

TESIS DOCTORAL

TÍTULO: “Implicaciones de las infecciones mixtas de dos cepas de un virus de plantas en su epidemiología, evolución e interacción con el huésped”

DOCTORANDA: D.^ª Cristina Alcaide Cabello

DIRECTORES: Dr. Miguel Ángel Aranda Regules y Dr. Pedro Gómez López, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 20 de mayo de 2022 en CEBAS-CSIC

RESUMEN

El virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) es un potexvirus de ARN monocatenario de polaridad positiva que afecta a cultivos de tomate en todo el mundo. En esta tesis he estudiado las interacciones virus-virus y virus-huésped en infecciones mixtas de aislados de PepMV de dos cepas distintas. Estas interacciones virus-virus y virus-huésped pueden variar dependiendo del aislado del virus, el tipo de infección y la ecología del huésped. En primer lugar, en cuanto a la estructura poblacional de PepMV en el sureste español, se observó que los aislados de PepMV-CH2 eran predominantes, mientras que los aislados de PepMV-EU persistían principalmente en infecciones mixtas. Además, este patrón epidemiológico difirió entre dos zonas geográficamente cercanas, observando una mayor variabilidad genética en la población de PepMV-CH2 donde las infecciones mixtas estuvieron co-circulando. Hasta el momento, se había descrito una interacción antagonista *in planta* entre un aislado de la cepa Chilena (CH2) y un aislado de la cepa Europea (EU), en la cual se reprimía la acumulación de PepMV-CH2 durante la infección mixta. Se comprobó que esta interacción antagonista ocurría con distintos aislados CH2, independientemente de su procedencia (**Figura 1**). Posteriormente, se estudió el efecto que un factor abiótico, como la temperatura, podría tener sobre la interacción entre PepMV-EU y PepMV-CH2. Por un lado, se observó que variaciones en la temperatura podían afectar la acumulación viral, siendo la infección por PepMV más productiva a la temperatura más baja (20°C *versus* 30°C). A su vez, el tiempo también tuvo un papel en la interacción entre PepMV-EU y PepMV-CH2, ya que a largos tiempos post-inoculación se dejó de observar la interacción antagonista entre ambos aislados.

En cuanto a la carga mutacional, el número medio de variantes en las poblaciones virales se incrementó significativamente con la temperatura, siendo a su vez dependiente de aislado (**Figura 2**).

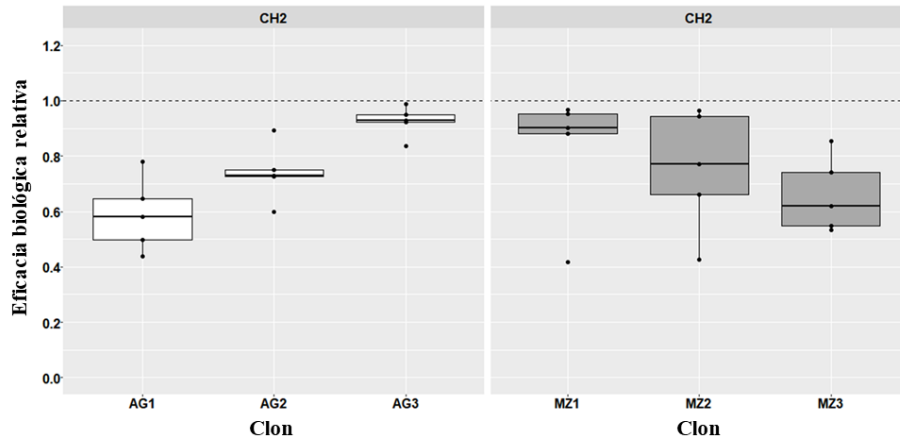


Figura 1. Eficacia biológica relativa de seis clones infectivos de PepMV-CH2 en infecciones mixtas con un aislado de PepMV-EU con respecto a infecciones simples. En blanco se muestran tres clones procedentes de plantas con infecciones simples de Águilas y en gris tres clones procedentes de plantas con infecciones mixtas en Mazarrón. La acumulación viral se determinó por RT-qPCR y la eficacia biológica relativa se determinó como el ratio entre la eficacia biológica en infecciones simples con respecto a infecciones mixtas (W_{mix}/W_{simple}).

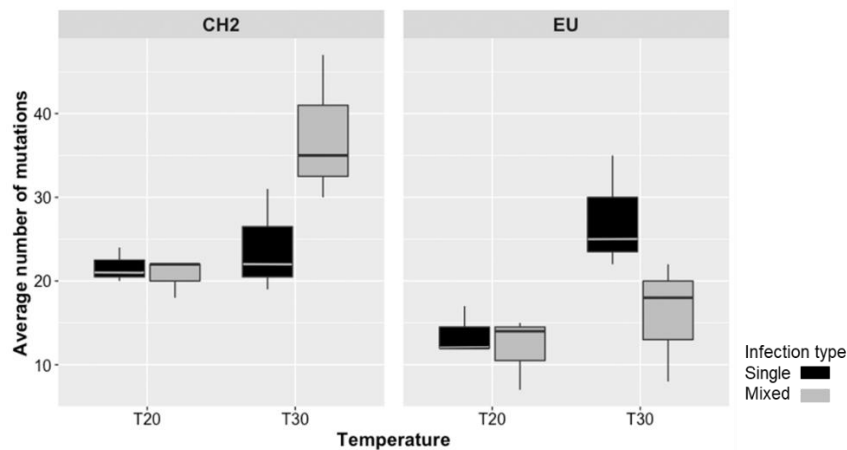


Figura 2. Diagrama de cajas mostrando el número medio de SNPs para las poblaciones de PepMV-EU y PepMV-CH2 en infecciones simples (negro) y mixtas (gris) a 20°C y 30°C de temperatura.

En este trabajo también se ha estudiado el papel de las sobre-infecciones en el antagonismo asimétrico mostrado por PepMV-EU y PepMV-CH2. PepMV-EU tuvo un

efecto protector frente a la infección de PepMV-CH2, sin embargo, la acumulación de PepMV-EU se incrementó en plantas pre-inoculadas con PepMV-CH2 (**Figura 3**). En cuanto al efecto del tipo de infección (simple o mixta) sobre la transmisión viral, se observó una fuerte correlación positiva entre acumulación viral y transmisión, independientemente del tipo de infección que presentaba la fuente de inóculo. También se analizó la diversidad genética de PepMV-EU y PepMV-CH2 en infecciones simples y mixtas en un experimento de pases seriados. Para PepMV-EU, no se encontraron diferencias significativas en el número de sustituciones nucleotídicas entre infecciones simples y mixtas. Comparando PepMV-EU y PepMV-CH2, se encontró una mayor diversidad nucleotídica para la población de PepMV-CH2. Sin embargo, no se encontró correlación entre el número de pase y el número de mutaciones ni tampoco diferenciación entre los linajes, mostrando que las infecciones mixtas no se pudieron asociar con evidentes cuellos de botella genéticos.

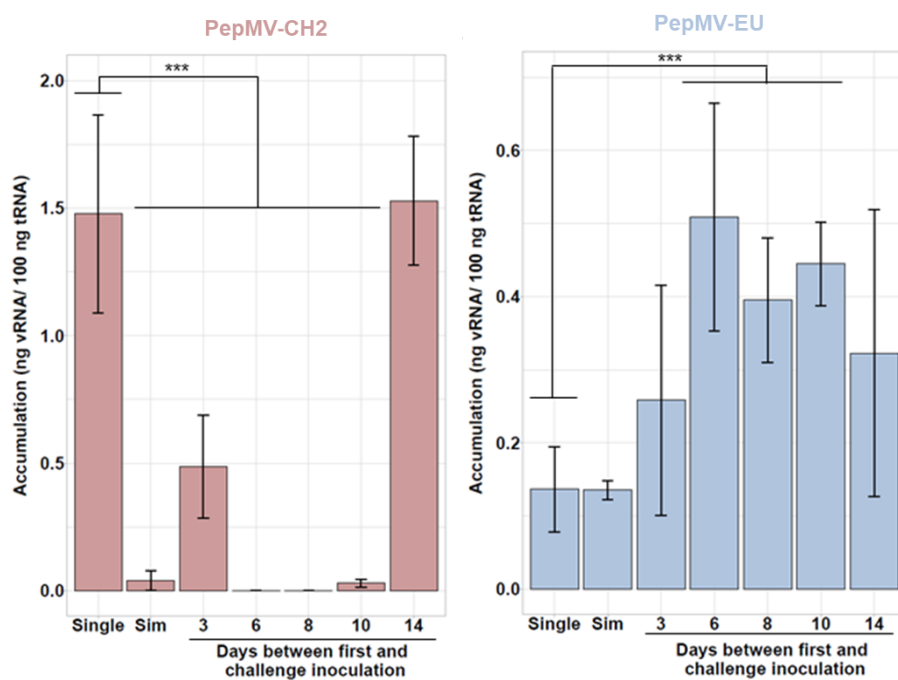


Figura 3. Acumulación de PepMV-CH2 en plantas pre-inoculadas con PepMV-EU y retadas con PepMV-CH2 (panel izquierdo) y de PepMV-EU en plantas pre-inoculadas con PepMV-CH2 y retadas con PepMV-EU (panel derecho). Se incluyen como controles infecciones simples e infecciones simultáneas de PepMV-EU y PepMV-CH2. Las sobre-inoculaciones se llevaron a cabo a diferentes tiempos después de la pre-inoculación (3, 6, 8, 10 y 14 días).

Por último, en un intento por comprender los mecanismos subyacentes a la interacción virus-virus entre PepMV-EU y PepMV-CH2, se llevó a cabo un análisis transcriptómico de plantas de tomate infectadas con PepMV-EU, PepMV-CH2 o ambos. En primer lugar, se compararon los transcriptomas de plantas con infecciones simples, mostrando que cada cepa viral modulaba diferencialmente el transcriptoma del huésped, así como que las alteraciones transcriptómicas más pronunciadas se producían a tiempos tempranos post-infección. También se demostró que las infecciones mixtas difirieron de las infecciones simples en la respuesta transcriptómica del huésped a tiempos tardíos post-inoculación. Se realizó una búsqueda de genes del huésped que pudieran estar potencialmente implicados en el antagonismo entre PepMV-EU y PepMV-CH2. Se determinó que los genes *AGO1a*, *DCL2d*, *AGO2a* y *DCL2b*, los cuales están implicados en la ruta de silenciamiento antiviral, fueron regulados al alza durante la infección por PepMV-EU, pero no por PepMV-CH2, a tiempos tempranos post-infección. El patrón de expresión de *AGO2a* se validó en plantas de tomate y de *Nicotiana benthamiana*; sin embargo, aunque *AGO2* tuvo un papel importante en la defensa antiviral contra PepMV (**Figura 4**), parece que no es el principal factor determinante en la interacción antagonista entre aislados de las cepas EU y CH2 de PepMV.

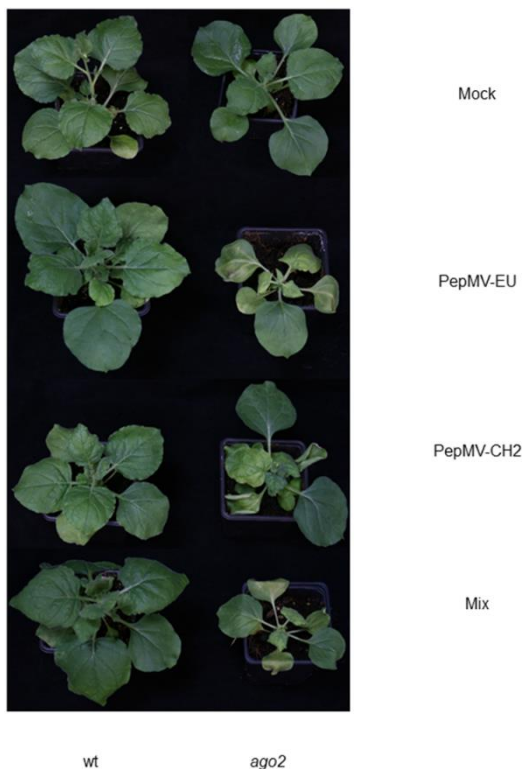


Figura 4. Plantas de *N. benthamiana* infectadas con PepMV después de 10 días. Se muestran plantas silvestres (izquierda) y plantas mutantes *ago2* (derecha) infectadas con PepMV-EU, PepMV-CH2 o infecciones mixtas. También se muestran plantas control. En las hojas se observa clorosis, amarilleo y abullonamiento, aunque el síntoma más evidente es el enanismo, más evidente en el caso de las infecciones mixtas y simples de PepMV-EU.

Publicaciones derivadas de esta tesis

- **Alcaide, C.,** Rabadán, M. P., Juárez, M., and Gómez, P. (2020). Long-term cocirculation of two strains of pepino mosaic virus in tomato crops and its effect on population genetic variability. *Phytopathology* 110, 49–57.
- **Alcaide, C.,** Sardanyés, J., Elena, S. F., and Gómez, P. (2021). Increasing temperature alters the within-host competition of viral strains and influences virus genetic variability. *Virus Evol.* 7, veab017.
- **Alcaide, C.,** and Aranda, M. A. (2021). Determinants of persistent patterns of pepino mosaic virus mixed infections. *Front. Microbiol.* 12, 1–13.



Fotografía del acto de lectura y defensa. El Tribunal estuvo constituido por el Dr. Juan José López-Moya Gómez (Centro de Investigación en Agrigenómica), la Dra. Inmaculada Ferriol Safont (Instituto de Ciencias Agrarias) y el Dr. Jesús Israel Pagán Muñoz (Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas - Universidad Politécnica de Madrid). La tesis fue calificada con Sobresaliente *Cum Laude*.