TESIS DOCTORAL

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

"Molecular and biological characterization of the mycovirome of *Botrytis cinerea* and development of mycoviral reverse genetic systems". Tesis Doctoral realizada en la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

DOCTORANDA: Ana Ruiz Padilla

PROGRAMA DE DOCTORADO: Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados (UPM).

DIRECTORES: María Angeles Ayllón Talavera (Universidad Politécnica de Madrid, UPM).

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta tesis doctoral se realizó en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). La tesis ha ha sido financiada por el proyecto VIROPLANT, European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program (Grant Agreement number 773567).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 27 de noviembre de 2023. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Fernando García-Arenal Rodríguez (Presidente), Soledad Sacristán Benayas (Secretaria), Dolores Fernández Ortuño (Vocal), Massimo Turina (Vocal) y Julio Javier Diez Casero (Vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN:

Botrytis cinerea es un hongo patógeno de plantas que causa podredumbre gris en más de 3000 especies de plantas, incluyendo más de 200 cultivos. Se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y causa importantes pérdidas económicas en cultivos como la vid, tomate, o pimiento, entre otros. Existen diversos factores que lo hacen uno de los principales hongos patógenos del mundo. En primer lugar, además de presentar una amplia gama de huéspedes, posee diversas formas de infección y supervivencia que incluyen esporas, micelio y esclerocios. Estas estructuras pueden infectar distintas partes de la planta en campo, y a los frutos en postcosecha. En segundo lugar, *B. cinerea* presenta una gran plasticidad genética que le permite generar resistencia a fungicidas en un tiempo corto. La principal medida de control de *B. cinerea*

es la aplicación de fungicidas químicos, pero debemos encontrar alternativas más respetuosas con el medio ambiente, que eviten la generación de resistencias en el hongo, y que puedan ser usadas en estrategias de control integrado. En la búsqueda de soluciones alternativas más sostenibles el uso de micovirus se encuentra en pleno proceso de investigación.

Los micovirus son virus que infectan a hongos de manera natural. A pesar de que la mayoría de micovirus no presentan ningún efecto observable en el fenotipo del hongo, existen cada vez más ejemplos de micovirus que son capaces de reducir la virulencia de los hongos en la planta. Esta tesis tiene como objetivo caracterizar el micoviroma del hongo *B. cinerea* en aislados de campo procedentes de vid, para así poder proponer nuevas vías de control biológico basadas en el uso de micovirus. En este trabajo se obtuvo una colección de aislados de campo de *B. cinerea* que se encontraron infectando racimos de uvas de viñedos de diferentes regiones de España (Jerez, La Rioja, Penedés y Ribera del Duero) y de Italia (Piemonte, Lombardia, Véneto, Basilicata y Sicilia). A partir de la colección obtenida, se llevó a cabo una caracterización biológica de los aislados de España para determinar su fenotipo y su virulencia, e identificar aislados hipovirulentos para, posteriormente, asociar la disminución de virulencia con la presencia de determinados micovirus. Los datos obtenidos muestran que algunos de los aislados son hipovirulentos, y que esa característica puede estar asociada con la presencia de micovirus. Por otra parte, se determinó el micoviroma de las colecciones de España e Italia mediante secuenciación masiva de ARN total (RNA-Seq). Los datos obtenidos de RNA-Seq fueron analizados mediante un pipeline bioinformático y se detectaron un total de 92 micovirus. Los micovirus identificados pertenecían a diversas familias de virus con genomas de ARN de simple cadena y sentido positivo y negativo, de ARN de doble cadena y de ADN de simple cadena circular. Algunos de los virus identificados pertenecían a grupos que no habían sido asociados previamente a *B. cinerea* como narnavirus y micovirus tipo alfavirus, umbravirus y timovirus de ARN de simple cadena positiva; virus bisegmentados y tetrasegmentados de ARN de doble cadena; un virus trisegmentado de ARN de simple cadena negativa y un virus de DNA de simple cadena circular. Entre los resultados más relevantes obtenidos, se descubrieron los primeros micovirus trisegmentados relacionado filogenéticamente con los narnavirus, Botrytis cinerea binarnavirus 1, 2, 3 y 5 (BcBNV1, 2, 3, y 5), que tienen el gen que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) dividido en dos segmentos genómicos; se identificó el primer virus trisegmentado tipo bunyavirus, Botrytis cinerea bocivirus 1, con segmentos genómicos monocistrónicos que codifican para una RdRp, una proteína de cápsida y una proteína hipotética relacionada con las proteínas de movimiento de virus de plantas. Adicionalmente, se identificó el primer micovirus tetrasegmentado de ADN de simple cadena de circular perteneciente a la

familia *Genomoviridae*, Botrytis cinerea ssDNA virus 1 (BcssDV1). BcBNV2 y BcssDV1 han sido caracterizados molecularmente en detalle en esta tesis doctoral. Adicionalmente, se intentó la construcción de un clon de cDNA basado en BcBNV2 para determinar los requerimientos del micovirus para replicar su genoma usando dos proteínas independientes que deben constituir una RdRp funcional. El desarrollo de sistemas genéticos reversos basados en micovirus es útil para realizar estudios de genómica funcional del hongo. Para ello se caracterizó molecularmente un virus previamente identificado infectando *B. cinerea* en distintas partes del mundo, Botrytis virus F (BVF), y se usó para construir un clon infeccioso. La construcción del clon infeccioso fue exitosa y permitió determinar la región promotora de la síntesis del RNA subgenómico para la traducción de su proteína de cápsida, y el efecto de la infección sobre el fenotipo de dos cepas del hongo, una cepa de laboratorio libre de virus, y una cepa de campo infectada con otros dos micovirus. El no efecto sobre el fenotipo del hongo, o la disminución de la virulencia de la cepa del hongo infectada con otros micovirus, lo convierten en un candidato ideal para usarlo en estrategias de control biológico o biotecnológico.

En resumen, los resultados de esta tesis han permitido ampliar el conocimiento de la gran diversidad micoviral existente, de la transferencia horizontal de micovirus entre diferentes hongos, pero también de eventos de cruces de virus entre reinos, frecuentemente, hongos y plantas; y generar herramientas que pueden ser usadas en estrategias de control biológico y para el estudio de las interacciones entre micovirus, hongos y plantas.

La doctoranda, y algunos de los miembros del tribunal y directores después de la defensa de la tesis. De izquierda a derecha: Julio Javier Diez Casero (Vocal), Dolores Fernández Ortuño (Vocal), Ana Ruiz Padilla (Doctoranda), María Angeles Ayllón Talavera (Directora de la tesis), Fernando García-Arenal Rodríguez (Presidente), Massimo Turina (Vocal) y Soledad Sacristán Benayas (Secretaria).

Trabajos derivados de la Tesis:

-Ruiz-Padilla A, Rodríguez-Romero J, Gómez-Cid I, Pacifico D, Ayllón MA. Novel Mycoviruses Discovered in the Mycovirome of a Necrotrophic Fungus. mBio. 2021 May 11;12(3):e03705-20. doi: 10.1128/mBio.03705-20.

-Córdoba L, Ruiz-Padilla A, Rodríguez-Romero J, Ayllón MA. Construction and Characterization of a Botrytis Virus F Infectious Clone. J Fungi (Basel). 2022 Apr 29;8(5):459. doi: 10.3390/jof8050459.

- Ruiz-Padilla A, Turina M, Ayllón MA. Molecular characterization of a tetra segmented ssDNA virus infecting Botrytis cinerea worldwide. Aceptado en Virology Journal. 2023.

-Ruiz-Padilla A, Rodríguez-Romero J, Pacifico D, Chiapello M, Ayllón MA. Determination of the mycovirome of a necrotrophic fungus. Vitantonio Pantaleo and Laura Miozzi (Eds): *Viral Metagenomics*, Methods in Molecular Biology, Vol. 2732, Springer. 2023.

-Córdoba L, Ruiz-Padilla A, Pardo-Medina J, Rodríguez-Romero J, Ayllón MA. Construction of a mycoviral infectious clone for reverse genetics in *Botrytis cinerea*. Carlos Medina and Francisco Javier López-Baena (eds.), *Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 2751, Springer. 2023.