ensayos con *C. elegans*, siendo seleccionada la cepa RB2519, mutante en el mecanismo de de defensa basado en RNAi, como la más adecuada para evaluar la infección. Se establecieron los parámetros supervivencia y esperanza de vida de los gusanos a lo largo del tiempo de su incubación con diversos inóculos, como los más eficaces. Se determinó que los tamaños poblacionales mínimos de gusanos por tratamiento a evaluar debían ser al menos de 50 a 100, ya que cantidades inferiores no proporcionaban la robustez estadística necesaria.
- La inoculación de gusanos de la cepa mutante RB2519 con un extracto vegetal infectado con TSWV durante 24 h, provocó un descenso en la esperanza de vida y supervivencia de éstos. Este efecto negativo no se observó en bioensayos paralelos con la cepa silvestre N2. A lo largo de dicho periodo de inoculación, las cantidades de partículas virales detectadas en gusanos de la cepa RB2519 incubados con extractos de TSWV, eran significativamente mayores que en extractos equivalentes conteniendo sólo TSWV.
- En este trabajo se demuestra que el empleo de la cepa mutante RB2519 de *C. elegans*, deficiente en la maquinaria de silenciamiento génico, resulta imprescindible para el estudio de posibles infecciones virales.
- Todos estos resultados sugieren que el arbovirus TSWV podría infectar y replicarse en *C. elegans*, y muestran el potencial del patosistema TSWV-*C. elegans* para abordar futuros estudios de interacción virus-huésped.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adkins S. (2000). Tomato spotted wilt virus—positive steps towards negative success. *Molecular Plant Patholog.* 1: 151–157.
- Altun ZF and Hall DH. (2012). Handbook of *C. elegans* Anatomy. In WormAtlas. <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm>
- Aramburu J and Martí M. (2003). The occurrence in north–east Spain of a variant of Tomato spotted wilt virus (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the Sw-5 gene. *Plant Pathology.* 52: 407.
- Aramburu J, Galipienso L, Soler S and López C. (2007). La enfermedad del bronceado en tomate y pimiento: Un problema permanente en una situación cambiante. *Phytoma España.* 194: 24-29.
- Ashe A, Belicard T, Le Pen J, Sarkies P, Frezal L, et al. (2013). A deletion polymorphism in the *Caenorhabditis elegans* RIG-I homolog disables viral RNA dicing and antiviral immunity. *eLife.* 2: e00994.
- Brittlebank CC. (1919). Tomato diseases. *The Journal of the Department of Agriculture, Victoria.* 17: 231-235.
- Diogo J and Bratanich A. (2014). The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. *Archives of Virology.* 159: 2843–2851.
- Domingo E. (2002). Quasispecies Theory in Virology. *Journal of Virology.* 76: 463–465
- España. Real Decreto 1201/2005, de 21 de octubre de 2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Boletín Oficial del Estado*, de 21 de octubre de 2005, núm. 252, pp 34367 a 34391.
- Félix MA and Braendle C. (2010). The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology.* 20: 965-969.
- Félix MA, Ashe A, Piffaretti J, et al. (2011). Natural and experimental infection of *Caenorhabditis nematodes* by novel viruses related to nodaviruses. *PLoS Biology.* 9: 1-14.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM, and Griffin DE. (2001). *Fields virology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Fielenbach N and Antebi A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes and Development.* 22(16): 2149–2165.

- Franz CJ, Renshaw H, Frezal L, Jiang Y, Félix MA, et al. (2014). Orsay, Santeuil and Le Blanc viruses primarily infect intestinal cells in *Caenorhabditis nematodes*. *Virology*. 448: 255–264.
- Franz CJ, Zhao G, Félix MA and Wang D. (2012). Complete genome sequence of Le Blanc virus, a third *Caenorhabditis nematode*-infecting virus. *Journal of Virology*. 86: 11940.
- Frézal L and Félix MA. (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife*, 4, e05849.
- Harris TW, Baran J, Bieri T, Cabunoc A, Chan J and Chen WJ. (2013). WormBase 2014: new views of curated biology. *Nucleic Acids Research*. 42: 789–93.
- He F. (2011). Total RNA Extraction from *C. elegans*. *Bio-protocol*
- Hull R. (2011). *Comparative Plant Virology*. California: Elsevier Academic Press.
- Irazoqui JE, Urbach JM and Ausubel FM. (2010). Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nature Reviews Immunology*. 10: 47–58.
- Koike ST, Gladdens P and Paulus AO. (2007). *Vegetable diseases: a color handbook*. San Diego: Academic Press. 323 p.
- Krulko I, Ustyanenko D and Polischuk V. (2009). Role of siRNAs and miRNAs in the processes of RNA-mediated gene silencing during viral infections. *Cytology and Genetics*. 43: 63.
- Kumar J, Park KC, Awasthi A and Prasad B. (2015). Silymarin extends lifespan and reduces proteotoxicity in *C. elegans* Alzheimer's model. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 14(2): 295-302.
- Lamberti F. and Roca F. (1987). Present status of nematodes as vectors of plant viruses. Pp 321-328 in *Vistas on Nematology* (J. A. Veech and D. W Dickson, Eds). Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland. 509 p.
- Lewis JA and Fleming JT. (1995). Basic culture methods. In *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism*, pp. 3–29. Edited by H. F. Epstein & D. C. Shakes. New York: Academic Press.
- López C, Aramburu J, Galipienso L, Soler S, Nuez F and Rubio L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*. 92: 210–215.
- Luyten W, Antal P, Braeckman BP, Bundy J, Cirulli F, Fang-Yen C, Fuellen G, Leroi A, Liu Q, Martorell P, Metspalu A, Perola M, Ristow M, Saul N, Schoofs L, Siems K, Temmerman L,

- Smets T, Wolk A and Rattan SI. (2016). Ageing with *elegans*: a research proposal to map healthspan pathways. *Biogerontology*.17(4): 771-82.
- Mandal B, Pappu HR and Culbreath AK. (2001). Factors affecting mechanical transmission of tomato spotted wilt virus to peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease Journal*. 85: 1259-1263.
- Marsh EK and May RC. (2012). *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and Environmental Microbiology*.78: 2075-2081.
- Martínez de Alba AE, Elvira-Matelot E and Vaucheret H. (2013). Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1829: 1300–1308.
- Martorell P, Llopis S, González N, Chenoll E, López-Carreras N, Aleixandre A, Chen Y, Karoly ED, Ramón D and Genovés S. (2016). Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* CECT 8145 Reduces Fat Content and Modulates Lipid Metabolism and Antioxidant Response in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64(17): 3462-72.
- Muller B and Grossniklaus U. (2010). Model organisms—a historical perspective. *Journal of Proteomics*. 73: 2054–2063.
- Ngo, J., Ashkani, J., Pio, F. (2016). Proceedings of the International Conference on Bioinformatics & Computational Biology (BIOCOMP): 109-113. Athens: The Steering Committee of The World Congress in Computer Science, Computer Engineering and Applied Computing (WorldComp).
- Nobelprize.org. (2014). The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2002 - Press Release. Nobel Media AB 2014. Web. 18 Oct 2016. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2002/press.html>
- Pappu H, Jones R and Jain R. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*. 141: 219-236.
- Peters D. (1998). An updated list of plant species susceptible to Tospoviruses. In: Peters, D., Goldbach, R. (Eds.), *Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research*. Wageningen, The Netherlands. 107-110.
- Rankin CH. (2002). From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews Genetics*. 3: 622-630.
- Ricaño-Rodríguez J, Zavala-González E and Ramírez-Lepe M. (2014). Silenciamiento génico en plantas: mecanismos moleculares del RNA de interferencia y aplicaciones biotecnológicas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 37: 339-350.

Roselló S, Díez MJ and Nuez F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The Tomato spotted wilt virus - a review. *Scientia Horticulturae*. 67:117-150.

Rotenberg D, Krishna Kumar NK, Ullman DE, Montero-Astua M, Willis DK., German TL. and Whitfield AE. (2009). Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. *Phytopathology* 99:404-410.

Rotenberg D, Jacobson AL, Schneweis AN and Whitfield AE. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*. 15: 80–89.

Samuel G, Bald JG and Pitman,HA. (1930). Investigations on ‘spotted wilt’ of tomatoes, Australia. Commonwealth Council for Scientific and Industrial Research. 44.

Sanjuán R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM and Belshaw R. (2010). Viral mutation rates. *Journal of Virology*. 84: 9733–9748.

Sether DM (1992) Tomato spotted wilt virus host list and bibliography. Agricultural Experimental Station, Oregon State University, special report 888.

Strauss E. (2000). Microbiology. Simple hosts may help reveal how bacteria infect cells. *Science*. 290: 2245–2247.

Sun J, Park SY, Kang S, Liu X, Qiu J and Xiang M. (2015). Development of a transformation system for *Hirsutella spp.* and visualization of the mode of nematode infection by GFP-labeled *H. minnesotensis*. *Scientific Reports*.5:10477.

Suttle CA. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 801-812.

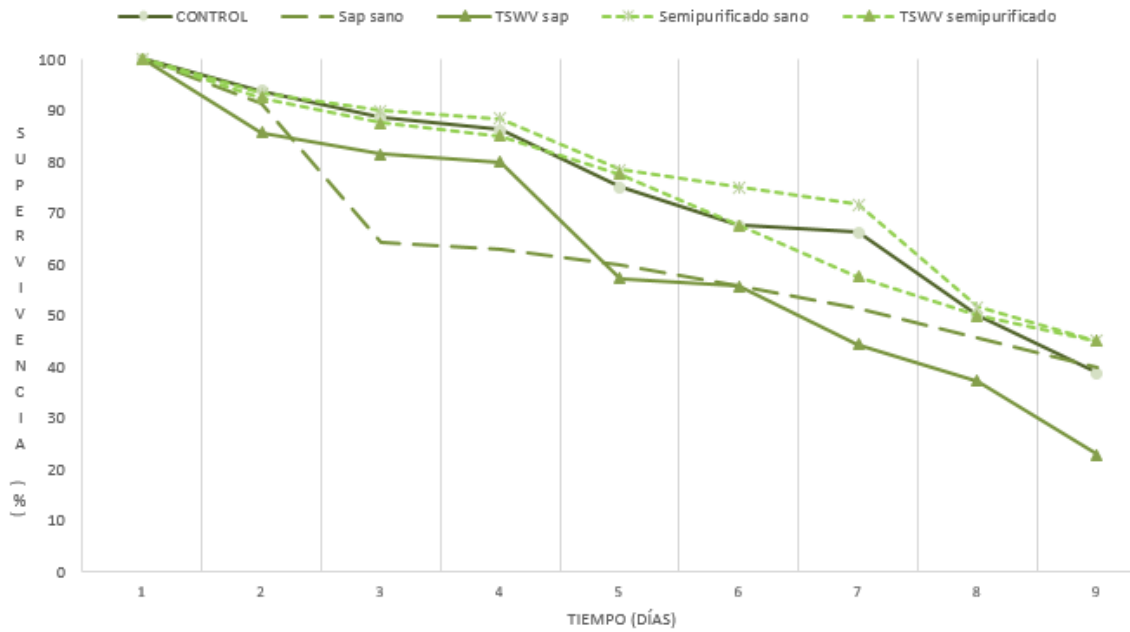
Tang B, Wang Y, Zhu J and Zhao W. (2015). Web Resources for Model Organism Studies. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13: 64–68.

Zhu G, Yin F, Wang L, Wei W, Jiang L and Qin J. (2016). Modeling type 2 diabetes-like hyperglycemia in *C. elegans* on a microdevice. *Integrative Biology*. 8(1): 30-8.

ANEXO

Type of strategy	Virus ^a family	Genome	Experimental features
<i>In vitro</i> infection	VSV <i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA(-)	VSV engineered to encode a GFP fusion protein was utilized to infect wild-type and RNAi-defective cells of <i>C. elegans</i> . Cells lacking components of the RNAi apparatus produced more GFP and infective particles than wild-type cells. Furthermore, mutant cells with enhanced RNAi produced less GFP.
<i>In vivo</i> infection	VV <i>Poxviridae</i>	dsDNA covalently joined ends	A recombinant VV expressing a <i>lacZ</i> reporter gene was used to monitor viral genome replication. The VV entry was facilitated by a PEG-mediated infection protocol. Blue X-Gal staining was observed in many tissues and organs. Virus replication was significantly enhanced in <i>ced-3</i> , <i>ced-4</i> , <i>ced-9(gf)</i> , and <i>egl-1(lf)</i> mutants, demonstrating that the core programmed cell death genes control VV replication in <i>C. elegans</i> .
Natural and experimental infection	OrV <i>Nodaviridae</i>	ssRNA(+) bipartite	OrV persisted in <i>C. elegans</i> cultures through horizontal transmission, causing major damage in intestinal cells, albeit with remarkably little effect on the animal; worms continued moving, eating, and producing progeny, although at a lower rate. <i>C. elegans rde-1</i> mutation (RNAi pathway) conferred susceptibility to the OrV.
Transgenic expressing a fragment of a viral genome	FHV <i>Nodaviridae</i>	ssRNA(+) bipartite	Worm strains were generated to carry either a chromosomally-integrated FHV RNA1 or RNA2 transgene. <i>Drosophila</i> culture cells were transfected with RNA extracted from worms to verify the biological activities of FHV RNAs. FHV replication triggered potent antiviral silencing in <i>C. elegans</i> that requires RDE-1. The worm immunity was capable of rapid virus clearance in the absence of expression of FHV B2 protein, a RNAi inhibitor.
Transgenic expressing a viral gen	AcMNPV <i>Baculoviridae</i>	dsDNA circular	The p35 gene is an inhibitor of virus-induced apoptosis in insect cells. The expression of p35 in <i>C. elegans</i> prevented death of cells normally programmed to die. This suppression of developmentally programmed cell death resulted in the appearance of extra surviving cells. Expression of p35 could prevent the embryonic lethality of a mutation in <i>ced-9</i> , an endogenous gene homologous to the mammalian apoptotic suppressor <i>bcl-2</i> .
	HDV <i>Unassigned</i>	ssRNA(-)	HDAG is a multifunctional protein involved in pathogenesis. Ubiquitous expression of HDAG in transgenic worms resulted in 20 % to 70 % sterility, while worms expressing HDAG in the pharynx displayed 70 % sterility. Most worms expressing HDAG in pharynx were arrested at larval stage 2 or 3 and displayed a 70 % reduction in brood size.
	HBV <i>Hepadnaviridae</i>	dsDNA circular (gapped)	HBx is a multifunctional protein that is crucial for HBV infection and pathogenesis and a contributing cause of hepatocyte carcinogenesis. The expression of HBx in <i>C. elegans</i> induced apoptosis and necrosis, which mimics one of the early cellular events following liver infection by HBV. HBx-induced cell death pathways involved cell death regulators and executors and components of the necrosis pathway.
Feeding worms with a viral protein	HIV-1 <i>Retroviridae</i>	ssRNA(+) (2 copies)	The Nef protein regulates multiple functions in the host that enhance HIV-1 pathogenesis. The feeding of worms on bacteria transformed with a sequence of Nef resulted in its absorption via the gut. Nef induced several altered physiological effects in animals such as lipodystrophy, impaired locomotion, compromised reproductive performance and reduced life span. These physiological effects were comparable to with pathologic symptoms in mammals.

^a Abbreviations: AcMNPV, Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus; FHV, Flock House virus; HBV, hepatitis B virus; HDV, virus; HIV-1, human immunodeficiency virus 1; OrV, Orsay virus; VSV, vesicular stomatitis virus; VV, vaccinia virus



Anexo 2. Ensayo de esperanza de vida en el que se observa un gran efecto del *sap* sano junto al TSWV *sap*. Este resultado se explicaría como una contaminación al observar infecciones en los lotes de *N. benthamiana* inoculadas con ese mismo *sap* supuestamente sano.

Anexo 1. Recopilación de Diogo y Bratanich 2014 de las investigaciones realizadas en *C. elegans* con virus hasta ese momento.