UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos

Arabidopsis thaliana
**como modelo de estudio de la coevolución
planta-virus**

Nuria Montes Casado
Máster en Biotecnología Agroforestal

TESIS DOCTORAL
Madrid, 2016

CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA Y GENÓMICA DE PLANTAS
UPM-INIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ARABIDOPSIS THALIANA
COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA
COEVOLUCIÓN PLANTA-VIRUS

TESIS DOCTORAL

NURIA MONTES CASADO
Máster en Biotecnología Agroforestal

Director de tesis:
FERNANDO GARCÍA-ARENAL RODRÍGUEZ
Dr. Ingeniero Agrónomo

2016

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ARABIDOPSIS THALIANA
COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA
COEVOLUCIÓN PLANTA-VIRUS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
NURIA MONTES CASADO

Director
Dr. Fernando García-Arenal Rodríguez

Doctorando
Nuria Montes Casado

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

(D-15)

Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día de de 20

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa y lectura de Tesis el día de de 20

En el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA.

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

EL SECRETARIO

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada en el grupo de investigación Interacción y Coevolución Planta-Virus dirigido por el Dr. Fernando García-Arenal Rodríguez perteneciente al Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA, CBGP-UPM-INIA. Me gustaría expresar mi agradecimiento a las siguientes personas por su contribución en la elaboración de presente trabajo:

Dr. Fernando García-Arenal Rodríguez por dirigir este trabajo, por mi formación científica y por desarrollar mi pensamiento crítico. Además, quería destacar su infinita paciencia y dedicación a esta tesis y a mi formación.

Dres. Aurora Fraile Pérez e Israel Pagán Muñoz por sus numerosos y acertados comentarios científicos a este trabajo, así como sus ayudas en el trabajo de campo y en el laboratorio.

Dr. Carlos Alonso-Blanco (Centro Nacional de Biotecnología, CNB) por proporcionar todos los individuos y poblaciones de arabidopsis listadas en esta tesis y por sus enseñanzas sobre genética poblacional.

Dres. Stéphan Blanc (L'Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Montpellier, Francia), Anne Simon (Universidad de Maryland, USA) y Fernando Ponz Ascaso (CBGP-UPM-INIA, Madrid, España) por proporcionar los clones infecciosos de los virus CaMV-Cabb B-JI, TCV-M y TuMV-UK1, respectivamente y a la Dr Isabelle Jupin (Institut Jacques Monod, París, Francia) por proporcionar el clon para la elaboración de la sonda para la detección de TYMV.

A Antolín López Quirós, Sara García Figuera, León Fernández Castro y Alfonso de Lossada Juste, por su excelente ayuda técnica sin la cual este trabajo no habría sido posible.

Este trabajo ha sido financiado en parte, con una beca de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación del Ministerio de Economía y Competitividad de España (BES-2009-026698) y los contratos asociados a los proyectos BBVA-BIOCON05/081 y AGL2011-22625.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY

XV

1. INTRODUCCIÓN	21
1.1 Los virus como parásitos de plantas	23
1.2 Mecanismos de defensa de las plantas a los virus	26
1.2.1 Resistencia	26
1.2.1.1 Resistencia cualitativa	27
1.2.1.2 Resistencia cuantitativa	28
1.2.2 Tolerancia	29
1.2.3 Efecto de la resistencia y la tolerancia sobre las poblaciones de los virus de plantas	31
1.2.4 Costes de la defensa y la infectividad/patogénesis	33
1.2.5 Compromisos entre resistencia y tolerancia	34
1.3 Condiciones para que se de coevolución	36
1.3.1 Coevolución y gama de huésped	39
1.4 Arabidopsis thaliana (L.) Heynh	40
1.4.1 Variación natural de arabidopsis	43
1.5 El virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus, CMV)	46
1.5.1 Estructura genómica y de la partícula viral	46
1.5.2 Epidemiología	49
1.5.3 Adaptación a huésped	50
2. OBJETIVOS	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1 Material biológico y su preparación	59
3.1.1 Material vegetal	59
3.1.2 Virus	60
3.2 Muestro en poblaciones silvestres de arabidopsis	61
3.3 Detección de virus	63
3.4 Inoculación de CMV en arabidopsis	64
3.5 Análisis de la multiplicación de CMV	65
3.6 Estima del efecto de CMV sobre la historia vital de arabidopsis	65
3.7 Determinación de la secuencia de nucleótidos de los genomas de los aislados de CMV	66
3.8 Obtención de los datos meteorológicos y ambientales	67
3.9 Análisis genéticos	68
3.9.1 Estima de los valores de heredabilidad de la resistencia y la tolerancia a CMV	68
3.9.2 Estima de los valores de los índices de diferenciación poblacional de caracteres cuantitativos (Q_{ST}) y de fijación de Wright (F_{ST}) y su comparación	69

3.9.3 Análisis espacial de la tolerancia y la resistencia a CMV de las poblaciones naturales de arabidopsis de la Península Ibérica.....	70
3.9.4 Estima de las distancias genéticas entre los individuos de arabidopsis	70
3.9.5 Estima de las distancias genéticas y de las relaciones filogenéticas entre los aislados de CMV	70
3.10 Análisis estadísticos	72
4. RESULTADOS	75
4.1 Análisis de la incidencia de los virus en las poblaciones silvestres de arabidopsis	77
4.1.1 Demografía de arabidopsis	77
4.1.2 Análisis de la incidencia de virus en las poblaciones de arabidopsis	81
4.1.2.1 Variación temporal y espacial de la incidencia máxima de virus	81
4.1.2.2 Relación entre la incidencia de virus y la fenología del huésped.....	84
4.1.2.3 Relación entre la incidencia de virus y la densidad del huésped	86
4.1.2.4 Relación de la incidencia máxima de virus y los factores meteorológicos	87
4.2 Variación genética y estructura espacial de la resistencia y la tolerancia a CMV en arabidopsis	90
4.2.1 Diseño experimental	90
4.2.2 Variación genética de la resistencia y la tolerancia a CMV en arabidopsis.....	92
4.2.2.1 Variación genética de la resistencia a CMV	92
4.2.2.1.1 Variación genética de la resistencia a CMV en el Ambiente 1	92
4.2.2.1.2 Variación genética de la resistencia a CMV en el Ambiente 2	98
4.2.2.1.3 Efecto del ambiente en la resistencia a CMV	103
4.2.2.2 Variación genética de la tolerancia a CMV	107
4.2.2.2.1 Variación genética de la tolerancia a CMV en el Ambiente 1	107
4.2.2.2.2 Variación genética de la tolerancia a CMV en el Ambiente 2	112
4.2.2.2.3 Efecto del ambiente en la tolerancia a CMV	117
4.2.3 Expresión de la tolerancia a CMV	120
4.2.3.1 Relación entre la tolerancia a CMV y el grupo alométrico.....	121
4.2.3.2 Relación entre la tolerancia a CMV y la duración del ciclo vital	124
4.2.3.3 Relación entre la resistencia y la tolerancia a CMV.....	127
4.2.4 Estructura espacial de la resistencia y la tolerancia a CMV	127
4.2.4.1 Estructura espacial de la resistencia a CMV.....	127
4.2.4.2 Estructura espacial de la tolerancia a CMV	131
4.3 Relación entre las defensas a CMV y el medio abiótico	135
4.3.1 Diseño experimental	135
4.3.2 Diferencias ambientales entre las localidades de origen de los individuos de arabidopsis.....	136
4.3.3 Variación de los caracteres de la historia vital y las defensas a CMV entre individuos de arabidopsis de la Península Ibérica.....	139

4.3.4 Relación entre las variables ambientales y las defensas a CMV	142
4.3.5 Relación entre las defensas a CMV y los grupos genéticos de arabidopsis descritos en la Península Ibérica	147
4.4 Adaptación a huésped de CMV	149
4.4.1 Diseño experimental	149
4.4.2 Multiplicación de CMV en arabidopsis y en melón.....	150
4.4.3 Virulencia de CMV en arabidopsis y melón.....	154
4.4.4 Relación entre los aislados de CMV de arabidopsis y cucurbitáceas	158
5.DISCUSIÓN	163
5.1 Dinámica de las infecciones virales en poblaciones silvestres de arabidopsis	166
5.2 Evidencia de coevolución arabidopsis-CMV	170
5.2.1 Variación genética de las defensas de arabidopsis a CMV e interacción entre los genotipos del huésped y del patógeno	170
5.2.2 Selección de la resistencia y la tolerancia de arabidopsis a CMV	175
5.2.3 Respuesta evolutiva de CMV a las defensas de arabidopsis	179
6. CONCLUSIONES	183
7. BIBLIOGRAFÍA	187
ANEJO 1	219
ANEJO 2	249
ANEJO 3	271
ANEJO 4	309

RESUMEN/SUMMARY

El efecto negativo que causan los patógenos sobre las eficacias biológicas de sus huéspedes se denomina virulencia. Como consecuencia de este efecto, los huéspedes han desarrollado mecanismos de defensa para evitar o limitar el daño producido por los patógenos. Estos mecanismos de defensa de los huéspedes reducen a su vez la eficacia biológica de los patógenos. Por tanto, los mecanismos de virulencia y de defensa imponen presiones de selección recíprocas sobre las poblaciones de los huéspedes y los patógenos. Así, los patógenos evolucionarán para generar nuevos mecanismos de virulencia que les permitan eludir las defensas de los huéspedes. A su vez, los huéspedes evolucionarán para generar nuevas defensas más eficaces frente a los nuevos mecanismos de virulencia de los patógenos. Esta “carrera de armamentos” pueden originar un proceso coevolutivo, definiendo coevolución como el cambio genético adaptativo recíproco en dos o más poblaciones. Para que se de coevolución huésped-patógeno han de cumplirse las siguientes condiciones: 1) variación genética de los caracteres relevantes para la interacción huésped patógeno, como la virulencia y las defensas, 2) la interacción huésped-patógeno ha de depender de la naturaleza de los genotipos del huésped y del patógeno, 3) los caracteres implicados en la interacción deben tener efectos recíprocos en las eficacias biológicas de las dos poblaciones y 4) deben producirse cambios temporales en las frecuencias de los genotipos en las poblaciones de huésped y patógenos.

La coevolución huésped-patógeno se acepta comúnmente aunque la evidencia que la demuestra es limitada, sobretudo en interacciones planta-virus. La evidencia de coevolución tiene que derivarse de un sistema silvestre en el que no haya existido, ni exista, manipulación humana sobre la población del huésped o del patógeno. Por ello, en esta tesis se analiza la coevolución planta-virus en el patosistema silvestre compuesto por el huésped *Arabidopsis thaliana* y el virus del mosaico del pepino (*Cucumber mosaic virus*, CMV).

El análisis de la incidencia de cinco virus en cinco poblaciones silvestres de *A. thaliana* de la Meseta Central de la Península Ibérica durante 9 años, demostró que el virus de mayor incidencia es CMV. Además, la incidencia de CMV fue máxima en las primeras fases del ciclo vital de las plantas, y las infecciones por CMV en los estados iniciales del desarrollo del huésped son más graves. Por ello, CMV podría ser un factor importante en la evolución de las poblaciones de *A. thaliana* y por tanto un patógeno adecuado para analizar si hay evidencia de coevolución planta-virus.

Los mecanismos de defensa más importantes de las plantas a los virus son la resistencia y la tolerancia. Para analizar la variabilidad de la resistencia y la tolerancia a CMV de *A. thaliana*, condición necesaria para que exista coevolución, se seleccionaron 12 poblaciones silvestres de *A. thaliana* de la Península Ibérica de las cuales se muestrearon 10 individuos al azar y se analizó su respuesta a la infección por dos aislados de CMV en dos ambientes diferentes. La resistencia y la tolerancia a CMV se cuantificaron como la acumulación viral y el efecto de la infección sobre la producción de semillas, respectivamente. En los dos ambientes, la resistencia y la tolerancia de *A. thaliana* a CMV variaron genéticamente entre individuos y poblaciones. Además, la resistencia y la tolerancia a CMV dependieron de la interacción del genotipo del huésped y del patógeno. Por tanto, estos resultados son compatibles con una hipótesis de coevolución *A. thaliana*-CMV ya que verifican dos de las condiciones necesarias para que se de coevolución huésped-patógeno.

Para analizar si los dos caracteres de defensa se encuentran bajo selección se estimó y comparó el coeficiente de diferenciación genética para caracteres cuantitativos (Q_{ST}) y el coeficiente de diferenciación genética para marcadores neutrales (F_{ST}). Los valores de Q_{ST} de la resistencia y de la tolerancia a CMV en los dos ambientes fueron inferiores a los valores de F_{ST} , lo que indica que la diferenciación genética de la resistencia y la tolerancia a CMV entre poblaciones es menor de lo esperado por el azar, resultado compatible con que estén bajo selección. Además, la diferenciación genética para los marcadores neutrales sigue a un patrón de aislamiento por distancia, lo que no ocurre con la diferenciación genética de la resistencia ni la tolerancia a CMV. Por tanto, los dos caracteres de defensa de *A. thaliana* a CMV están bajo selección uniforme y la evolución favorece una mayor diversidad genética de ambos caracteres dentro que entre las poblaciones.

La variabilidad genética de un carácter, y por tanto su evolución, puede estar relacionada con la variación de factores ambientales. También, cabe la posibilidad de que los caracteres de defensa de *A. thaliana* a CMV estén ligados a otros caracteres cuya variación genética esté condicionada por factores ambientales distintos de la infección por virus. Por todo ello, se analizó la relación entre la variación de la resistencia y de la tolerancia a CMV de 77 individuos de *A. thaliana* de la Península Ibérica y diferentes factores del medio abiótico de las localizaciones de origen de los individuos. Los resultados indicaron que la variación de las dos defensas a CMV de *A. thaliana* no estaba relacionada con la de los factores del medio abiótico, a diferencia de otros caracteres de la historia vital de la planta en ausencia de infección por CMV. Además, la resistencia y la tolerancia a CMV, no están relacionadas con

la estructura genética de *A. thaliana* en la Península Ibérica. En consecuencia, la variabilidad genética de la resistencia y la tolerancia a CMV de *A. thaliana* no está determinada por la adaptación de la especie al medio abiótico, y por tanto este resultado es compatible con que la selección a la que están sometidos ambos caracteres de defensa se debe a la infección por CMV.

Por último se analizó si diferentes aislados de CMV procedentes de *A. thaliana* están adaptados a su huésped, lo que puede ser evidencia de la evolución de estos aislados para contrarrestar las defensas de *A. thaliana*. Para ello se comparó un conjunto de aislados de CMV procedentes de *A. thaliana* y otro procedente de especies de cucurbitáceas, que se inocularon en 21 individuos de *A. thaliana* de diferentes poblaciones de la Península Ibérica y en melón. Los resultados indicaron que los aislados de *A. thaliana* se multiplicaron mejor en *A. thaliana* que los de cucurbitáceas y los aislados de cucurbitáceas se multiplicaron mejor en melón que en *A. thaliana*. Además, el análisis de la secuencia de nucleótido de los genomas de estos aislados indicó una estructuración genética según su huésped de origen. Todos estos resultados indican adaptación a huésped en CMV, y apoyan la hipótesis de evolución de CMV en respuesta a las defensas de *A. thaliana*.

Por tanto, los resultados de esta tesis verifican varias de las condiciones necesarias para que se de coevolución planta-virus en el sistema *A. thaliana*-CMV.

Pathogen infection results in damage to the host, which can be quantified as a reduction of the host fitness. Hosts have developed different defence strategies to avoid or limit pathogen infection. As host defences may reduce the fitness of the pathogen, host and pathogen may co-evolve, defining co-evolution as the process of reciprocally adaptive genetic change in two or more populations. Four conditions should be met for host-pathogen co-evolution: 1) genetic variation in the relevant host and pathogen traits; 2) dependence of the outcome combination of host and pathogen genotypes involved; 3) reciprocal effects of the relevant traits of the interaction on the fitness of the host and the pathogen and 4) changes in genotype frequencies in both the host and the pathogen populations.

It is currently assumed that hosts and pathogens co-evolve, but there is surprisingly little evidence in the case of plant-virus interactions. Evidence for plant-virus co-evolution would require the analysis of systems in which the host might evolve in response to virus infection, i.e. virus–host systems involving wild hosts in natural ecosystems. Therefore, in this thesis, *Arabidopsis thaliana* was chosen as a host and Cucumber mosaic virus as a pathogen to approach the analysis of plant-virus co-evolution in a natural ecosystem.

The incidence of five viruses in five wild populations of *A. thaliana* in Central Spain was monitored over nine years to determine the role of viral infections on the population dynamics of *A. thaliana*. CMV was the virus with the highest incidence, which CMV was maximal when the most, or a large fraction, of plants in the populations, were at the primary stages of development, in which CMV infections are most negative for *A. thaliana*'s fitness. These results suggest that CMV infection could be a selection force on the analysed *A. thaliana* populations and that the wild system *A. thaliana*-CMV is a good one to seek evidence of plant-virus co-evolution.

The most important defence mechanisms of plants against their viruses are resistance and tolerance. To determine the variation of resistance and tolerance of *A. thaliana* to CMV, ten randomly sampled individuals from 12 wild populations were assayed for their resistance and tolerance to infection by two isolates of CMV in two environmental conditions. Resistance was estimated as viral accumulation and tolerance as the effect of viral infection on seed production. Results showed evidence of genetic variation of resistance and tolerance to CMV within and between populations, and this variation was higher within than between populations. In addition, resistance and tolerance depended on the specific virus genotype x host genotype interaction. Therefore, these results are compatible with the hypothesis of plant-

virus co-evolution, because they show evidence for two of the conditions required for host-pathogen co-evolution.

To determine if the two defence characters are under selection, genetic differentiation for the quantitative traits of resistance and tolerance to CMV was estimated between populations (Q_{ST}) and compared with genetic differentiation for neutral markers (F_{ST}). Q_{ST} for resistance and tolerance to CMV were significantly lower than F_{ST} in two environmental conditions, suggesting that both characters are under selection. In addition, the significant correlations detected between F_{ST} and geographic distances indicated the presence of a geographic pattern derived from the demographic history of these populations. By contrast, these populations did not show a significant pattern of isolation by distance when comparing Q_{ST} values for resistance or tolerance to CMV. Therefore, resistance and tolerance of *A. thaliana* to CMV are under uniform selection and evolution favours greater genetic variation of both characters within populations than between populations.

It is possible that the genetic variation and evolution of traits can be related to variation of environmental factors such as temperature or precipitation. Resistance and tolerance of *A. thaliana* can also be related to environmental factors or other traits in which genetic variation is related to environmental factors apart from viral infections. To explore these possibilities, the relationship between phenotypic variation of resistance and tolerance to CMV and abiotic factor variation was analysed for 77 geo-referenced individuals of *A. thaliana* from the Iberian Peninsula. Results indicated that resistance and tolerance of *A. thaliana* to CMV were not related to the abiotic factors analysed. However, other life history traits of uninfected plants were related to these factors. Also, neither defence mechanism was related to the genetic structure of the species in the Iberian Peninsula. Consequently, the genetic variation of resistance and tolerance of *A. thaliana* to CMV is not determined by plant adaptation to abiotic factors, and therefore this result is compatible with the hypothesis that CMV infection could be the selection force acting on resistance and tolerance.

Finally, we have analysed if different genotypes of CMV isolated from *A. thaliana* are adapted to their host, which can be evidence of evolution of these isolates in response to *A. thaliana*'s defences. For this, two groups of CMV isolates, one from *A. thaliana* and another from cucurbit crops, were compared. All CMV isolates were inoculated into 21 individuals of *A. thaliana* from different populations of the Iberian Peninsula and into melon. Results indicated that the accumulation of CMV isolates from *A. thaliana* was higher in *A. thaliana* than in melon; and the accumulation of CMV isolates from cucurbits was higher in melon than