

TESIS DOCTORAL

“Impacto de la edición de EIF4E sobre la resistencia a virus y la fertilidad en plantas de melón”

DOCTORANDO: D. Giuliano Sting Pechar, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS) del CSIC y Universidad de Murcia

DIRECTORES: Prof. Miguel Ángel Aranda Regules, Dra. Livia Donaire Segarra, Dr. Roque Carlos García-Almodóvar (CEBAS-CSIC)

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 11 de mayo de 2022

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado el impacto de la edición del gen que codifica el factor de iniciación de la traducción eucariota (eIF) 4E sobre la susceptibilidad a virus y la fertilidad de la flor masculina en melón. EIF4E es una proteína de unión a cap que, a través de su interacción con eIF4G, constituye el núcleo del complejo eIF4F, el cual desempeña un papel clave en la circularización de los ARN mensajeros y su posterior traducción cap-dependiente. Además de su papel fundamental en la traducción de ARNm en eucariotas, eIF4E ha sido descrito como factor de susceptibilidad a virus de plantas, ya que puede ser reclutado por estos, permitiendo el establecimiento de la infección. Más allá de su papel en la traducción canónica de los ARNm celulares, se han sugerido otras funciones para eIF4E en la biología de los organismos eucariotas, incluido el desarrollo sexual.

En la primera sección de los resultados, se describe la generación de un mutante *knock-out* de *EIF4E* mediante CRISPR/Cas9. Las líneas mutantes T0 mostraron una delección de un solo nucleótido en homocigosis que dio lugar a una proteína eIF4E truncada; además, la supresión de *EIF4E* originó un fenotipo de androesterilidad. El cruce entre plantas transgénicas homocigotas para la mutación con plantas de tipo silvestre del mismo genotipo dio lugar a una generación F1 que incluía individuos no transgénicos que presentaban la misma delección que en la T0, pero en heterocigosis. A continuación, se fecundaron individuos F1 fértiles no transgénicos para obtener una generación F2 libre de transgen. Las plantas de la generación F2 fueron inoculadas con el virus del mosaico de la sandía marroquí (MWMV); las plantas homocigotas para la mutación de *EIF4E* mostraron resistencia al virus, mientras que las plantas heterocigotas y las no mutantes mostraron síntomas de la enfermedad (**Figura 1**). Tras cuatro meses desde la inoculación, se observaron síntomas de infección por MWMV en dos de las plantas resistentes. Estas plantas sintomáticas fueron positivas para MWMV por RT-qPCR, por lo que se realizó un ensayo de retroinoculación que confirmó la presencia de un aislado que superaba la resistencia (RB). A continuación, se amplificó por RT-PCR el gen de la VPg del MWMV y se identificó una única sustitución de un nucleótido que daba

lugar al cambio de aminoácido N163Y en el aislado RB. Dados los antecedentes publicados sobre la superación de la resistencia mediada por el eIF4E en potyvirus, es muy probable que la mutación N163Y en la VPg del MWMV sea la responsable de la superación de la resistencia de las plantas editadas de melón. En cuanto a la fertilidad, todas las plantas homocigotas, y sólo ellas, mostraron el fenotipo de esterilidad masculina observado en T0 (**Figura 2**).

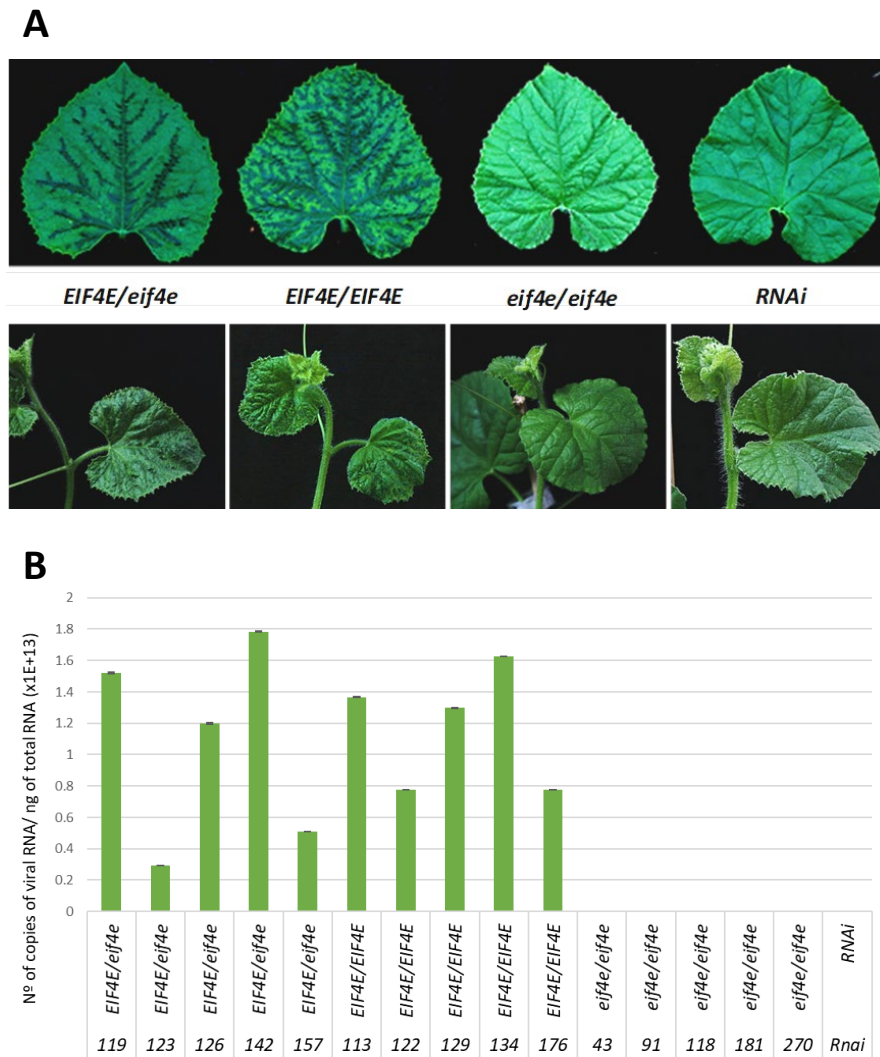


Figura 1. Las plantas mutantes homocigotas en *eif4e* mostraron inmunidad a la infección del virus del mosaico de la sandía marroquí (MWMV). (A) Síntomas de la enfermedad (hojas -panel superior- y plantas -panel inferior-) de plantas heterocigotas (*EIF4E/eif4e*), homocigotas de tipo silvestre (WT) (*EIF4E/EIF4E*) y homocigotas recesivas (*eif4e/eif4e*) de la generación editada F2 y de plantas RNAi (control) a los 14 días postinoculación (dpi). (B) Análisis de la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-qPCR) de la acumulación de ARN de MWMV a los 21 dpi en 5 individuos heterocigotos (*EIF4E/eif4e*), homocigotos WT (*EIF4E/EIF4E*), homocigotos recesivos (*eif4e/eif4e*) y plantas RNAi (control).



Figura 2. Asociación genotipo-fenotipo en flores masculinas de melón de la generación F2. Flores con polen viable en las anteras de plantas WT y heterocigóticas de la generación F2, anteras pequeñas y no dehiscentes, sin granos de polen maduros en plantas homocigóticas recesivas de la generación F2 a los 40 días post-germinación.

En el segundo apartado de los resultados de este trabajo, se realizó el análisis morfológico y transcriptómico de las flores de melón en diferentes etapas de desarrollo. En primer lugar, se analizó la morfogénesis de las flores masculinas y hermafroditas, identificando mediante microscopía óptica y de barrido 12 estadios de formación floral, que van desde la aparición de los meristemos florales hasta la antesis. Las primeras diferencias estructurales entre las flores masculinas y hermafroditas aparecieron entre los estadios 6 y 7, por lo que se ha llevado a cabo una descripción de las etapas que conducen a la formación de los órganos y estructuras en ambos tipos de flores. Por último, se identificaron los patrones de expresión de los genes que son específicos de un episodio determinado, identificando aquellos que definen el paso de un episodio al siguiente según el modelo ABCDE de desarrollo floral.

En la tercera parte de este trabajo, se llevó a cabo un análisis comparativo del desarrollo floral masculino entre las plantas de tipo silvestre y las mutantes *knock-out* de *EIF4E*, con el fin de investigar el papel de *EIF4E* en la formación de los gametos masculinos del melón (**Figura 3**). El análisis comparativo de las anteras realizado mediante microscopía mostró que el fenotipo de esterilidad es post-meiótico y esporofítico, ya que la inusual secreción de material proteico, y las diferencias en la degradación del tapetum entre el mutante y el WT, son características de este tipo de esterilidad. En consonancia con esto, los datos transcriptómicos (**Figura 4**) identificaron una regulación a la baja de los genes implicados en el desarrollo del tapetum y en la

germinación del polen en las flores masculinas del mutante de *EIF4E* frente al WT. Por último, *EIF4G* mostró un patrón de regulación a la baja a lo largo del desarrollo floral masculino en el mutante con respecto al WT.

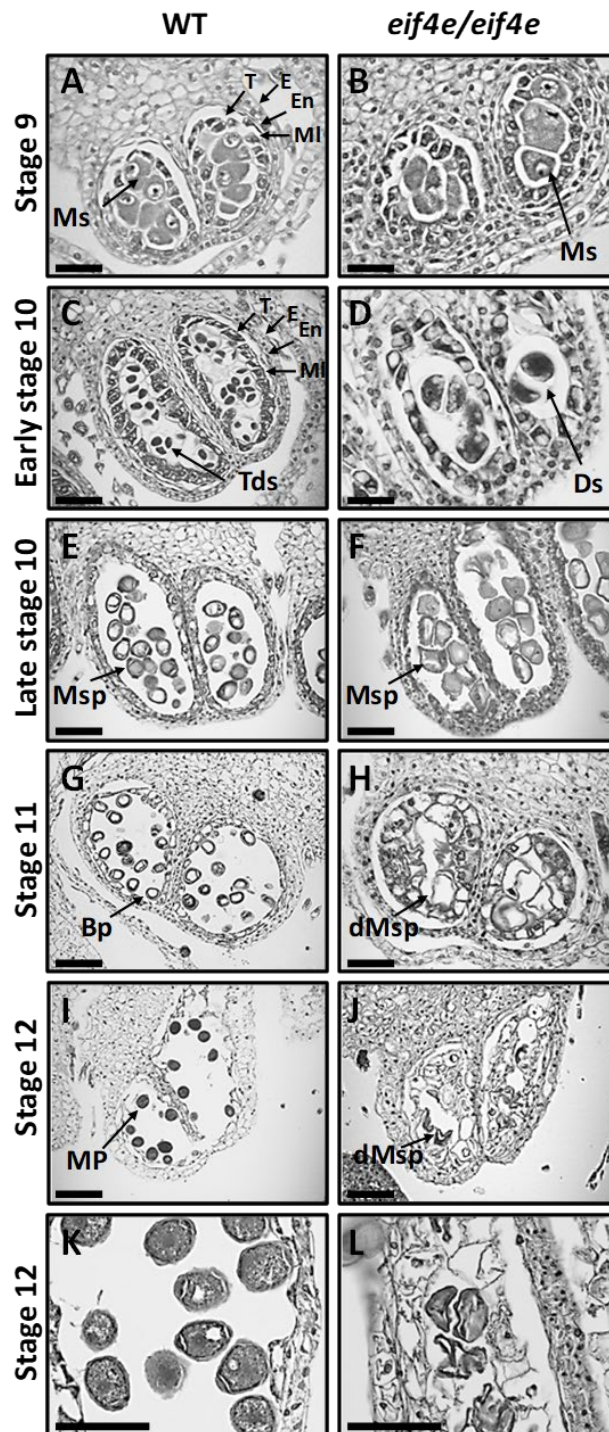


Figura 3. Secciones transversales de anteras a lo largo del desarrollo en el tipo silvestre (WT) y en el mutante de *eif4e* observadas por microscopía óptica. Lóculos de las anteras del WT (A, C, E, G, I, L) y del mutante de *eif4e* (B, D, F, H, J, L) de los estadios 9 a 12 de desarrollo. BP, polen bicelular; dMsp, microsporas degradadas; Ds, díadas; E, epidermis; En, endotelio; ML, capa media; MP, polen maduro; Ms, microsporocito; Msp, microsporas; T, tapetum; Tds, tétradas. Barras de escala = 50 μ m (A, B, C, D, E, F), 100 μ m (G, H, I, J), 30 μ m (K, L)

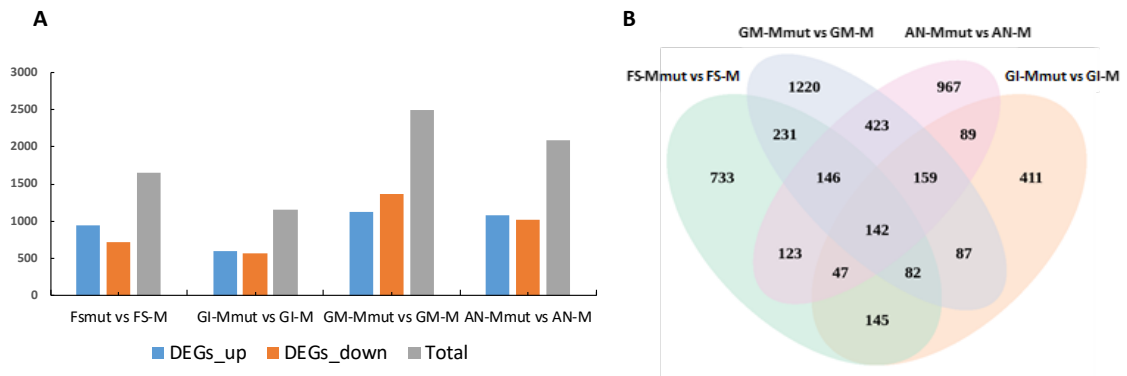


Figura 4. Genes diferencialmente expresados (DEGs) a lo largo de los episodios de desarrollo de la flor para plantas de melón de tipo silvestre (WT) y mutante de *eif4e*. (A) DEGs del mutante frente al WT en diferentes episodios del desarrollo floral (valor P ajustado < 0,01 y Log2 fold change >1 y <-1). (B) Diagrama de Venn mostrando los DEGs específicos o compartidos del mutante frente al WT en diferentes episodios del desarrollo floral.

Dada la evidencia que apoya un papel diferencial de las isoformas de eIF4F en la traducción de los mRNAs en las células germinales, se propuso que la interacción entre eIF4E y eIF4G es un requisito previo para la traducción de los mRNAs que codifican las proteínas que limitan la formación de los gametos masculinos.



Fotografía del acto de lectura y defensa. El Tribunal estuvo constituido por los Drs. D. María Belén Picó Sirvent (Catedrático de la Universitat Politècnica de Valencia), Dr. Abel Piqueras Castillo (Científico Titular del CEBAS-CSIC) y Dr. Juan Antonio Díaz Pendón (Científico Titular del IHSM-UMA-CSIC). La Tesis fue calificada con Sobresaliente *Cum Laude*.