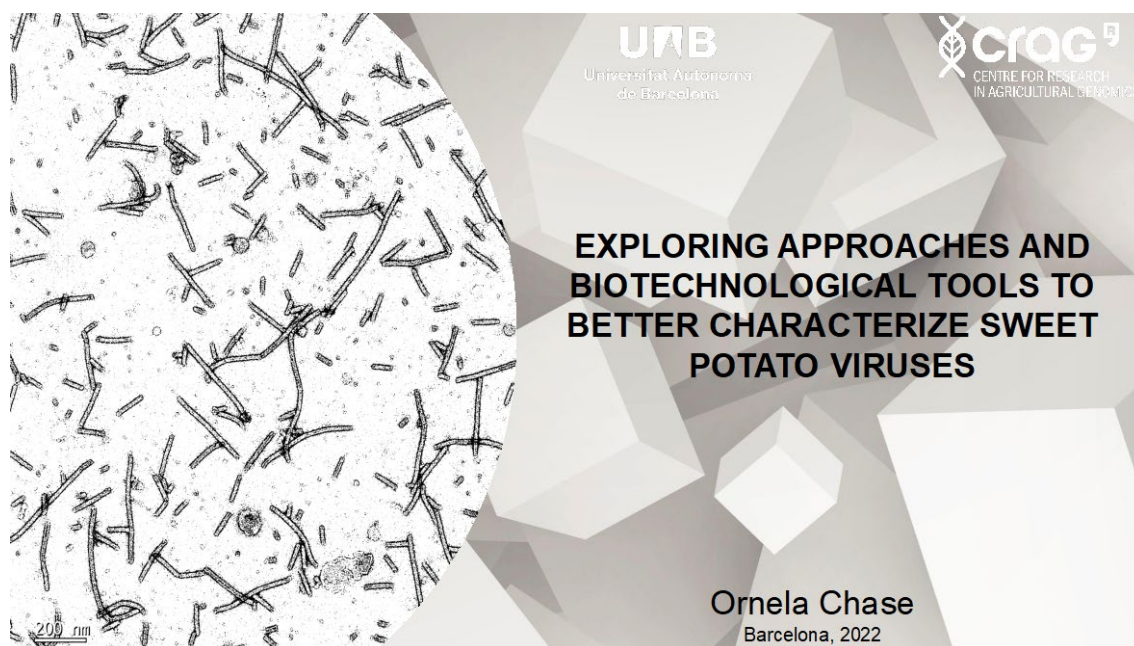


TESIS DOCTORAL



TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

“Exploring approaches and biotechnological tools to better characterize sweet potato viruses”. Tesis Doctoral que se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, dentro del Programa de Doctorado en Biología y Biotecnología Vegetal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

DOCTORANDA: Ornela Chase

PROGRAMA DE DOCTORADO: Biología y Biotecnología Vegetal de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

DIRECTOR: Dr. Juan José López-Moya Gómez, investigador científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) destinado en el Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB.

TUTORA: Dra. Montserrat Martín Hernández, investigadora del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA.

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta tesis doctoral se realizó en el departamento de Genética Molecular dentro del grupo de Plant Viruses del Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB. La financiación se debe al proyecto PID2019-105692RB-100, a una ayuda EMBO Short-Term Fellowship 8695 y a un contrato FI de la Generalitat de Catalunya (CERCA) con referencia 2018 FI_B 00329.

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 5 de Septiembre de 2022. CRAG, Barcelona.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Miguel Aranda Regules (Presidente), Josep Maria Casacuberta Sunyer (Secretario), Varvara Maliogka (Vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

Las enfermedades virales plantean un gran desafío para una producción agrícola sostenible. La batata (*Ipomoea batatas*) es uno de los cultivos más importantes del mundo y su producción está amenazada por muchos virus que pueden limitar su rendimiento y calidad, especialmente cuando aparecen en infecciones mixtas. La gran diversidad de virus que pueden estar presentes simultáneamente en batata crea patosistemas complejos que requieren estudios detallados para mejorar las estrategias de control contra estas enfermedades virales. La presente tesis aborda la caracterización de ciertos aspectos biológicos de cuatro virus de batata, incluidos los potyvirus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y *Sweet potato virus 2* (SPV2), transmitidos por áfidos, y el ipomovirus *Sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) y el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV), transmitidos por mosca blanca. En el primer capítulo del trabajo, se compara la variabilidad de dos aislados del virus SPMMV, denominados 130 y 0900, en dos plantas huéspedes experimentales, *Nicotiana tabacum* e *Ipomoea nil*, con especial atención en la sintomatología que causan y a la acumulación viral en plantas con infección simple y mixta a lo largo del tiempo. Además, se realizaron comparaciones de secuencias entre los dos aislados buscando detectar diferencias que pudieran explicar la divergencia de síntomas observados. También se exploraron nuevos huéspedes comunes entre SPMMV y SPCSV que facilitaran el estudio de coinfecciones, identificando plantas susceptibles a la infección por SPCSV no descritas anteriormente, ampliando aún más su rango de huéspedes conocidos.

En el segundo capítulo, se caracterizaron productos génicos del virus SPV2 que confieren actividad supresora de silenciamiento de ARN, conocida por las siglas RSS (de "RNA silencing suppression"). Se analizó la actividad RSS de diferentes productos génicos ubicados en la región 5' del genoma viral, empleando ensayos de co-agroinfiltración con una proteína indicadora GFP en plantas de *N. benthamiana*. Los resultados visuales bajo luz UV revelaron que diferentes productos génicos presentaban actividad supresora. Estos hallazgos fueron confirmados por q-RT-PCR y transferencia Northern midiendo los niveles de ARNm de GFP. Además, se examinó si estas proteínas interferían con la señal de silenciamiento de ARN en el movimiento sistémico de la señal de silenciamiento. Por último, también se evaluó la

capacidad RSS de las proteínas de SPV2 durante infecciones virales utilizando un vector de expresión heterólogo.

Finalmente, y con el objetivo de obtener información sobre los mecanismos moleculares requeridos para la especificidad de vector en la transmisión mediada por insectos de virus de batata, en el tercer capítulo realizamos estudios estructurales basados en la producción de partículas similares a virus (conocidas como VLPs, de "Virus-like particles") en plantas. Las VLPs de SPFMV, SPV2 y SPMMV se produjeron a través de expresión transitoria de sus respectivas proteínas de cápside (CP) en *N. benthamiana*. Para ello se utilizó un vector de expresión auto-replicativo que ya se había empleado con éxito en el grupo de investigación para generar VLPs similares a viriones alargados y flexuosos de miembros de la familia *Potyviridae*. La transferencia Western con anticuerpos específicos y las imágenes de tinción negativa en microscopía electrónica (EM) de extractos crudos de hojas infiltradas confirmaron la sobreexpresión de las tres CPs y su posterior ensamblaje en VLPs que se asemejan a los filamentos flexuosos de los virus originales. Las VLPs se purificaron y se usaron para estudios de criomicroscopía electrónica (cryo-EM), lo cual nos permitió resolver su estructura con una resolución casi atómica.

En conjunto, los resultados de los tres capítulos de la tesis brindan nueva información sobre la variabilidad natural en las interacciones planta-virus, caracterizando mejor los determinantes moleculares utilizados por los miembros de la familia *Potyviridae* para hacer frente a las defensas del huésped, lo que revela un escenario evolutivo complejo en el caso de los potyvirus de batata. Además, la producción de VLPs permitió la comparación de las estructuras de partículas correspondientes a un potyvirus y un ipomovirus que pueden infectar la misma planta huésped pero que son transmitidos por diferentes insectos vectores, proporcionando la base para futuros estudios que ayuden a comprender mejor sus propiedades biológicas, y que se espera puedan ayudar a diseñar medidas de control efectivas y duraderas.

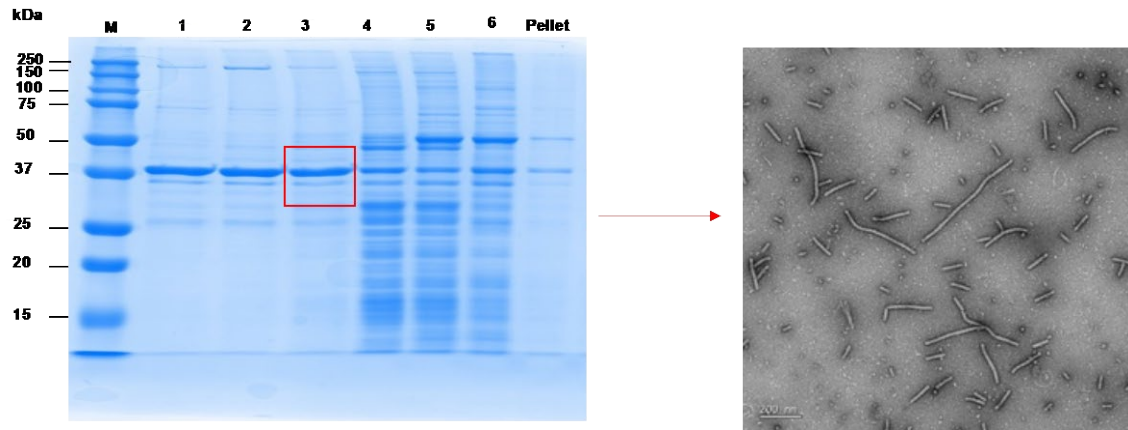


FIGURA 1 | Un ejemplo de la producción de VLPs mediante expresión transitoria de la CP de virus en *N. benthamiana*. A la izquierda se muestra el análisis en SDS-PAGE de fracciones de un gradiente de sacarosa (4-10%) en el que se completa la purificación de partículas a partir de tejido agroinfiltrado con una construcción que expresa la CP del potyvirus SPV2. La banda de aproximadamente 37 KDa corresponde a la CP, y la fracción 3 (marcada con un rectángulo) se analizó mediante tinción negativa en microscopía electrónica de transmisión como se muestra en el panel de la derecha observándose filamentos similares a viriones.



La doctoranda y el director con el tribunal después de la defensa de tesis. De izquierda a derecha: Varvara Maliogka, Miguel Aranda, Ornela Chase (doctoranda), Juan José López-Moya (director) y Josep Maria Casacuberta. La imagen fue tomada en el salón de actos del CRAG (Barcelona).

Publicaciones derivadas del trabajo (en preparación) y de otros resultados relacionados

Los resultados de la tesis forman parte de dos manuscritos enviados para su publicación en revistas indexadas.

En el primero de ellos, titulado "Cryo-EM structures of a potyvirus and an ipomovirus that infect sweet potato as common host" participan como co-autores **O. Chase**, A. Javed, M. J. Byrne, E. C. Thuenemann, G. P. Lomonosoff, N. A. Ranson y J.J. López-Moya, incluyendo junto al personal del CRAG a varios colaboradores del JIC (Department of Biochemistry and Metabolism, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK) y de la Universidad de Leeds

(Astbury Centre for Structural Molecular Biology, School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, UK) en Reino Unido.

El segundo manuscrito tiene como título provisional "Different gene products in the 5' genomic region of the potyvirus Sweet potato virus 2 (SPV2) contribute to RNA silencing suppression" y como co-autores a **O. Chase**, G. Bambaren, A. A. Valli y J.J. López-Moya, también con participación de un colaborador del CNB-CSIC en Madrid.

Ya se han publicado algunos resultados relacionados con la temática del trabajo sobre infecciones mixtas y supresión de silenciamiento génico, en una revista del primer cuartil:

- Domingo-Calap, M. L., **Chase, O.**, Estapé, M., Moreno, A. B., & López-Moya, J. J. (2021). The P1 protein of *Watermelon mosaic virus* compromises the activity as RNA Silencing Suppressor of the P25 protein of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 645530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645530>

Y un capítulo de libro sobre interferencia con transmisión por insectos vectores:

- **Chase O.**, Ferriol I., López-Moya JJ (2021) Control of plant pathogenic viruses through interference with insect transmission. In *Plant Virus-Host Interaction*, second edition. Elsevier. Editor: R.K. Gaur. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821629-3.00019-1>