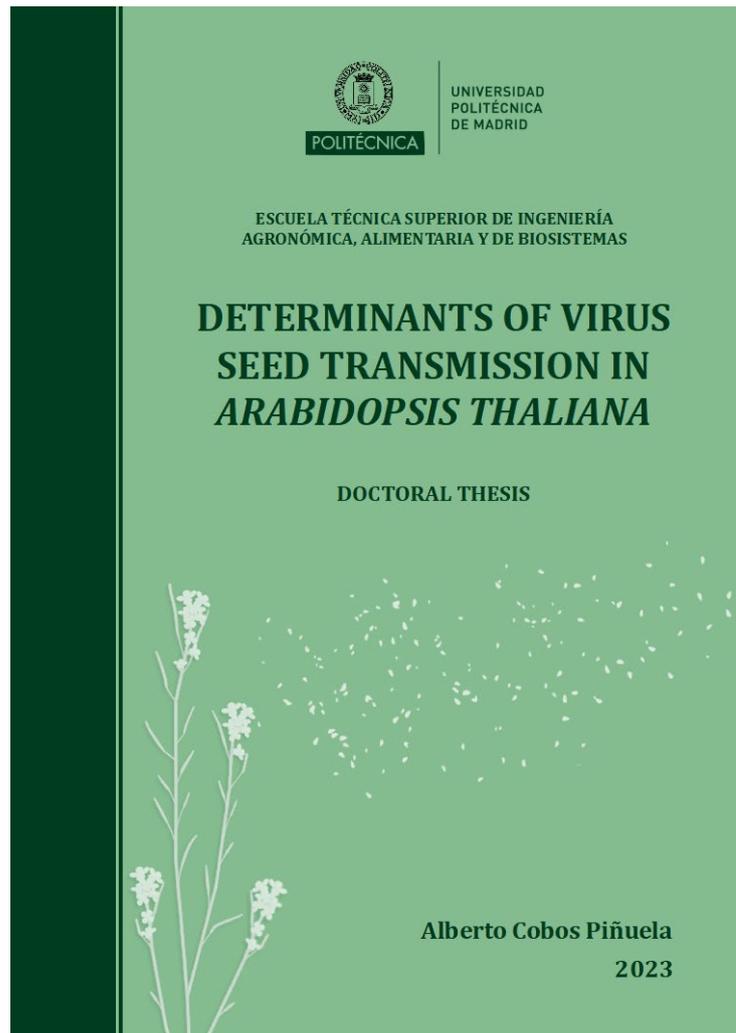


TESIS DOCTORAL



TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

“Determinants of virus seed transmission in *Arabidopsis thaliana*”.

DOCTORANDO: Alberto Cobos Piñuela

PROGRAMA DE DOCTORADO: “Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados” de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

DIRECTOR: Dr. Jesús Israel Pagán Muñoz, Profesor Contratado Doctor del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC y de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid.

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta tesis doctoral se ha realizado en el grupo de Transmisión por semilla de virus de plantas perteneciente al área de Interacción de las Plantas con el Medio del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC. Ha sido

financiada con los proyectos BIO2016-79165-R y PID2019-109579RB-I00. El doctorado ha disfrutado también de un contrato de Formación de Personal Investigador (BES-2017-080783).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 8 de mayo de 2023. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Prof. Fernando García-Arenal Rodríguez (Presidente), Dra. Aurora Fraile Pérez (Secretaria), Dra. Araceli Castillo Garriga (Vocal), Dr. Tomás Canto Ceballos (Vocal) y Dr. Pedro Gómez López (Vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

La transmisión vertical, el paso del virus de una generación del huésped a la siguiente a través de semillas, forma parte del ciclo de vida de al menos una cuarta parte de los virus de plantas conocidos, y para algunas especies, como lo virus crípticos o persistentes, es la única forma de infectar a nuevos huéspedes. Este modo de transmisión es de gran importancia epidemiológica: permite a los virus de plantas sobrevivir dentro de la semilla mientras esta se mantenga viable y viajar grandes distancias sin la necesidad de vectores, dándoles la oportunidad de emerger en nuevas poblaciones de huéspedes donde pueden iniciar epidemias muy graves. Sin embargo, muchos aspectos relacionados con este modo de transmisión son todavía poco conocidos. Esta tesis ha tenido como objetivo mejorar la comprensión del proceso de transmisión por semilla de los virus de plantas centrándose en la interacción del virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV) y el virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) con su huésped natural *Arabidopsis thaliana*. Para invadir las semillas, los virus de plantas necesitan colonizar los tejidos reproductivos de la planta durante un intervalo de tiempo que es generalmente muy corto: mientras el embrión aún esté conectado a los tejidos maternos o durante la gametogénesis. En base a esto, se analizó la velocidad a la cual el virus invade las estructuras reproductivas de la planta, el nivel de acumulación viral en dichas estructuras, la virulencia y la supervivencia de las semillas de plantas infectadas. Estos factores se incluyeron en un modelo multivariante que indicó que los mejores predictores de la transmisión por semilla eran la multiplicación viral en la inflorescencia y la velocidad de movimiento del virus dentro de la planta (FIGURA 1). Estudios epidemiológicos recientes indican que las infecciones virales mixtas son tanto o más frecuentes que las simples, tanto en ecosistemas silvestres como en agroecosistemas. Las interacciones que se establecen entre los virus pueden modular el proceso de infección y alterar, entre otros parámetros de la infección, la eficacia de transmisión. Para estudiar estos efectos, se analizó la eficacia de transmisión por semilla en situaciones de co- y

super-infección de TuMV y CMV en *A. thaliana*. Aunque CMV mostró mayor transmisión por semilla que TuMV en infección simple, la infección mixta invirtió esta tendencia, incrementando la eficacia de transmisión por semilla de TuMV y reduciendo drásticamente la de CMV. Usando los resultados anteriormente descritos como guía, se analizaron los determinantes genéticos de la transmisión por semilla de CMV en *A. thaliana*. Mediante una aproximación tipo GWAS, se identificaron 25 genes candidatos, cuya función está relacionada con el control de la multiplicación viral y colonización del huésped, el desarrollo reproductivo del huésped y la formación de gametos y semillas (FIGURA 2). Para identificar determinantes genéticos de la transmisión por semilla en el genoma de CMV, se mapearon los cambios a nivel de secuencia de nucleótidos de un genotipo de CMV después de su adaptación a la transmisión por semilla en *A. thaliana*. Se observó que la mayoría de los cambios se localizaban en los extremos 3' no codificantes de los tres ARN genómicos del virus, alterando su estructura secundaria. Dado que estas regiones están relacionadas con el proceso de multiplicación viral, que es determinante para la transmisión por semilla, estos resultados sugieren que CMV se adapta a la transmisión por semilla mediante cambios en regiones del genoma que afectan a la multiplicación viral.

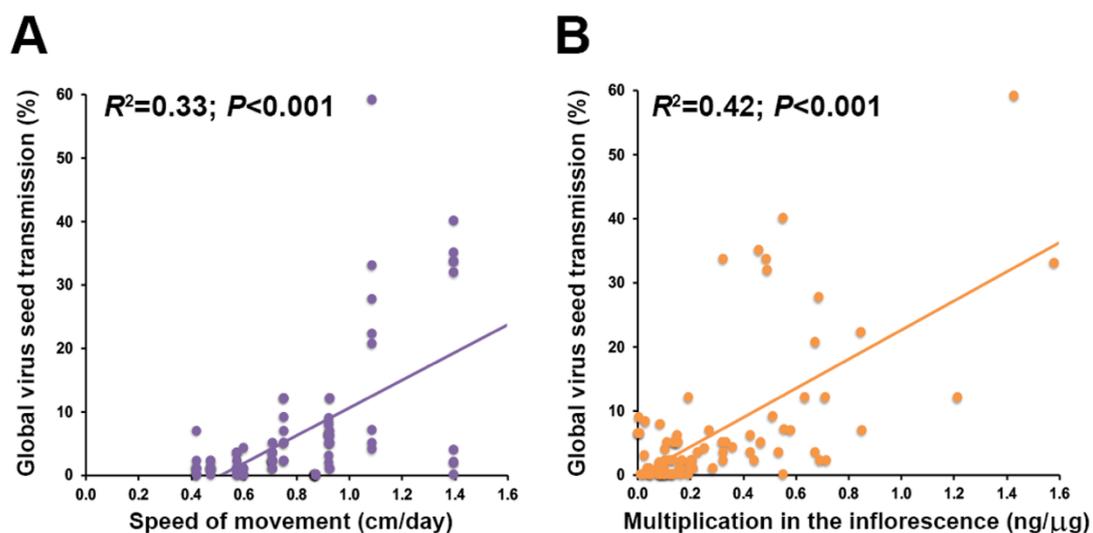


FIGURA 1 | Correlación entre la eficacia de transmisión por semilla de CMV en *Arabidopsis thaliana* (porcentaje de plántulas infectadas procedentes de semillas producidas por plantas infectadas) y los dos principales predictores identificados por los modelos multivariantes: la velocidad de colonización del huésped (A) y la multiplicación del virus en las estructuras reproductoras (B).

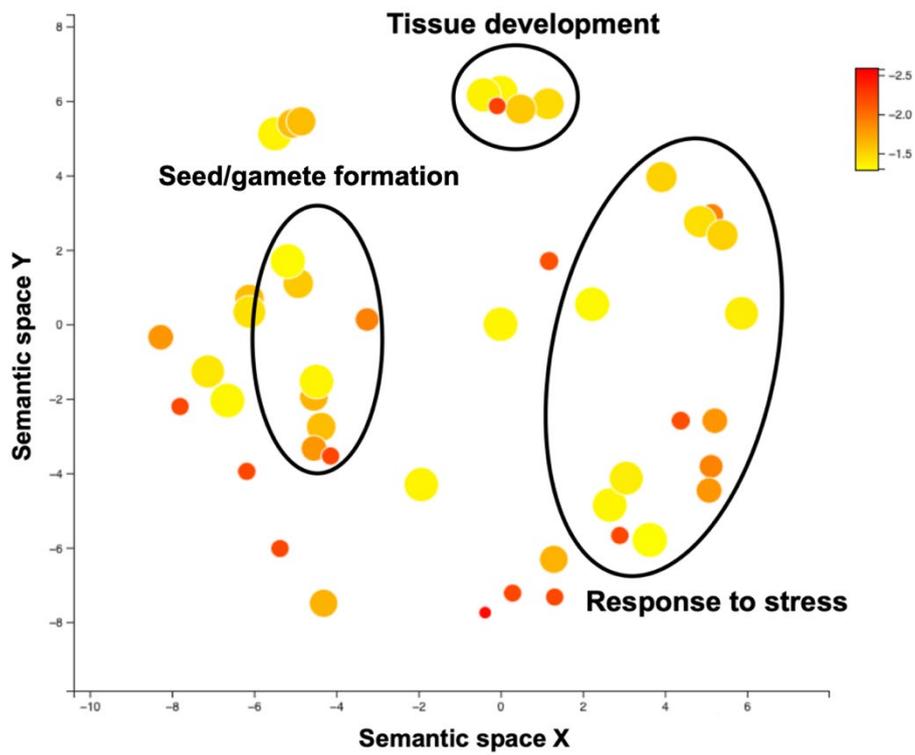


FIGURA 2 | Gráfico semántico en dos dimensiones indicando los términos de ontología génica en los que se clasifican los genes de *Arabidopsis thaliana* asociados a la eficacia de transmisión por semilla de CMV. La escala de colores indica el nivel de significación del enriquecimiento en cada término de ontología génica ($-\log_{10}(p)$). El diámetro de los puntos indica el grado de enriquecimiento.



Fotografía del acto de Lectura y Defensa. De izquierda a derecha: Aurora Fraile Pérez, Fernando García-Arenal Rodríguez, Araceli Castillo Garriga, Alberto Cobos Piñuela, Jesús Israel Pagán Muñoz, Tomas Canto Ceballos, y Pedro Gómez López.

Publicaciones derivadas de este trabajo:

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han sido publicados en revistas indexadas (SCI, Science Citation Index):

- Montes, N; **Cobos, A**; Gil-Valle, M; Caro, E; Pagán, I (2021) *Arabidopsis thaliana* genes associated with *Cucumber mosaic virus* virulence and their link to virus seed transmission. *Microorganisms* 9: 692.
- **Cobos, A**; Montes, N; López-Herranz, M; Gil-Valle, M; Pagán, I (2019) Within-host multiplication and speed of colonization as infection traits associated with plant virus vertical transmission. *Journal of Virology* 93: e01078-19.

Otras publicaciones en revistas SCI indirectamente relacionadas con la tesis doctoral:

- Gutiérrez-Sánchez, A; **Cobos, A**; López-Herranz, M; Canto, T; Pagán, I (2023) Environmental conditions determine infection risk by modulating plant virus vertical transmission and viability of infected seeds. *Phytopathology*. Publicado online.