UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**PAPEL RELEVANTE DE LA PROTEÍNA P3 DEL VIRUS DEL MOSAICO
DEL NABO (TUMV) EN LA ALTERACIÓN DEL PATRÓN DE DESARROLLO
DE PLANTAS INFECTADAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.**

TESIS DOCTORAL

Silvia López González

Licenciada en Biología

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA Y GENÓMICA DE
PLANTAS (UPM-INIA)

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**PAPEL RELEVANTE DE LA PROTEÍNA P3 DEL VIRUS DEL MOSAICO
DEL NABO (TUMV) EN LA ALTERACIÓN DEL PATRÓN DE DESARROLLO
DE PLANTAS INFECTADAS DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.**

Trabajo realizado en el laboratorio de Biotecnología de virus de plantas del
CBGP, bajo la dirección del Dr. Fernando Ponz

Vº Bº del Director

La Doctoranda

Fernando Ponz Ascaso

Silvia López González

Doctor en Bioquímica y

Licenciada en Biología

Biología Molecular

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

Presidente: Vicente Pallás Benet

Secretaria: Lucía Jordá Miró

Vocal: Eduardo Rodríguez Bejarano

Vocal: Carmen Hernández Fort

Vocal: María Dolores Rodríguez Martín

Suplente: Pilar Carbonero Zalduegui

Suplente: Ana Montserrat Martín Hernández

Realizada la defensa y lectura de Tesis el día 11 de julio de 2018 en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Sistemas.

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

EL SECRETARIO

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

La realización de la tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Sánchez, F., Manrique, P., Mansilla, C., Lunello, P., Wang, X., Rodrigo, G., López-González, S., Jenner, C., González-Melendi, P., Elena, S.F., Walsh, J., Ponz, F. (2015) Viral strain-specific differential alterations in *Arabidopsis* developmental patterns. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 1304-1315.

López-González, S., Aragonés, V., Daròs, J.-A., Sánchez, F., Ponz, F. (2017) An infectious cDNA clone of a radish-infecting *Turnip mosaic virus* strain. *Eur J Plant Pathol* **148**, 207-211.

Vijayan, V.*, López-González, S.*, Sánchez, F., Ponz, F., Pagán, I. (2017) Virulence evolution of a sterilizing plant virus: Tuning multiplication and resource exploitation. *Virus Evolution* **3**, vex033-vex033. *Ambos primeros autores.

Sardaru, P., Sinausia, L., López-González, S., Zindovic, J., Sánchez, F., Ponz, F. (2018) The apparent non-host resistance of Ethiopian mustard to a radish-infecting strain of Turnip mosaic virus is largely determined by the C-terminal region of the P3 viral protein. *Mol Plant Pathol* DOI: 10.1111/mpp.12674.

RECONOCIMIENTOS

La siguiente Tesis doctoral se ha llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Fernando Ponz Ascaso, profesor de investigación de OPIs del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (UPM-INIA) y ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Las personas citadas a continuación han contribuido a la obtención de los resultados mostrados en este trabajo, y por ello quiero reconocer:

Al Dr. Fernando Ponz su dirección, dedicación y apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo. Agradecer también, la confianza depositada en mí para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Flora Sánchez por su inestimable esfuerzo, dedicación y apoyo, sin los cuales no habría sido posible el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Fernando García-Arenal por ofrecerse a ser mi tutor en la Universidad Politécnica de Madrid.

A D^a Lucía Zurita por su apoyo técnico durante toda la tesis doctoral.

Al Dr. Pablo González-Melendi por sus enseñanzas en el campo de la microscopía.

A D^a Beatriz Mora por su apoyo técnico en la preparación y procesamiento de muestras para microscopia.

Al Dr. Miguel Ángel Blázquez y, a todo su grupo de investigación, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y caracterizar el comportamiento de los transportadores PIN durante la infección viral.

A la Dra. Lacey Sammuels y el Dr. Mathias Schuetz por brindarme la oportunidad de realizar mi estancia internacional en su laboratorio y ayudarme a realizar la caracterización de la pared celular secundaria.

Al Dr. Vicente Pallás por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar diferentes estancias.

Al Dr. José Antonio Navarro su valiosísima orientación, dedicación y contribución en la caracterización del comportamiento subcelular de la proteína P3.

A los miembros de los servicios del Invernadero, Administración y Esterilización por su inestimable labor, sin la cual no habría sido posible el correcto desarrollo de esta tesis doctoral.

A mis padres y abuelos

RESUMEN

El virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) es un virus de RNA de polaridad positiva, con un genoma de unos 10 kb, perteneciente al género *Potyvirus*. A diferencia de otros potyvirus, TuMV presenta un amplio abanico de huéspedes (más de 300 especies vegetales) entre los cuales se encuentra la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y otras plantas cultivadas de gran interés económico.

Las infecciones por TuMV tienen asociados síntomas muy diversos, los cuales van desde las clásicas necrosis, mosaicos, amarillos y claramiento de venas, a alteraciones en el desarrollo y el crecimiento. Los aislados de la cepa genética MB (aislado tipo, UK1) se caracterizan fundamentalmente por detener el desarrollo y el crecimiento, mientras que los aislados MR (aislado tipo, JPN1) presentan un menor retraso del crecimiento y una alteración del desarrollo del tallo floral y la arquitectura global de la planta que cursa con una fuerte pérdida de la dominancia apical y un patrón anormal de la cinética de aparición de flores.

En este trabajo se reporta por primera vez la obtención de un clon infectivo del aislado JPN 1. La generación de esta herramienta junto a la disponibilidad del clon infectivo de UK 1 permitieron establecer que el determinante viral responsable de la elongación del tallo se encuentra en la región C-terminal de la proteína P3, concretamente en la posición 279 de la proteína. Así mismo, el comportamiento subcelular de la proteína P3 difiere entre aislados y parece ser el responsable de los síntomas diferenciales, puesto que ambos fenómenos presentan una estricta correlación. El análisis histológico y genético de tallos infectados por TuMV reveló una importante alteración de la deposición de diferentes componentes de la pared celular secundaria, así como de la expresión de genes responsables de su biosíntesis y regulación.

En esta tesis se aborda por primera vez la caracterización a nivel fenotípico, celular, subcelular y molecular de la alteración de un carácter de desarrollo como es la producción y elongación del tallo floral en el patosistema Virus del mosaico del nabo/*Arabidopsis thaliana*.

ABSTRACT

Turnip mosaic virus (TuMV) belongs to the genus *Potyvirus* in the family *Potyviridae*. The TuMV genome is composed of a positive-sense single-stranded RNA molecule of about 10 kb in length. TuMV is a potyvirus with a very wide host range (that includes over 300 plant species) including the plant model system *Arabidopsis thaliana* and another cultivated plants of great economical interest.

TuMV infections have very distinct symptoms, like the classical necrosis, mosaic, chlorotic lesions, yellowing of leaves and vein clearing, as well as development and growth alterations. The isolates from genetic strain MB (UK1) strongly arrest growth and development, while the isolates MR (JPN1) show a delay in growth and an alteration in the development of the flower stem and the global architecture of the plant, which implies a strong loss of apical dominance and an abnormal pattern in the flower emergence kinetics.

This thesis reports, for the first time, the construction of an infectious clone of the TuMV isolate JPN 1. The availability of the infective clone of JPN 1 and UK 1 made it possible to establish that the viral determinant responsible for stem elongation is found in the C-terminal region, specifically at position 279 of the P3 protein. Likewise, the subcellular behavior of the P3 protein differs between isolates, and it looks like it might be responsible for differential symptoms. The histological and genetic analyses revealed the dramatic changes on the expression of the genes involved in the biosynthesis and regulation of the cell wall.

The results obtained have allowed the phenotypical, cellular, subcellular and molecular characterization of the floral stem development in TuMV/*Arabidopsis thaliana* pathosystem.

INTRODUCCIÓN

1. Familia <i>Potyviridae</i>	4
2. Genero Potyvirus	5
3. Ciclo viral de TuMV	7
4. Sistema experimental <i>Arabidopsis thaliana</i> /Virus del mosaico del nabo	12
5. Transporte intracelular de macromoléculas	18
5.1 Ruta secretora o exocítica	18
5.1.1 Vía secretora temprana	19
5.1.2 Secreción directa e independiente de Golgi	20
5.1.3 Secreción mediada por la vacuola o los cuerpos multivesiculares	22
5.1.4 Secreción mediada por el complejo exocístico	22
6. Puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática	22
7. Objetivos	27

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material vegetal	31
1.1 Especies vegetales	31
1.2 Condiciones de cultivo	31
1.2.1 Condiciones de cultivo <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
1.2.2 Condiciones de cultivo <i>Brassica sp.</i> y <i>Raphanus sativus</i>	32
1.2.3 Condiciones de cultivo <i>Nicotiana benthamiana</i>	32
2. Microorganismos	32
2.1 Bacterias	32
2.2 Cultivo de microorganismos	32
2.2.1 Medio Luria-Bertani	32
2.2.2 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	33
2.2.3 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
2.3 Obtención de células competentes	33
2.3.1 Células competentes de <i>Escherichia coli</i>	33
2.3.2 Células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
2.4 Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium</i>	

<i>tumefaciens</i>	34
2.5 Conservación de estirpes bacterianas	35
3.Extracción de ácidos nucleicos	35
3.1 Extracción de ADN plasmídico	35
3.2 Extracción de ARN total	35
3.3 Cuantificación de ácidos nucleicos	35
3.4 Separación y purificación de ácidos nucleicos. Visualización de ADN en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN	36
3.5 Visualización de ARN en geles de agarosa	36
4.Tratamiento enzimático de los ácidos nucleicos.....	37
4.1 Tratamiento de ARN con ADNasa.....	37
4.2 Digestión de ADN con nucleasas de restricción	37
4.3 Desfosforilación de extremos del ADN	37
4.4 Ligación de fragmentos de ADN	37
5.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	38
5.1 PCR convencional.....	38
5.2 Comprobación de colonias transformantes mediante PCR	40
5.3 IC-RT-PCR	40
5.4 PCR solapante: mutagénesis dirigida	41
5.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	42
5.5.1 Síntesis de la primera cadena de cADN	42
5.5.2 Condiciones de la RT-qPCR.....	42
5.5.3 Curva de desnaturalización.....	43
5.5.4 Eficiencia de amplificación	43
5.5.5 Cuantificación	43
5.6 Secuenciación automática del ADN	44
6.Manipulación de proteínas	44
6.1 Fraccionamiento microsomal.....	44
6.2 Electroforesis bidimensional.....	45
6.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	45
6.4 Análisis de proteínas mediante Western-blot.....	46
7.Manipulación de microorganismos.....	47
7.1 Agroinfección de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47

7.2	Agroinoculación de <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
7.3	Inoculación mecánica	47
8.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	48
8.1	ELISA indirecto para la detección de Potyvirus	48
9.	Construcciones génicas.....	48
9.1	Construcción del clon infectivo de pGTuMV-JPN 1	48
9.1.1	Construcción de mutantes puntuales sobre el clon infectivo de p35-Tunos	49
9.2	Construcción de mutantes puntuales sobre el clon infectivo de pGTuMV-JPN 150	49
10.	Construcción de vectores para expresión transitoria.....	51
11.	Técnicas microscópicas.....	52
11.1	Microscopía estereoscópica.....	52
11.2	Microscopía óptica	52
11.3	Microscopía laser confocal	52
12.	Técnicas histológicas.....	53
12.1	Fijación de tejidos	53
12.2	Inclusión en agarosa	53
12.3	Inclusión en resina	53
12.4	Tinciones histológicas	54
12.4.1	Tinción con azul de toluidina O.....	54
12.4.2	Tinción de Wiesner (Floroglucinol-HCl)	54
12.4.3	Tinción de blanco de calcoflúor	54
13.	Ensayos de Microscopia confocal.....	55
13.1	Ensayo de despolimerización de microfilamentos de actina y microtúbulos	55
13.2	Ensayo de tinción de la membrana plasmática.....	55
13.3	Ensayos de localización de proteínas virales	55
13.4	Inmunohistoquímica para la detección de hemicelulosas	56
14.	Procesado de imágenes	56
15.	Bases de datos	57
16.	Herramientas bioinformáticas.....	57
16.1	Herramientas de biología molecular.....	57
16.2	Predicción de dominios transmembrana	57
16.3	Generación de modelos tridimensionales	57

16.4	Determinación de potenciales electroestáticos	58
17.	Apéndice	59

CAPÍTULO 1: GENERACIÓN DE UN CLON INFECTIVO DE CADN DE UN AISLADO DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO ESPECIALIZADO EN INFECTAR RÁBANO

1.	Introducción.....	67
2.	Resultados	68
2.1	Infectividad del plásmido pGTuMV-JPN 1	68
2.2	Estudio comparativo de la gama de huésped de los aislados UK 1 y JPN 1	69
3.	Discusión.....	71

CAPÍTULO 2: UN AMINOÁCIDO DE LA REGIÓN C-TERMINAL DE LA PROTEÍNA P3 DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO ES EL RESPONSABLE DE LA ELONGACIÓN DEL TALLO FLORAL Y DEL COMPORTAMIENTO SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA

1.	Introducción.....	75
2.	Resultados	77
2.1	La proteína P3 de TuMV es una proteína periférica de membrana asociada al retículo endoplasmático	77
2.2	El movimiento de las partículas P3 a través del RE es dependiente del sistema actina-miosina	81
2.3	Modelos estructurales de la proteína P3 predicen diferencias relevantes en la región C-terminal de ambos aislados	83
2.4	Un aminoácido altamente conservado de la región C-terminal de la proteína P3 es el determinante principal para la elongación del tallo floral	86
2.5	El cambio de un único aminoácido en la proteína P3 determina el patrón de crecimiento del tallo floral y su patrón de acumulación y movimiento subcelular ..	88
2.6	Las alteraciones en la elongación del tallo floral y el comportamiento subcelular de la proteína P3 puede asociarse a cambios en su exposición al solvente y su potencial electroestático	89
2.7	El comportamiento conjunto de las proteína P3 y 6K2 difiere entre el aislado UK 1 y el aislado JPN 1	93
3.	Discusión	96
4.	Material suplementario	102

CAPÍTULO 3: LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL MOSAICO DEL NABO PROVOCA GRANDES ALTERACIONES EN LA BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR SECUNDARIA DE ARABIDOPSIS

1. Introducción.....	107
1.1 Biogénesis del tejido vascular	108
1.2 Componentes del tejido vascular.....	110
1.3 Pared celular	112
1.3.1 Composición y biosíntesis de la pared celular primaria.....	112
1.3.1.1 Celulosa	113
1.3.1.2 Hemicelulosa	113
1.3.1.3 Pectinas.....	114
1.3.1.4 Proteínas estructurales y solubles	114
1.4 Modificaciones de la pared celular	115
1.5 Biosíntesis de los componentes de la pared celular	115
1.5.1 Celulosa	115
1.5.2 Hemicelulosas.....	116
1.5.3 Pectinas.....	116
1.5.4 Proteínas estructurales: arabinogalactanos.....	117
1.5.5 Lignina.....	117
1.6 Ultraestructura de la pared celular	118
1.6.1 Lámina media	118
1.6.2 Pared celular primaria.....	118
1.6.3 Pared celular secundaria.....	119
1.7 Regulación genética de la biosíntesis de la pared celular secundaria.....	121
1.7.1 Reguladores aguas arriba de los FTs MYB46/MYB83.....	122
1.7.2 Dianas aguas abajo de MYB46 y MYB83.....	123
1.7.3 Reguladores negativos de la biosíntesis de la pared celular secundaria.....	124
2. RESULTADOS	126
2.1 La infección por TuMV afecta el crecimiento secundario de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	126
2.2 La reducción en grosor de los tallos infectados por TuMV viene acompañado de una reducción en el contenido de hemicelulosa y lignina de la pared celular se-	

cundaria.....	126
2.3 La expresión de los genes implicados en la formación de la pared celular secundaria se encuentra alterada por la infección de TuMV	129
2.4 El determinante viral para la elongación del tallo floral, no es el determinante del porte rastrero de las plantas infectadas por JPN 1	131
3. Discusión.....	133

BIBLIOGRAFÍA

Abreviaturas

AGP: arabinogalactano

c-MERS: puntos de asociación entre microtúbulos y el retículo endoplasmático

Cepa MB: *mostly Brassica*

Cepa MR: *mostly Raphanus*

CI: proteína cilíndrica

CM: estructuras intrincadas

COP: coatómeros

CP: proteína de la cápside

CPMV: Virus del mosaico de la carilla

CSC: complejo de la celulosa sintasa

ChFP: proteína roja fluorescente

DMSO: dimetilsulfóxido

DMT: estructura de doble membrana y núcleo electrodenso

DPI: días post infiltración

EPCS: puntos de contacto entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático

ERES: puntos de salida del retículo endoplasmático

ET: elementos traqueales

EXPO: complejo exocístico

FT: factor de transcripción

GFI: glicosilfosfatidilinositol

GFP: proteína verde fluorescente

IFL: mutantes con defectos en las fibras interfasciculares

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

IRX: mutantes con xilema irregular

Lat B: latrunculina B

LM: lámina media

LSP: proteínas sin péptido señal

MVB: cuerpos multivesiculares

NCR: región no codificante

NST: *NAC Secondary wall Thickening promoting factor*

ORF: marco abierto de lectura

PCP: pared celular primaria

PCS: pared celular secundaria

PD: plasmodesmos

PDB: *Protein Data Bank*

PIPO: *Pretty Interesting Potyviridae ORF*

PM: proteína de movimiento

PPU: poro del plasmodesmo

PPV: Virus de la Sharka

PRSV: Virus de las manchas anulares de la papaya

PS: péptido señal

PSbMV: Virus del mosaico del guisante transmitido por la semilla

PVY: Virus Y de la patata

RE: retículo endoplasmático

RHP: dominio de homología a reticulón

RTN: reticulón

SMT: vesículas de membrana simple y forma tubula

SPFMV: Virus del moteado suave de la batata

TGN: región del trans del Golgi

TMD: dominio transmembrana

TMV: Virus del mosaico del tabaco

TOB: azul de toluidina

TuMV: Virus del mosaico del nabo

VND: *Vascular-related NAC Domain*

VRC: complejo de replicación viral

Introducción

Introducción

Los virus son parásitos intracelulares obligados que pueden definirse como el conjunto de una o varias moléculas de ácidos nucleicos encapsidadas dentro de una o varias cubiertas de proteínas o lipoproteínas. Las partículas virales infecciosas o viriones requieren de diferentes componentes del huésped para completar su ciclo vital ya que carecen de metabolismo propio y sistemas de síntesis de proteínas. Los virus son capaces de infectar organismos de los tres dominios de vida (Archaea, Bacteria y Eukarya) y son las entidades biológicas con mayor diversidad y abundancia del planeta.

La naturaleza parasítica obligada de los organismos virales y el secuestro de los recursos del huésped conducen con frecuencia a la patogénesis, también conocida, como la aparición de la enfermedad en el organismo hospedador. Los síntomas asociados a la infección pueden ser visibles a nivel macroscópico o microscópico y manifestarse a nivel local o sistémico. En el caso de las plantas, los síntomas pueden manifestarse en raíces, tallos, flores, frutos y/u hojas. Los síntomas más comunes son los que afectan al desarrollo normal de la planta (enanismo o reducción del tamaño de los entrenudos), la capacidad fotosintética (clorosis, mosaicos, anillos cloróticos o clareamiento de las nervaduras) y muerte de los tejidos (anillos necróticos o necrosis) (figura 1) lo cual provoca pérdidas en cultivos de gran importancia económica (Scholthof y col., 2011).

Figura 1. Sintomatología inducida por distintos tipos de virus de plantas. (A) Virus miraflori de la lechuga (MiLV: *Miraflori lettuce virus* Familia: *Ophioviridae*, Género: *Ophiovirus*). **(B)** Virus del enanismo amarillo de la cebolla (OYDV: *Onion yellow dwarf virus*; Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*). **(C)** Virus de la rotura del color del tulipán (TBV: *Tulip breaking virus*; Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*). **(D)** Virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV: *Papaya ring spot virus*. Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*).

La obligada naturaleza intracelular de los virus los conduce a ser piratas de los procesos celulares establecidos y por tanto herramientas de gran valor añadido para el estudio de

procesos fisiológicos y moleculares de la célula. Dos de los ejemplos que mejor ilustran estos procesos son: el transporte de macromoléculas a nivel intercelular (revisado en Heinlein (2015)) y el silenciamiento génico y su supresión (Revisado en Csorba y col. (2015)). El estudio de los mecanismos que regulan el desarrollo de los órganos de la planta se ha abordado mediante el uso de plantas mutantes; sin embargo, el uso de sistemas dinámicos, como son las infecciones virales, suponen una herramienta de gran valor para el estudio de alteraciones moleculares, celulares y anatómicas.

1. Familia *Potyviridae*

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha reconocido la familia *Potyviridae* como la segunda familia de virus de plantas más extensa, después de la familia *Geminiviridae*. En el último informe del ICTV, se estima que dicha familia consta de aproximadamente 200 especies repartidas en 8 géneros: *Brambyvirus* (1 especie), *Bymovirus* (6 especies), *Ipomovirus* (6 especies), *Macluravirus* (8 especies), *Poacevirus* (3 especies), *Rymovirus* (3 especies), *Tritimovirus* (6 especies) y *Potyvirus* (160 especies). La clasificación en estos 8 géneros se establece atendiendo a diferentes características como son la gama de huéspedes, los vectores transmisores y las características filogenéticas y genómicas (Wylie y col., 2017).

Los miembros de la familia *Potyviridae* se caracterizan por presentar partículas desnudas de morfología filamentosa y flexuosa compuestas por alrededor de 2000 unidades de un único tipo de proteína estructural (CP, Proteína de la Cápsida) (Revers y García, 2015). El virión oscila entre 12-20 nm de diámetro y 680-900 nm de longitud (figura 2 A); además presenta simetría helicoidal y un paso de vuelta de aproximadamente 3,4 nm (Wylie y col., 2017).

Un rasgo de importancia taxonómica de la familia *Potyviridae* es la formación de inclusiones citoplasmáticas cilíndricas en las células. Estas inclusiones citoplasmáticas se denominan *pinwheels* (por su aspecto en forma de aspas de molino al ser observadas en secciones transversales) y están formadas por acúmulos de la proteína viral CI (figura 2 B). Algunos miembros de la familia inducen la formación de otras inclusiones (sin carácter taxonómico), como las amorfas o las cristalinas (figura 2 C) (Revers y García, 2015).

Figura 2. Micrografías electrónicas. (A) Partículas virales purificadas del Virus del mosaico del nabo (TuMV: *Turnip mosaic virus*) (Escala: 250 nm). Cortesía de Carmen Yuste-Calvo. Sección de células de *Nicotiana tabacum* infectadas por *Henbane mosaic potyvirus* mostrando las inclusiones cilíndricas citoplasmáticas en forma de aspas de molino (B) e inclusiones cristalinas (C). Escala: 0,1 μ m. Modificado de Harrison y Roberts (1971).

2. Genero Potyvirus

El género *Potyvirus* representa alrededor del 30% de los virus de plantas conocidos actualmente (Revers y García, 2015); además su extensa distribución geográfica y su amplia gama de huéspedes, hace que el género *Potyvirus* sea el causante de grandes pérdidas económicas en cultivos agrícolas, hortícolas, ornamentales y pastos (Ward y Shukla, 1991). El estudio de su ciclo vital, la regulación genómica, la funcionalidad de sus proteínas y las interacciones que establecen con su hospedador suponen herramientas de gran ayuda para el diseño de estrategias de control eficientes para prevenir, proteger o minimizar las infecciones causadas por éstos.

Los miembros del género *Potyvirus* presentan un genoma monopartito, es decir, presentan una única molécula de ARN simple, de polaridad positiva y de aproximadamente 10 kb (Carrington y col., 1990). El ARN genómico de los potyvirus tiene dos regiones no codificantes: una situada en la región 3' y otra en la región 5' que funciona como sitio interno de entrada del ribosoma (IRES, *Internal Ribosome Entry Site*) (Carrington y Freed, 1990). El ARN presenta un único marco de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) que codifica para una poliproteína de 340-368 K que posteriormente será procesada proteolíticamente mediante proteasas codificadas por el propio virus (Revers y García, 2015). A diferencia de los ARNs mensajeros celulares, el ARN viral presenta una proteína viral (VPg) unida covalentemente a su extremo 5'-NCR (*Non coding region*), en lugar de una caperuza (Siaw y col., 1985). En su extremo 3'-NCR presenta una cola poliadenilada de longitud variable (Laín y col., 1988; Riechmann y col., 1990).

La región amino de la poliproteína codifica para las proteínas virales maduras P1 y HC-Pro que son escindidas de la poliproteína por sí mismas gracias a su actividad proteolítica. La región

central y carboxilo codifican para las proteínas virales maduras: P3–6K1–CI–6K2–VPg–NIaPro–NIb–CP, las cuales son procesadas por la proteasa NIaPro (Adams y col., 2005).

Una de las características conservadas universalmente en la familia *Potyviridae* es la presencia de una pequeña ORF denominada PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*) que se encuentra imbricada dentro de la secuencia que codifica la proteína P3. La expresión de esta ORF da lugar a la proteína de fusión P3N-PIPO que está formada por la parte amino de la proteína P3 (aproximadamente 25 kDa) y PIPO (60-115 aminoácidos) (Chung y col., 2008). El motivo G_2A_6 localizado al inicio de PIPO, media el proceso de cambio en el marco de lectura por deslizamiento de la ARN-polimerasa (RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase*) en -1 nucleótido en el marco de lectura de la proteína P3; este proceso se conoce como transcriptional slippage (Hagiwara-Komoda y col., 2016; Olspert y col., 2015; Rodamilans y col., 2015). Recientemente se ha descrito la presencia de otra proteína de fusión denominada P3N-ALT. En este caso, P3N-ALT se produce por un proceso de *transcriptional slippage* de +1 nucleótido en el marco de lectura de P3, lo cual da lugar a una proteína P3 truncada en la región carboxilo que finaliza en el heptapéptido de inicio de PIPO (G_2A_6) (Hagiwara-Komoda y col., 2016).

En el caso del cistron P1, se ha descrito una proteína de fusión generada por transcriptional slippage: P1N-PISPO. Sin embargo, no se trata de una ORF universal ya que únicamente se ha descrito para genomas de la descendencia del Virus del moteado suave de la batata. (SPFMV: *Sweet potato feathery mottle virus*) (Mingot y col., 2016).

En la figura 3 se ilustra el proceso de procesamiento de la poliproteína que dará lugar a 12 proteínas maduras, en las que se incluyen P3N-PIPO y P3N-ALT, además se recoge la organización genómica de la poliproteína y las funciones atribuidas a cada una de ellas.

Figura 3. Características y funciones de las proteínas potyvirales. El marco de lectura abierto se representa como una caja dividida por líneas negras que representan los productos finales. Las proteínas de fusión (P1N-PISPO, P3N-PIPO, P3N-ALT) están representadas por una caja de área rayada. La proteína terminal (VPg) está representada como una elipse negra. A partir de las tres proteasas (P1, HCPro y NIa) salen flechas que indican los sitios de escisión de éstas en la poliproteína. Todas las funciones conocidas de cada proteína se indican con un punto azul. Modificado de Revers y García (2015).

3. Ciclo viral de TuMV

Recientemente se han revisado diferentes aspectos moleculares y celulares asociados a la infección por potyvirus (Ivanov y col., 2014; Revers y García, 2015). En este apartado se hará una breve revisión sobre los últimos avances obtenidos en las diferentes etapas del ciclo viral de TuMV, con especial interés en el movimiento y replicación viral.

Al igual que el resto de potyvirus, el ciclo viral de TuMV comienza con su entrada en la célula huésped mediante daños en la cutícula y la pared celular. Por lo general, esta entrada tiene lugar por daños mecánicos causados durante la alimentación de los pulgones que actúan como vectores biológicos (Revers y García, 2015).

Una vez el virus ha alcanzado el citoplasma de la célula infectada, la partícula viral se desensambla permitiendo la liberación del ácido nucleico. La presencia de la proteína VPg y el sitio IRES permiten la unión de los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E (Wittmann y col., 1997), que reclutan el factor eIF4G y las subunidades 40S de los ribosomas, lo cual facilita el inicio de la traducción. La traducción da lugar a la poliproteína potyviral que será procesada por las proteasas virales que generarán las proteínas virales maduras (Revers y García, 2015).

En las primeras etapas de la infección las proteínas virales maduras inducen la formación

de nuevas membranas del RE, las cuales se reorganizan dando lugar a una estructura globular localizada en la periferia nuclear. Dicha estructura amalgama membranas del RE, vesículas del Golgi proteínas del complejo proteico COPII (implicadas en el transporte anterógrado entre el Golgi y el RE), mitocondrias, cloroplastos y vacuolas (Grangeon y col., 2012a) (ver apartado 6.1 para ampliar información).

Paralelamente a la biogénesis de este complejo, tiene lugar la formación de estructuras intrincadas (CM, *convoluted membranes*) asociadas al retículo endoplasmático rugoso (RER). Las principales funciones atribuidas a las CMs son el procesamiento de la poliproteína viral y almacenamiento de proteínas y lípidos necesarios para la replicación viral (Wan y col., 2015a). A medida que la infección avanza, la proteína 6K2 se acumula en los puntos de salida del RE (RE, Retículo Endoplasmático) (ERES, *Endoplasmic Reticulum Exit Sites*) e induce la formación de múltiples vesículas de membrana simple y forma tubular (SMT, *Single membrane tubule*) (Grangeon y col., 2012a; Wan y col., 2015a), estas vesículas presentan en su membrana la proteína 6K2 la cual se transloca en la membrana gracias a su dominio central hidrofóbico (Jiang y col., 2015). Las vesículas 6K2 abandonan el RE a través de los ERES y se dirigen a los cloroplastos utilizando los filamentos de actina y miosina XI-K (Wei y col., 2010a). Las proteínas implicadas de replicación viral NIa, 6K-NIa, Nib y CI han sido localizadas junto a las vesículas 6K2 en los cloroplastos Wei y col. (2010a). A partir de los trabajos realizados por Grangeon y col. (2012a), Wei y col. (2010a), Wei y col. (2013) se infiere que el proceso de replicación viral tiene lugar en los cloroplastos confinados en la estructura globular, sin embargo, no se puede descartar, que el proceso de replicación tenga lugar en cloroplastos localizados en el exterior de dicha estructura.

En virología, las SMTs se conocen comúnmente con el nombre de complejos de replicación viral (VRC, *Viral Replication Complex*) y se les han atribuido diversas funciones (Laliberté y Sanfaçon, 2010):

- Incrementar la concentración local de los componentes necesarios para la replicación.
- Proveer el soporte necesario para el anclaje del complejo de replicación.
- Confinar el proceso de replicación del RNA a un lugar específico, lo cual previene la activación del silenciamiento génico y las funciones de defensa del huésped.

A medida que la infección avanza, las membranas de las VRCs se yuxtaponen y se fusionan, englobando una porción de citoplasma, lo que da lugar a una nueva estructura de doble membrana y núcleo electrodensito (DMT, *Double membrane tubule*). En estas estructuras tiene lugar la

encapsidación por lo que las DMTs adoptan una forma filamentosa y se disponen paralelamente en el citoplasma del cuerpo globular. Por último, las partículas virales ensambladas abandonan el cuerpo globular y se dirigen a la vacuola central, donde serán almacenadas en vesículas a la espera de que un pulgón se alimente de la hoja infectada adquiriendo las partículas virales (Wan y col., 2015a).

Otro de los aspectos importantes del ciclo viral consiste en la colonización de nuevas células del hospedador. El movimiento de los virus se inicia con la invasión de las células adyacentes a través de los plasmodesmos (PDs) los cuales son puentes citoplasmáticos que atraviesan la pared celular y conectan ambas células. Este proceso se denomina movimiento célula a célula o movimiento a corta distancia.

Los virus de plantas codifican en su genoma para una o varias proteínas que intervienen en las funciones de movimiento (PM, Proteína de Movimiento); sin embargo, en los Potyvirus no se ha establecido ninguna PM, pero sí proteínas que juegan un papel fundamental en diferentes etapas del movimiento célula a célula.

El destino final de los VRCs es alcanzar la célula vecina a través de los PDs; para lograr este objetivo las vesículas viajan a través del sistema de actina miosina hasta alcanzar la membrana plasmática (Grangeon y col., 2012a; Grangeon y col., 2013), donde interactúan con el complejo formado por la proteína CI y P3N-PIPO que se encuentra asociado a la membrana de los PDs (Wei y col., 2010a). Recientemente, se ha establecido que el complejo CI-P3N-PIPO se asocia a la membrana de los PDs a través de la interacción entre el dominio PIPO y la proteína PCaP1, la cual se ancla a la membrana plasmática a través de la meristoilación de un residuo de glicina (Vijayapalani y col., 2012).

Los complejos de replicación también pueden moverse a larga distancia; para ello, deben salir de las células epidérmicas y cruzar las células del mesófilo, el haz vascular de las hojas, las células vasculares del parénquima, las células acompañantes y por último alcanzar el tubo criboso, desde donde serán transportadas por el floema a larga distancia. El transporte célula a célula tiene lugar a través de los PDs, mientras que el movimiento entre la célula acompañante y el tubo criboso tiene lugar a través de un PD especializado denominado poro del plasmodesmo (PPU, *Pore Plasmodesmal Unit*). Recientemente, se ha descrito que los VRCs también se mueven y se replican en el xilema. Para ello los VRCs entran en las células xilemáticas inmaduras a través de las traqueidas y se mueven a la célula contigua cuando la muerte programada de la célula comienza (Wan y col., 2015b). El ciclo viral viene recogido en la figura 4.

Figura 4. Representación esquemática de los principales eventos que tienen lugar durante el ciclo de infección de TuMV. (1) Los viriones entran en la célula huésped pegados al estilete del pulgón vector o por inoculación mecánica. (2) Desencapsidación del virión. (3) El ARN genómico es traducido por los ribosomas del huésped y la poliproteína generada es procesada dando lugar a las proteínas virales. (4) La proteína 6K2 se acumula en los ERES desde donde sale en forma de vesículas hacia los cloroplastos. (5) Las vesículas 6K2 transportan cloroplastos, hacia la estructura perinuclear. (6) Los cloroplastos sufren una serie de modificaciones de membrana que permitirán albergar el proceso de replicación. (7) Parte de los VRCs evolucionan a DMTs donde tiene lugar el proceso de encapsidación. (8) Las partículas virales ensambladas abandonan la estructura globular y se dirigen a la vacuola central donde serán almacenadas. (9) Los VRCs abandonan la estructura perinuclear, y se dirigen hacia los PDs utilizando el sistema de actina-miosina. (10) Los VRCs atraviesan los plasmodesmos asistidos por las proteínas de movimiento (CI y P3N-PIPO). (11-13) Los VRCs viajan a través de diferentes tipos celulares hasta alcanzar los tubos cribosos donde comenzaran su movimiento a larga distancia (14-15). Figura basada en los modelos propuestos en (Grangeon y col., 2012b; Wan y col., 2015a; Wan y col., 2015b; Wei y col., 2010a; Wei y col., 2013).

4. Sistema experimental *Arabidopsis thaliana*/Virus del mosaico del nabo

Turnip mosaic virus es uno de los miembros más interesantes de la familia *Potyviridae* ya que a diferencia del resto de miembros es capaz de infectar una amplia gama de huéspedes pertenecientes a la clase Monocotiledónea y Dicotiledónea gracias a su amplia diversidad genética. Las infecciones causadas por TuMV provocan grandes pérdidas económicas en cultivos de Brassica como la colza (*Brassica napus*), el nabo (*Brassica rapa*), la mostaza india (*Brassica juncea*), la col de Bruselas (*Brassica oleracea*) y el rábano (*Raphanus sativus*), entre otros. Sin embargo, también causa daños en otros cultivos hortícolas y ornamentales como: la lechuga (*Lactuca sativa*), el crisantemo (*Chrysanthemum sp.*), la zinnia (*Zinnia sp.*), la cebolla (*Allium cepa*), el ajo (*Allium sativum*), etc. (Walsh y Jenner, 2002).

La gran variabilidad genética de TuMV ha suscitado la necesidad de la clasificación de la especie. El análisis de la secuencia del gen CP y la capacidad de infectar diferentes huéspedes han permitido establecer, al menos, cuatro cepas genéticas. La cepa MB (*Mostly Brassica*) (Sánchez y col., 2003) o cepa World-B (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003) está formada por aislados procedentes de Brassica de todo el mundo. La cepa MR (*Mostly Raphanus*) (Sánchez y col., 2003) o cepa Asian BR (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003) agrupa aislados asiáticos procedentes mayoritariamente de rábano. Otra de las razas genéticas de TuMV es la raza Basal-B (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003) que agrupa aislados procedentes de brásicas y no brásicas del suroeste y centro Eurasia, mientras que la raza Basal BR agrupa aislados euroasiáticos.

La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome, 2000) junto a la capacidad natural de TuMV para infectar la planta modelo de la biología vegetal, han convertido a TuMV en una excelente herramienta para el estudio de la interacción planta-virus (Martínez-Herrera y col., 1994). El desarrollo de diferentes clones infectivos de TuMV (Chen y col., 2007; Jenner y col., 2003; Sánchez y col., 1998; Suehiro y col., 2004) y vectores que expresan proteínas reporteras (Grangeon y col., 2012a; Touriño y col., 2008) han sido y son clave para el éxito del uso del patosistema *Arabidopsis thaliana*/TuMV. En la bibliografía se encuentran diversos ejemplos del uso del patosistema en el estudio de diferentes aspectos como la supresión del silenciamiento génico (García-Ruiz y col., 2015; Kung y col., 2014), la co-evolución planta-virus (Vijayan y col., 2017), la remodelación del sistema de endomembranas (Jiang y col., 2015; Wei y col., 2013), el estudio de la replicación viral (Li y col., 2016) y la resistencia (Abdelkefi y col.,

2018; Gallois y col., 2010).

El patosistema *Arabidopsis thaliana*/TuMV utilizado durante la presente tesis, ha sido puesto a punto en el grupo “Biotecnología de virus de plantas” (CBGP-INIA, España). El sistema experimental consta de los aislados UK 1 y JPN 1 (Jenner y Walsh, 1996) pertenecientes a las cepas MB y MR, respectivamente, y la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0). Los síntomas sobre el desarrollo de *A. thaliana* afectan principalmente al desarrollo del tallo floral y la formación de flores (Sánchez y col., 2015).

Los síntomas inducidos por los aislados UK 1 y JPN 1 son muy distintos y en cierta medida antagónicos. La infección por JPN 1 permite el crecimiento del tallo, mientras que la infección por UK 1 frena completamente el crecimiento del tallo floral, o incluso inhibe su aparición, si la infección es suficientemente temprana. El tallo floral de las plantas que consiguen desarrollarlo, se caracteriza por ser corto (≤ 2 cm) y en forma de gancho. Por el contrario, las plantas infectadas por JPN 1 son capaces de desarrollar tallo floral, pero éste es frágil y tiene porte rastrero (figura 5) (Sánchez y col., 2015).

La representación de las curvas de crecimiento de los tallos florales de plantas infectadas por UK 1 y JPN 1 muestran patrones muy diferentes; las plantas infectadas por UK 1 detienen drásticamente su crecimiento, mientras que las plantas infectadas por JPN 1 presentan un crecimiento lineal durante todo el periodo de observación. Por el contrario, las plantas control presentan el típico patrón de crecimiento sigmoideo (figura 6) (Sánchez y col., 2015).

Figura 5. Efecto de la infección de TuMV sobre el desarrollo del tallo floral de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0. (A) Plantas inoculadas con tampón. (B) Plantas infectadas con el aislado JPN 1* (C) Plantas infectadas con el aislado UK 1. (Sánchez y col., 2015). *El porte rastrero del tallo floral de las plantas infectadas con el aislado JPN 1 no puede observarse en la figura ya que las imágenes se tomaron con las plantas en posición horizontal. (Escala: 5 cm).

Figura 6. Dinámica de crecimiento del tallo floral de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0. La inoculación de las plantas se realizó a 21 días post siembra o estado de desarrollo 1.08 de la clasificación de Boyes y col. (2001). (□) plantas inoculadas con tampón; (●) plantas infectadas con el aislado JPN 1; (▲): plantas infectadas con el aislado UK 1; (△) plantas infectados con la Ch.J(2511-3767)U; (○) plantas infectadas con Ch.U(2511-3767)J. Modificado de Sánchez y col. (2015).

La infección con TuMV también altera diferencialmente el desarrollo de las flores. La infección con el aislado UK 1 cursa con flores infértiles puesto que las anteras se encuentran atrofiadas e impiden la liberación de polen. Por el contrario, las flores afectadas por la infección con JPN 1 son fértiles y producen semillas fértiles. Ambos aislados causan acortamiento de los estambres y separación en pétalos y sépalos (figura 7) (Sánchez y col., 2015).

Figura 7. Efecto de la infección de TuMV sobre el desarrollo de floral de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0. (A) Plantas control inoculadas con tampón. **(B)** Plantas infectadas con el aislado JPN 1 **(C)** Plantas infectadas con el aislado UK 1 (Sánchez y col., 2015).

La dominancia apical en Col-0 no es muy pronunciada, lo cual permite el desarrollo de las ramas próximas a la inflorescencia principal (Cline, 1991). En el caso de las plantas infectadas por JPN 1 se observa una clara pérdida de la dominancia apical, lo que favorece el desarrollo de ramas secundarias, terciarias e incluso cuaternarias de mayor longitud que la inflorescencia principal. Adicionalmente, la ramificación tiene lugar en ángulo de 90 grados con respecto al

tallo principal y la longitud de los entrenudos es irregular (figura 8) (Sánchez y col., 2015).

Las alteraciones en el sistema radicular son reminiscentes de los cambios acontecidos en la parte aérea de la planta. Por consiguiente, la raíz principal y las raíces laterales de las plantas infectadas por el aislado UK 1 están menos desarrollada que las raíces de las plantas control. Por el contrario, las plantas infectadas por el aislado JPN 1 presentan una mayor proliferación de las raíces laterales (Sánchez y col., 2015) (figura 9).

Figura 8. Efecto de la infección de TuMV sobre la ramificación de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo Col-0. (A) Plantas control inoculadas con tampón. **(B)** Plantas infectadas con el aislado JPN 1 **(C)** Plantas infectadas con el aislado UK 1. (Escala: 5 cm). (Sánchez y col., 2015).

Figura 9. Efecto de la infección de TuMV sobre el desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* Ecotipo RLD. (A) Plantas inoculadas con tampón. **(B)** Plantas infectadas con el aislado JPN 1 **(C)** Plantas infectadas con el aislado UK 1. (Escala: 5 cm). Modificado de Sánchez y col. (2015).

El determinante mayoritario de los síntomas descritos anteriormente se estableció mediante el intercambio de segmentos génicos entre el clon infectivo de UK 1 (Sánchez y col., 1998) y el clon de longitud completa de JPN 1 (Sánchez y col., 2015). A pesar de no disponer de un clon infectivo de JPN 1, las quimeras obtenidas fueron infectivas y permitieron establecer que el determinante de la elongación del tallo floral se encontraba en la región génica de P3. En la figura 10 se muestran las quimeras generadas, así como los puntos de restricción enzimáticos utilizados para realizar los intercambios genéticos entre los clones. Como se ha descrito anteriormente, el cistron P3 codifica para las proteínas P3, P3N-PIPO y P3N-ALT, por lo que la generación de la quimera U(2502-3305)J permitió descartar las proteínas P3N-PIPO y P3N-ALT como las proteínas responsables de la elongación diferencial del tallo, y establecer la proteína P3 como el determinante de los síntomas diferenciales.

Figura 10. Esquema de las quimeras generadas por el intercambio de fragmentos de ADN entre los clones de cADN de longitud completa de los aislados UK 1 y JPN 1. La barra superior representa la principal ORF del genoma potyviral. Embebida en ésta se encuentran las ORFs de las proteínas de fusión P3N-PIPO y P3N-ALT. El resto de barras representan las quimeras virales generadas. La primera letra utilizada en la terminología (U o J) hace referencia al clon de longitud completa utilizado como molde (UK 1 y JPN 1), respectivamente), mientras que los números en paréntesis representan el primer y el último nucleótido de la secuencia intercambiada. Por otra parte, la última letra (U o J) representa el aislado donador. En gris claro se representa la secuencia del clon UK 1, mientras que en gris oscuro se representa la secuencia del clon JPN 1. Las enzimas de restricción utilizadas para el intercambio de secuencias se muestran en su correspondiente posición de la secuencia viral. Nótese que la ORF de PIPO y ALT se intercambia con el fragmento generado por las enzimas *EcoR V* (2501) o *Afl III* (2501) o *SnaB I* (3305). Modificado de Sánchez y col. (2015).

5. Transporte intracelular de macromoléculas

La célula eucariota presenta un complejo sistema membranoso interno compuesto por diferentes compartimentos rodeados de membrana, lo cual le permite organizar y optimizar su metabolismo. Los diferentes compartimentos u orgánulos se comunican entre sí mediante vesículas que transportan cargos de diferente naturaleza (proteínas, lípidos, hidratos de carbono y sustancias inorgánicas) a través de diferentes rutas o vías de transporte. El transporte vesicular define dos grandes rutas de tráfico intracelular cuyas actividades funcionales son esenciales para la fisiología celular: la vía endocítica y la vía exocítica o secretora. Ambas rutas son complementarias, ya que median la internalización y la secreción de moléculas respectivamente. El correcto funcionamiento de estas rutas juega un papel crucial durante el crecimiento y el desarrollo vegetal, la respuesta al estrés biótico y abiótico, así como en el ensamblaje y modificación de la pared celular (Drakakaki y Dandekar, 2013; Van de Meene y col., 2017).

5.1 Ruta secretora o exocítica

La ruta secretora o exocítica, en sentido estricto, es la ruta biosintética. Las proteínas destinadas a ser secretadas, al igual que las proteínas y lípidos integrantes de la membrana plasmática o de los diferentes orgánulos utilizan la ruta secretora para alcanzar sus diferentes destinos funcionales.

Las proteínas que se incorporan a la ruta secretora son sintetizadas por los ribosomas asociados al RE, y su translocación tiene lugar simultáneamente a su síntesis. Todas las proteínas de secreción y, la mayoría de las proteínas integrales de membrana, se caracterizan por tener una secuencia hidrofóbica de 18 a 30 aminoácidos en su extremo amino denominada péptido señal (PS). Este péptido no formará parte de la proteína madura, pero jugará un papel fundamental en la correcta translocación de las proteínas al interior del lumen RE. Una vez terminado este proceso, tiene lugar el plegamiento de la proteína y las primeras modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación.

Las proteínas que alcanzan el estado conformacional apropiado se concentran en los sitios de salida del RE denominados ERES (*ER Exit Sites*), desde donde son incorporadas en vesículas de transporte y exportadas hacia el Golgi. Una vez alcanzado el Golgi, las proteínas recorren las cisternas *cis* y media del Golgi donde glicosidasas y glicosiltransferasas completan la N-glicosilación de los residuos de asparragina y la O-glicosilación de residuos de serina o treonina. El proceso de glicosilación es de vital importancia para que la región más distal del Golgi, denominada

red región del Trans Golgi (TGN, *Trans Golgi Network*), sea capaz de enviar las moléculas a la membrana plasmática, o, bien, a la vacuola (Chung y Zeng, 2017).

5.1.1 Vía secretora temprana

El elevado flujo exocítico al que se ven sometidos los orgánulos que componen la ruta secretora dificulta el mantenimiento de la composición molecular de los orgánulos. Es por esta razón, que existe un transporte bidireccional de proteínas y lípidos entre el RE y Golgi, lo que permite mantener la integridad molecular, así como el correcto funcionamiento de la ruta secretora. Este transporte se conoce como vía secretora temprana.

El flujo de transporte que va desde el RE hacia el Golgi se denomina transporte anterógrado, mientras que el flujo contrario se conoce como transporte retrógrado. En ambos tipos de transporte los intermediarios de transporte o vesículas se encuentran cubiertos por complejos multiproteicos tipo COP (coatómeros), los cuales deforman la membrana donadora para formar las vesículas de transporte. Existen dos tipos de cubiertas COP, la cuales difieren en composición molecular, así como en la direccionalidad durante el transporte.

El transporte anterógrado depende de las cubiertas COP de tipo II. Este complejo está formado por 5 proteínas citosólicas: una GTPasa (Sar 1), un heterodímero formado por las proteínas Sec23 y Sec24 que se conjugan para constituir la cara interna de vesícula y las proteínas Sec13 y Sec31 que se conjugan formando otro heterodímero que dará lugar a la cara externa (Chung y Zeng, 2017). El reclutamiento de estas proteínas tiene lugar de forma secuencial en los ERES (estructuras relativamente inmóviles) desde donde las vesículas COPII abandonan el RE y se fusionan con los bordes de la cisterna cis mediada por proteínas de la familia Rab (GTPasa) y las proteínas de membrana tipo SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*). Este mecanismo se ha revisado recientemente en Wang y col., 2017b.

Por otra parte, el transporte retrógrado está mediado por vesículas cubiertas por proteínas COP de tipo I. Las vesículas COPI median el transporte desde el Golgi al RE para favorecer el balance de membranas entre ambos orgánulos y reciclaje de proteínas residentes del RE (Brandizzi y Barlowe, 2013).

Las cubiertas COPI están constituidas por un complejo proteico formado por siete subunidades tipo COP: α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ . Estas subunidades se agrupan en dos sub-complejos funcionales: sub-complejo B ($\alpha/\beta'/\epsilon$) que forma la parte interna de la vesícula y el sub-complejo F ($\beta/\delta/\gamma/\zeta$) que

forma la cara externa de la vesícula. En el transporte retrógrado es la GTPasa ARF1 la que inicia la unión los coatómeros para la formación de las vesículas COPI (Revisado en Cevher-Keskin, 2013). Adicionalmente en estas vesículas viajan proteínas de la familia p24 que tienen como función la unión de proteínas tipo ERD2 (defectivo de retención 2 en RE), las cuales reconocen las proteínas escapadas del RE gracias a la secuencia de retención K/HDEL y las incorporan a las vesículas COPI para ser devueltas al RE (Montesinos y col., 2013; Montesinos y col., 2014; Pastor-Cantizano y col., 2016).

Al conjunto de todos estos procesos se les conoce como vía convencional de secreción de proteínas.

5.2 Secreción no convencional

Alternativamente a la ruta de secreción convencional, seguida por proteínas que contienen péptido señal, se ha identificado la existencia de rutas de secreción alternativas en las que no participa el complejo de Golgi. Las proteínas secretadas por esta ruta (alrededor del 50% del proteoma) carecen de péptido señal (proteínas LSP: *Leaderless Secretory Proteins*) (Robinson y col., 2016).

La expresión de muchas proteínas tipo LSP están restringidas a determinados estados de desarrollo, lo cual dificulta su estudio. Sin embargo, se ha podido establecer tres vías de secreción de UPS mediadas por diferentes orgánulos (Revisado en Ding y col., 2014 y Robinson y col., 2016).

5.1.2 Secreción directa e independiente de Golgi

Determinadas proteínas LSP son secretadas directamente desde el citosol sin la implicación de otros orgánulos. Aunque la translocación directa de las proteínas LSP a través de la membrana plasmática no ha sido probada en plantas, existen diferentes estudios que sugieren que ciertas enzimas como la manitol deshidrogenasa es secretada directamente al apoplasto en respuesta al ácido salicílico en plantas de tabaco (Cheng y Williamson, 2010). Otra enzima citoplasmática, la higromicina fosfotransferasa se ha demostrado que se secreta al espacio extracelular en *A. thaliana* (Miki y McHugh, 2004). En ambos casos el transporte hacia el apoplasto es independiente de la brefeldina A (BFA) (Cheng y col., 2009; Miki y McHugh, 2004), la cual bloquea el transporte desde el RE al Golgi. Sin embargo, queda por esclarecer si el transporte de estas enzimas está mediado por proteínas o canales presentes en la membrana.

Figura 11. Representación esquemática de las vías de secreción en células vegetales. En la ruta convencional de secreción (flechas negras), las proteínas con péptido señal son translocadas al retículo endoplasmático (ER). Las proteínas correctamente plegadas se dirigen hacia Golgi, y por último a la region del Trans-Golgi (TGN) desde donde son enviadas hacia la membrana plasmática o los cuerpos multivesiculares (MVB), desde donde son enviadas a la vacuola. En la ruta no convencional las proteínas alcanzan el espacio extracelular a través de diferentes rutas (flechas rojas): (1) Secreción directa e independiente de Golgi; (2) Secreción mediada por la vacuola o cuerpos multivesiculares y (3) Secreción mediada por la vacuola. (4) Secreción mediada por el complejo exocístico. (Chung y Zeng, 2017).

5.1.3 Secreción mediada por la vacuola o los cuerpos multivesiculares

Durante la infección por patógenos, la fusión de la vacuola con la membrana plasmática permite la liberación de enzimas vacuolares en el punto de ataque. Este mecanismo ha sido descrito en *A. thaliana* y supone una estrategia para la supervivencia de la planta. En hojas de cebada se ha descrito que los cuerpos multivesiculares (MVB, *Multivesicular Bodies*) se fusionan con la membrana plasmática ante el ataque fúngico del oídio, liberando compuestos antimicrobianos que previenen la penetración del haustorio fúngico (Revisado en Chung y Zeng, 2017).

5.1.4 Secreción mediada por el complejo exocístico

El complejo exocístico o EXPO (*EXocyst Positive Organelle*) es un orgánulo de doble membrana, recientemente descubierto. Este orgánulo se ha implicado en procesos de crecimiento y desarrollo.

Los procesos de secreción convencional y no convencional se encuentran representados en la figura 11.

6. Puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática

En este apartado se tratará la relación del citoesqueleto con el sistema de endomembranas, puesto que ambos juegan un papel fundamental en el proceso de replicación y movimiento de TuMV como se ha descrito en los apartados anteriores.

El RE es un complejo sistema de membranas dispuestas en forma de sacos aplanados y túbulos que se extienden desde la envoltura nuclear hasta la membrana plasmática (región cortical del RE) ocupando gran parte del citoplasma (región citoplasmática). La membrana de la envoltura nuclear y de la región cortical son relativamente inmóviles, sin embargo, el dominio citosólico se caracteriza por ser altamente dinámico ya que las estructuras tubulares aparecen y desaparecen en fracción de segundos (1,5 $\mu\text{m/s}$) (Griffing y col., 2017). Se postula que la excepcional morfología y dinamismo de este orgánulo está relacionada con su diversidad funcional.

La morfología del RE depende de una variada gama de proteínas integrales de membrana

y de su interacción con otros orgánulos y el citoesqueleto. Estas interacciones son dinámicas y reflejan los cambios producidos en el interior celular como: el estadio del ciclo celular o estado de desarrollo, respuesta a señales intracelulares o interacciones entre proteínas.

El citoesqueleto está constituido por una red tridimensional de microtúbulos y microfilamentos que se extiende por todo el citosol. Esta red proporciona una organización espacial a los orgánulos y contribuye a su movimiento. También juega un papel fundamental en la mitosis, meiosis, citocinesis, formación de la pared celular, el mantenimiento de la forma celular y la diferenciación celular.

Los microtúbulos son cilindros huecos con un diámetro exterior de 25 nm, y están formados por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares: α -tubulina y β -tubulina. Por el contrario, los microfilamentos de actina son macizos y tienen un diámetro de 7 nm; están formados por la polimerización de dos cadenas de actina globular o actina F que se enrollan de forma helicoidal. El movimiento de los microfilamentos de actina se debe a las miosinas (proteínas motoras) que presentan una organización característica en cabeza, cuello y cola. Las miosinas se unen a la actina a través de la cabeza y utilizan la cola para unir los elementos que son arrastrados a lo largo del filamento. Las células vegetales codifican para dos familias de miosina: miosina de tipo VIII y miosina de tipo XI.

En las plantas, el citoesqueleto de actina juega un papel importante en el movimiento de orgánulos, transporte de cargos, mantenimiento de la polaridad celular y el movimiento del RE. La despolimerización de los microfilamentos de actina mediante el uso de drogas (Latrunculina B y Citocalasina B) perturba la red del RE, pero no conlleva su destrucción completa. Este hecho se debe a que los túbulos del RE también están anclados a otros componentes celulares como la membrana plasmática y los microtúbulos. Los puntos de anclaje a la membrana se conocen con el nombre de EPCS (*Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane contact sites*). Desde el mundo de la virología molecular se ha propuesto la presencia de unas estructuras denominadas c-MERS (*Cortical microtubule-associated Endoplasmic Reticulum sites*) que son estructuralmente similares a los ECPS y parecen jugar el mismo papel (Peña y Heinlein, 2013).

Morfológicamente los EPCS se definen como regiones donde dos membranas se encuentran muy cercanas (< 10 nm) y no hay ribosomas presentes (Wang y col., 2017a). En las células vegetales maduras la vacuola central ocupa la mayor parte del volumen, como resultado el citoplasma está restringido a una fina capa en la periferia de la célula, donde orgánulos como las vesículas de Golgi y el RE, se encuentran muy cercanos a la MP. Estudios realizados en

Sacharomyces cerevisiae pusieron de manifiesto que estos sitios juegan un papel fundamental en el metabolismo de fosfolípidos y señalización. En el caso de células animales, los EPCS se encuentran implicados en el transporte de calcio desde el espacio extracelular, gracias a la asociación del complejo STIM1/Orai1. En el caso de células vegetales, también se han implicado los EPCS en estas funciones, sin embargo, se requieren experimentos adicionales para poder establecer los mecanismos subyacentes (Revisado en Bayer y col., 2017).

Las proteínas que conforman los ECPS se encuentran bien establecidas en células animales y levaduras, sin embargo, no ocurre lo mismo con sus homólogos vegetales. Recientemente, se ha identificado que los ECPS en plantas están formados por las proteínas VAP27, la proteína NET3C, sinaptotagmina 1 (SYT1), microtúbulos y filamentos de actina (Levy y col., 2015; Pérez-Sancho y col., 2015; Wang y col., 2014; Wang y col., 2016) (Ver figura 12).

Figura 12. Representación esquemática de los puntos de contacto del retículo endoplasmático (amarillo) con diferentes orgánulos (triángulos rojos). El RE establece contacto con los peroxisomas, mitocondrias, Golgi y cloroplastos. Las proteínas implicadas en los puntos de contacto entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático (ECPS) vienen representadas en el recuadro blanco (Griffing y col., 2017).

Los PD son canales de 50 nm de diámetro que conectan los citoplasmas de las células vecinas. Son sitios donde se sabe que la MP, el RE y el citoesqueleto de actina convergen. Por tanto, los PD pueden considerarse como uniones especializadas entre la MP-RE. El número de ECPS en la

MP es mayor que el número de PD, sin embargo, los ECPS co-localizan con los PDs, lo cual sugiere que los ECPS actúan como andamios que soportan el desmotúbulo del PD (Wang y col., 2017a). Paralelamente, se ha descrito que los miembros RTN3 Y RTN6, pertenecientes a una familia de proteínas inductoras de la curvatura del RE, denominados reticulones, se encuentran en el PD en donde interactúan con las proteínas VAP27 y SYTA (Kriechbaumer y col., 2015). Recientemente, se ha descrito la interacción de la proteína P3 del Virus del mosaico de la soja (SMV, *Soybean mosaic virus*) con una proteína que presenta un Dominio de Homología al Reticulón (GmRHP). Además, cuando la proteína GmRHP se coexpresa transitoriamente con SMV, se observa un incremento en la replicación del virus y su movimiento a corta distancia (Cui y col., 2018). Estos datos sugieren la implicación de la proteína GmRHP en la replicación del virus y su movimiento como ocurre con la proteína 2C del Enterovirus humano 71 (Familia *Picornaviridae*; Género: *Enterovirus*) y el RTN3 (Reticulón 3) de humanos (Tang y col., 2007).

Los PDs median el transporte de macromoléculas entre células, además los virus vegetales utilizan estos canales para su movimiento a corta distancia. Los VRCs son guiados por las proteínas de movimiento viral hasta los c-MERS donde tiene lugar el reclutamiento de proteínas y membranas necesarias para la replicación viral. Esta hipótesis está sustentada por varios estudios de interacción proteína-proteína en los que se sugiere que la proteína VAP27 interacciona con la proteína 60K de Virus del mosaico de la carilla (CPMV, *Cowpea mosaic virus*) (Familia: *Secoviridae*; Género: *Comovirus*) (Carette y col., 2002), la cual está implicada en la reorganización del sistema de endomembranas y formación de los VRCs. Por otra parte, la formación de VRCs del género *Tombusvirus* (Familia: *Tombusviridae*) tiene lugar en los c-MERS donde la proteína de replicación p33 subvierte la función de las proteínas VAP27 y ORPs (Oxyterolbinding protein) con el fin de enriquecer en esteroides los VRCs (Barajas y col., 2014).

Los VRCs tempranos inducidos por el Virus del mosaico del tabaco (TMV, *Tobacco mosaic virus*) (Familia *Virgaviridae*; Género: *Tobamovirus*) se mueven a lo largo de la red formada por los filamentos de actina y RE cortical, hasta alcanzar los c-MERS donde cesan su movimiento gracias a la asociación de la proteína de movimiento. En estos puntos tiene lugar la maduración de los VRCs gracias al reclutamiento de proteínas y membranas del huésped procedentes de la ruta de exocitosis. Paralelamente, los c-MERS median la ruta de endocitosis, la cual es utilizada por los virus para su movimiento hacia el interior celular o el reciclaje de sus componentes (Revisado en Peña y Heinlein, 2013) (figura 13).

En conclusión, se puede considerar que los puntos de contacto entre el RE y la MP permiten mantener la estructura del RE mediante la regulación del citoesqueleto cortical, el transporte de

lípidos y la señalización de fosfolípidos. Además, juegan un papel importante en la señalización de estímulos extracelulares, así como puntos de reclutamiento de componentes necesarios para el movimiento y la replicación viral. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para poder caracterizar en profundidad estos centros neurálgicos de la célula.

Figura 13. Representación de los puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática. Los puntos de contacto entre el retículo endoplasmático y la membrana plasmática actúan como plataformas para la formación y movimiento del complejo de replicación viral (VRCs). **(A)** Los VRCs (rojo) y las proteínas de movimiento (verde) se mueven por la red RE-actina hasta alcanzar los c-MERS. **(B)** Los VRCs continúan el reclutamiento de membranas y proteínas en los c-MERS (Peña y Heinlein, 2013).

7. Objetivos

Durante la presente tesis doctoral se persiguen diferentes objetivos relacionados con la interacción entre el Virus del mosaico del nabo y la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los objetivos propuestos para esta tesis doctoral son:

- Generación de un clon infectivo del aislado JPN 1 del Virus del mosaico del nabo. Esta herramienta facilitará, en gran medida, el estudio del patosistema Virus del mosaico del nabo/*Arabidopsis thaliana*.
- Determinación de la región génica de la proteína P3 del Virus del mosaico del nabo implicada en el desarrollo del tallo floral de plantas infectadas de *Arabidopsis thaliana*.
- Localización y caracterización del comportamiento subcelular de la proteína P3 del Virus del mosaico del nabo con el objetivo de esclarecer los posibles procesos virales en los que se encuentra implicada.
- Caracterización histoquímica de la pared celular secundaria de tallos de *Arabidopsis thaliana* infectados por el aislado UK 1 y JPN 1 del Virus del mosaico del nabo. A su vez, se realizará la caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de los componentes de la pared celular.

Material y métodos

Material y métodos

1. Material vegetal

1.1 Especies vegetales

Para la realización de esta tesis doctoral se han utilizado diversas especies vegetales pertenecientes a la familia *Brassicaceae*: *Arabidopsis thaliana*, *Brassica carinata*, *Brassica juncea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus* cv. Pico blanco, *Raphanus sativus* cv. Redondo rojo punta blanca y *Raphanus sativus* cv. Daikon. Por otra parte, se ha utilizado *Nicotiana benthamiana* perteneciente a la familia *Solanaceae*.

1.2 Condiciones de cultivo

1.2.1 Condiciones de cultivo *Arabidopsis thaliana*

En el presente trabajo se utilizó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-O. La siembra se realizó de forma directa en semilleros de 28 pocillos y las semillas se sometieron a un proceso de estratificación durante 3 días a 4°C, en condiciones de oscuridad y humedad, permitiendo así una óptima sincronización en la germinación. El sustrato utilizado fue turba mezclada con vermiculita en proporción 3:1.

Tabla 1. Estirpes bacterianas utilizadas en la presente tesis doctoral

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>F⁻, deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44lamda-thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1	Rif ^R derivatizado de C58 y curado para pTic58	Deblaere y col. (1985)

El crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* tuvo lugar en cámara cultivo Conviron® MTR30 bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas. La temperatura de crecimiento fue de 21°C/19°C (día/noche) con fotoperiodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y humedad del 40-50%. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes que produjeron una densidad de flujo de fotones de 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El riego en la cámara se realizó 2 veces por semana.

1.2.2 Condiciones de cultivo *Brassica sp.* y *Raphanus sativus*

Las semillas de *Brassica sp.* y *Raphanus sativus* se sembraron directamente en macetas de 15 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue turba.

El crecimiento de las plantas tuvo lugar en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura 25°C durante el día y 18°C durante la noche. El riego en el módulo se realizó de forma manual 2 veces por semana.

1.2.3 Condiciones de cultivo *Nicotiana benthamiana*

Las semillas de *Nicotiana benthamiana* fueron germinadas en bandejas pequeñas con turba húmeda. Transcurridas 2 semanas desde la siembra, se trasplantaron a macetas de 15 cm de diámetro. El sustrato utilizado fue turba.

El crecimiento de las plantas tuvo lugar en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura 25°C durante el día y 18°C durante la noche. El riego en el módulo se realizó de forma manual 2 veces por semana

2. Microorganismos

2.1 Bacterias

Las estirpes bacterianas empleadas durante la presente tesis, junto a sus características genéticas, vienen recogidas en la tabla 1. Para la clonación y conservación de plásmidos se empleó la estirpe DH5α de *Escherichia coli*, mientras que para los experimentos de agroinoculación y agroinfección en *Nicotiana benthamiana* se utilizó la estirpe C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*.

2.2 Cultivo de microorganismos

2.2.1 Medio Luria-Bertani

La composición del medio Luria-Bertani (LB) presenta la siguiente composición: 1% bactotripton al (p/v), 0,5% extracto de levadura al (p/v) y 1% NaCl (p/v). En el caso de cultivos en medio sólido, se suplementó el medio con agar bacteriológico al 1,5 % (p/v). Se esterilizó a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 min.

2.2.2 Cultivo de *Escherichia coli*

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaron en medio LB (sólido o líquido) suplementados con los antibióticos necesarios tanto para la selección de cepas portadoras del plásmido deseado. Los antibióticos utilizados, así como las concentraciones de uso para cada uno de ellos vienen recogidos en el apéndice.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de 10 mL de capacidad y 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico deseado. Los tubos se incubaron durante 12-15 h a 30 o 37°C en agitación continua a 180 rpm. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri con LB solidificado y suplementados con el antibiótico deseado. Las placas se incubaron durante 12-15 h a 30 o 37°C en estufa.

2.2.3 Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Los cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* se realizaron en medio LB (sólido o líquido) suplementados con los antibióticos necesarios tanto para la selección de cepas portadoras del plásmido deseado. Los antibióticos utilizados, así como las concentraciones de uso para cada uno de ellos vienen recogidos en el apéndice.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de 10 mL de capacidad y 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico deseado. Los tubos se incubaron durante 12-15 h a 28°C en agitación continua a 150 rpm. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri con LB solidificado y suplementados con el antibiótico deseado. Las placas se incubaron durante 24-48 h a 28°C en estufa.

2.3 Obtención de células competentes

2.3.1 Células competentes de *Escherichia coli*

Las células competentes de *Escherichia coli* DH5α se prepararon por el método de CIRb según el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001). Las células se distribuyeron en alícuotas de 100 µL, se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80°C.

La composición del medio empleado para este protocolo ha sido el siguiente:

- **Medio Ψ broth:** 2% bactotripton (p/v), 0,5% extracto de levadura al (p/v) y 0,4% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (p/v). El medio se ajustó a pH 7,5 con 1 N KOH. Se esterilizó a 120°C y 1 atm. de presión durante 20 min.

2.3.2 Células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

Las células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 se realizó siguiendo el protocolo descrito en An y col. (1989). Las células se cultivaron a 28°C en medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente durante 48 horas. A continuación, se preparó un preinóculo de 5 mL en medio LB a partir de una sola colonia. El cultivo se incubó a 28°C y en agitación continua (200 rpm) hasta que alcanzó una DO_{600} de 0,5 (aproximadamente 4 h). El cultivo se enfrió durante 10 min en hielo. Transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo fue transferido a tubos previamente enfriados. El cultivo se centrifugó durante 5 min a 4°C y 3000 g en una centrífuga Beckman Coulter Avanti® J-26 XP con rotor JA-14. Tras la centrifugación se descartó el sobrenadante y las células precipitadas se resuspendieron en 10 mL de Cl_2Ca 0,15 M previamente enfriado. Se incubó en hielo durante 10 min y se procedió de nuevo a sedimentar las células (mismas condiciones). El precipitado resultante se resuspendió en 10 mL de Cl_2Ca 20 mM previamente enfriado. Las células se distribuyeron en alícuotas de 100 μL . A continuación, las alícuotas se congelaron en N_2 líquido y se conservaron a -80°C.

2.4 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de células competentes se realizó mediante choque térmico (Sambrook y Russell, 2001), tanto para células competentes de *Escherichia coli* DH5 α , como para las células competentes de *A. tumefaciens* C58C1. Para la transformación de *E. coli* se emplearon 200 ng de plásmido, mientras que para la transformación de *A. tumefaciens* se empleó 1 μg . Para ambas transformaciones se utilizaron alícuotas de 100 μL de células competentes a las cuales se les añadió el plásmido correspondiente. La mezcla se homogenizó y se incubó en hielo durante 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se sometió a las células a un choque térmico de 42°C durante 90 s, seguido de una incubación en hielo durante 1 min. Las células se cultivaron, tras añadir 400 μL de medio LB, durante 1 h y 30 min a 37°C con agitación en el caso de *E. coli* y 3h y 30 min a 28°C en el caso de *A. tumefaciens*. En último lugar, las bacterias se sembraron en placas con LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en tubos de 10 mL de capacidad y 5 mL de medio

LB suplementado con el antibiótico deseado. Los tubos se incubaron durante 12-15 h a 28°C en agitación continua a 150 rpm. Los cultivos en medio sólido se realizaron en placas de Petri con LB solidificado y suplementados con el antibiótico deseado. Las placas se incubaron durante 24-48 h a 28°C en estufa.

2.5 Conservación de estirpes bacterianas

Los cultivos fueron crecidos en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los cultivos fueron centrifugados en una centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5810R con rotor A-4-62 durante 10 min a 6000 g. El sedimento fue resuspendido en 25% glicerol.

3. Extracción de ácidos nucleicos

3.1 Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el kit Spin Miniprep Kit (QIAprep®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de ADN plasmídico a gran escala se utilizó el kit HiSpeed® Plasmid Midi (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del ADN plasmídico obtenido mediante estos métodos fueron adecuadas para su posterior uso.

3.2 Extracción de ARN total

Aproximadamente 100 mg de tejido de tallos de *Arabidopsis thaliana*, previamente congelados a -80°C, fueron machacados en un mortero con maza estéril hasta su trituración a polvo fino con N₂ líquido. El ARN total fue aislado utilizando el kit comercial de RNeasy® Mini Kit (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3 Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se determinó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un Nanodrop™ 2000. La relación entre la absorbancia medida a 260 nm y a 280 nm (260/280) indica la pureza de los ácidos nucleicos. Así, una relación 260/280 próxima a 1,8 indica que el ADN es puro, correspondiéndose una unidad de absorbancia a 260 nm a

una concentración de 50 µg/mL de ADN de doble cadena. Para el caso del ARN, la relación 260/280 debe aproximarse a 2, correspondiéndose una unidad de absorbancia a 260 nm a una concentración de 40 µg/mL de RNA (Sambrook y Russell, 2001).

3.4 Separación y purificación de ácidos nucleicos. Visualización de ADN en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN

La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook y Russell (2001). Los geles se prepararon en tampón 1X Tris-Borato-EDTA (pH 8,3) (TBE: 89 mM Tris-base, 89 mM Ácido bórico y 2 mM EDTA). La concentración de agarosa empleada en los geles varió entre el 0,5% y 1,5% (p/v) dependiendo del rango de resolución deseado. Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V. Las muestras se suplementaron con tampón de carga 10x [30% Ficoll-400, 40 mM EDTA (pH 8,0), 0,2% BPB y 0,2% Xilencianol]. Como patrón de peso molecular se utilizó una preparación de ADN del fago λ digerido con la enzima de *Pst* I (New England Biolabs®) que presenta un rango de pesos moleculares entre 250-11500 pb. La detección del ADN se realizó añadiendo bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 µg/mL. Los geles se visualizaron en un transiluminador ChemiDoc XRS+ system (Bio-Rad) a una longitud de onda de 312 nm.

Las bandas de interés se cortaron con un bisturí estéril bajo luz UV. El ADN se extrajo utilizando el kit de GeneJET® Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Visualización de ARN en geles de agarosa

Para comprobar la integridad de las moléculas de ARN, se tomaron 250 - 500 ng de las mismas y se analizaron mediante electroforesis horizontal en condiciones desnaturalizantes. Como agente caotrópico se empleó formaldehído el cual actúa impidiendo que el ARN forme estructuras secundarias, permitiendo así una electroforesis dependiente únicamente del tamaño de las moléculas de ARN.

El tampón de corrida de la electroforesis estaba compuesto por 40 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM NaAc y 1 mM EDTA (pH 8,0). Por otra parte, el tampón de carga presentó la siguiente composición: 50% glicerol, 1mM EDTA y 0,4% azul de bromofenol. La muestra incluyó bromuro de etidio como estándar interno, previa incubación a 55°C durante 15 min. Todas las soluciones

se prepararon utilizando agua destilada tratada con DEPC. El gel de agarosa al 1,5 % (p/v) se preparó en 0,5X MOPS y 3,5 % de formaldehído. El gel se dejó correr durante 1 h y 30 min a 60 V. Posteriormente se determinó la integridad del ARN observando el gel por exposición a luz UV en un transluminador. Cuando el ARN no está degradado se observan dos bandas mayoritarias y definidas correspondientes a los ARNr 18S y 28S.

4. Tratamiento enzimático de los ácidos nucleicos

4.1 Tratamiento de ARN con ADNasa

Las muestras de ARN se trataron con ADNasa I con el objetivo de eliminar el ADN genómico contaminante. Para ello, se utilizó el kit comercial de RNase-Free DNase Set (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2 Digestión de ADN con nucleasas de restricción

Las digestiones fueron realizadas utilizando enzimas de restricción o endonucleasas (New England Biolabs® y Takara®) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las digestiones con 2 enzimas se realizaron en tampón compatible de la misma casa comercial, o bien purificando el producto de la primera digestión y realizando posteriormente la segunda.

4.3 Desfosforilación de extremos del ADN

Los plásmidos digeridos se desfosforilaron en sus extremos 5' para evitar religaciones en etapas posteriores. La desfosforilación se efectuó con fosfatasa alcalina de gamba (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase) (New England Biolabs®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4 Ligación de fragmentos de ADN

Para las reacciones de ligación entre ADN plasmídico desfosforilado e insertos se utilizó la ADN ligasa del fago T4 (Promega®). Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos 5'P y 3'-OH de las moléculas de ADN. Las reacciones se dispusieron siguiendo las indicaciones del fabricante.

La cantidad apropiada de inserto fue calculada a partir de la siguiente ecuación (1):

$$(1) \quad \frac{\text{ng de vector} \cdot \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de vector}} \cdot \text{proporción de inserto: vector} = \text{ng de inserto}$$

La ligación de fragmentos de ADN se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos, siendo la proporción inserto:vector óptima de 3:1. La mezcla se incubó en presencia de la enzima DNA ligasa T4 (New England Biolabs®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.1 PCR convencional

Para la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR convencional se empleó la enzima de Takara® PrimeSTART™ HS ADN Polimerasa o la enzima *Pfu* ADN Polimerasa de Biotools®. En cada PCR se varió el tiempo de extensión en función del tamaño de los fragmentos a amplificar (30 s por cada 500 pb) y la temperatura de anillamiento (T_m) según la pareja de oligonucleótidos empleada. La polimerasa utilizada fue Takara PrimeSTAR™ HS ADN Polimerasa, sin embargo, se escaló el volumen de los reactivos, para un volumen final de 10 μL . Las condiciones de la reacción se encuentran en la tabla 2, mientras los componentes utilizados para cada una de las polimerasas vienen recogidas en la tabla 3 y 4.

Los productos de PCR obtenidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa. Una vez seleccionados los clones positivos, se realizaron cultivos líquidos para la extracción del ADN plasmídico y conservación a largo plazo.

Tabla 2. Condiciones PCR convencional

Pasos	No Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	1	94°C	2 min
Desnaturalización		94°C	20 s
Anillamiento	35	T _m *	30 s
Extensión		72°C	1 min/1 Kb
Extensión Final	1	72°C	7 min
Enfriamiento	∞	4°C	∞

Tabla 3. Reactivos y volúmenes empleados para PCR convencional con PrimeSTAR™ HS ADN Polimerasa

Componente	Volumen	Concentración final
5X Prime Star Buffer (Mg ²⁺ Plus)	10 µL	1X
Mix de dNTPs (2,5 mM cada uno)	4 µL	200 µM de cada uno
Oligonucleótido 1	10-15 pmol	0,2-0,3 µM
Oligonucleótido 2	10-15 pmol	0,2-0,3 µM
Molde	< 200 ng	
PrimeSTAR HS ADN Polimerasa (2,5 U/ µL)	0,5 µL	1,25 U/50 µL
H ₂ O	Hasta 50 µL	

Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados para PCR convencional con *Pfu* Polimerasa

Componente	Volumen	Concentración final
10X tampón de reacción	5 µL	1X
MgCl ₂ solution (50 mM)	1,5 µL	1,5 mM
dNTP Mix 10 mM c/u	1 µL	200 µM de cada dNTP
Oligonucleótido 1	10-15 pmol	0,2-0,3 µM
Oligonucleótido 2	10-15 pmol	0,2-0,3 µM
Molde	< 200 ng	
<i>Pfu</i> ADN Polimerasa (1 U/µl)	1 µL	20 mU/µL
H ₂ O	Hasta 50 µL	

5.2 Comprobación de colonias transformantes mediante PCR

La identificación de las bacterias transformadas para una determinada construcción se llevó a cabo mediante PCR. Para ello se picaron varias colonias transformadas con palillos estériles e inocularon en medio, (para conservar las colonias elegidas) y en tubos de PCR para su uso como molde en las amplificaciones.

5.3 IC-RT-PCR

Con el objetivo de confirmar la secuencia viral presente en las plantas infectadas se realizó una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa con un paso previo de inmunocaptura (IC-RT-PCR) siguiendo el protocolo descrito en Nolasco y col. (1993).

Los tubos de PCR se tapizaron con 100 μ L de anticuerpo de anti-Poty (Agdia®), diluido 1:200 en 0,05 M de tampón carbonato sódico (pH 9,6) (15 mM Na_2CO_3 , 28,4 mM NaHCO_3). Los tubos se incubaron durante 2h a 37°C. A continuación, se realizaron 3 lavados de 3 min cada uno, con 1X PBS-Tween (1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 0,15M NaCl, 3 mM KCl y 0,05% Tween-20). El tejido vegetal se homogenizó en tampón de extracción [0,5 M Tris-HCl (pH 8,2), 2% PVP-40, 1% PEG 6000, 0,8% NaCl y 0,05% Tween-20], siguiendo una proporción de 1:10 (p/v). Se añadieron 100 μ L de esta solución a cada tubo y se incubó a 4°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 3 min cada uno, con PBS-Tween.

La RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L, con una mezcla de reacción compuesta por 2 mM MgCl_2 , 125 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 10 pmol de cada oligonucleótido, 0,16 U/ μ L de inhibidor de ARNasa de Applied Biosystems, 0,16 U/ μ L de transcriptasa reversa (Applied Biosystems) y 2,5 unidades de *Pfu* ADN Polimerasa de Biotools (Madrid, España) y tampón de reacción 10 X [1 M Tris-HCl (pH 8,8), 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,5 M EDTA].

La amplificación se desarrolló en un termociclador ABI Perkin Elmer 9700 GeneAmp Dual Block PCR System Thermal Cycle (Applied Biosystems®) programado para un ciclo de retrotranscripción (RT) a 42°C durante 30 min y 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min. Seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, cebado a 54°C durante 0,5-1 min (en función del fragmento a amplificar) y extensión de la cadena a 72°C durante 2 min. Se programó un último ciclo a 72°C durante 10 min para las extensiones finales.

Los productos de la PCR (10 μ L de cada producto) se analizaron mediante electroforesis en

gel de agarosa. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de GeneClean™ Turbo Kit (Biomedicals®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a un servicio externo.

5.4 PCR solapante: mutagénesis dirigida

Para introducir mutaciones puntuales se utilizó una modificación de la técnica de PCR solapante descrita por Ho y col. (1989). Esta técnica consta de dos fases que vienen esquematizadas en la figura 14. En la primera fase se realizan 2 PCRs independientes, cada una de ellas con un oligonucleótido externo a la región a amplificar (E1,E2), y uno interno que contiene la mutación a insertar (I1, I2). Los oligonucleótidos internos contienen las mutaciones centradas en su secuencia y se encuentran flanqueados por 10 nucleótidos de la secuencia silvestre, siendo éstos complementarios entre sí. Los fragmentos amplificados se limpiaron usando el kit de GeneClean™ Turbo Kit (Biomedicals®), y se utilizaron como molde para la PCR de la segunda fase. En la segunda fase, los 2 fragmentos purificados se añadieron en cantidades equimolares para realizar una segunda PCR en la que se añadieron los oligonucleótidos externos (E1, E2). Las condiciones de las PCRs fueron las descritas para la polimerasa de alta fidelidad *Pfu* y las condiciones de la PCR general.

El producto resultante fue purificado de un gel de agarosa y clonado en el vector de interés. La inserción de la mutación en el ADN se comprobó por secuenciación.

Figura 14. Esquema de la PCR solapante. Los oligonucleótidos externos vienen representados por flechas rojas (E1, 2), mientras que los oligonucleótidos internos vienen representados por flechas verdes (I1, I2). Las mutaciones insertadas vienen representadas por un punto amarillo.

5.5 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

5.5.1 Síntesis de la primera cadena de cADN

Previamente a la síntesis de cADN se realizó un tratamiento con ADNasa con el fin de eliminar cualquier resto de ADN genómico. La síntesis de ADNc a partir del ARN total extraído (2 µg) se realizó utilizando la enzima de M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific™) utilizando oligonucleótidos de poli-T Oligo(dT) (Thermo Fisher Scientific™) según las instrucciones del fabricante.

5.5.2 Condiciones de la RT-qPCR

El ARN aislado de las muestras de material vegetal fue retrotranscrito a cADN. Éste último fue cuantificado según el procedimiento previamente descrito y utilizado como molde para la realización de PCR cuantitativa.

El estudio de la expresión de cada uno de los genes de interés fue realizado mediante la amplificación de una región concreta de los mismos, de unas 100 a 200 pb, mediante el uso de oligonucleótidos específicos (tabla 10) de forma que su temperatura de hibridación fuera 60°C. Como reactivo para la emisión de fluorescencia se utilizó LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche®). Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µl, tal y como se describe en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes empleados para qPCR

Reactivo	Volumen
Master Mix LightCycler® 480 SYBR Green I (2X)	10 µL
0,5 µM Oligonucleótido 1 (10x)	1 µL
0,5 µM Oligonucleótido 2 (10x)	1 µL
H₂O	3 µL
cADN	5 µL

Las reacciones, incluyendo los controles negativos, se llevaron a cabo por triplicado en placas blancas de polipropileno de 96 pocillos LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White (Roche®) y cubiertas con LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche®).

Para llevar a cabo las reacciones de amplificación se utilizó el sistema LightCycler® 480 Instrument (Roche®) y el programa específico LightCycler® 480 Software que permitió monitorizar la reacción a tiempo real. Los parámetros asignados para la PCR-cuantitativa a tiempo real se siguió el siguiente programa: activación inicial 95°C durante 4 min seguida de 45 ciclos que consistían en una primera etapa de desnaturalización a 95°C durante 10 s, una fase de alineamiento de oligonucleótidos de 10 s a 60°C, y una etapa de extensión a 72°C de 15 s.

5.5.3 Curva de desnaturalización

La especificidad de cada PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Este análisis consistió en una primera etapa de desnaturalización durante 1 min a 95°C, seguida de una etapa de hibridación a 55°C y otra de un incremento de temperatura de 0,2°C/s hasta 95°C. Cada producto amplificado posee una temperatura característica de desnaturalización según su longitud y secuencia, por lo que las curvas de desnaturalización permiten comprobar si el par de oligonucleótidos utilizados amplifican un único fragmento así como si se producen dímeros de los oligonucleótidos.

5.5.4 Eficiencia de amplificación

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada pareja de oligonucleótidos se realizó una curva estándar por triplicado, preparando diluciones seriadas de las muestras de cADN (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320). La pendiente de esta recta proporciona el valor de la eficiencia según la ecuación (2):

$$(2) \quad e = 10^{-\frac{1}{a}} - 1$$

donde e, es la eficiencia y a, es la pendiente de la regresión.

Cada dilución de la muestra se determinó por triplicado y sólo se consideraron válidas aquellas parejas de oligonucleótidos cuya eficiencia estuviera comprendida entre el 90 y el 100%.

5.5.5 Cuantificación

Las cuantificaciones se realizaron con muestras procedentes de 3 experimentos independientes, analizando cada una de las muestras por triplicado. El gen control utilizado fue la actina 8 (AT1G49240), y tomando la muestra tampón como referencia o calibrador. Los niveles

relativos de ARN mensajero se calcularon por el método $2\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001). En análisis estadístico aplicado para evaluar la significancia estadística de los cambios observados fue el test *t-student* con un p-valor inferior a 0,05.

5.6 Secuenciación automática del ADN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) de Secugen sito en el Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid, España).

6. Manipulación de proteínas

6.1 Fraccionamiento microsomal

Aproximadamente 5 g de hojas de *Nicotiana bethamiana* agroinfiltradas con las construcciones P3[UK 1]-GFP, P3[JPN 1]-GFP y STtmd-GFP se trituraron en frío utilizando N_2 líquido. Al polvo obtenido se le añadieron 2 volúmenes de tampón de purificación de microsomas [20 mM HEPES (pH 6,8), 150 mM Acetato de potasio, 250 mM manitol, 1 mM $MgCl_2$]. Con el fin de clarificar el homogenizado se realizó una centrifugación a baja velocidad (8000 g) en centrífuga Beckman Coulter Avanti® J-26 XP con rotor JA-14. El sobrenadante obtenido fue filtrado a través de 2 capas de Miracloth (Merck®) y dividido en 5 alícuotas de 2 mL que se ultracentrifugaron (Beckman Coulter Optima™ L-100 XP; rotor 90 Ti) en tubos de 10 mL de polipropileno Beckman Coulter Thickwall, Polypropylene (10 mL, 16 x 76 mm).

El sobrenadante obtenido tras la ultracentrifugación (S100) se fue descartado, mientras que los cinco sedimentos obtenidos (P100) fueron sometidos a diferentes tratamientos. El sedimento control se resuspendió en 400 μ L del tampón de purificación de microsomas (muestra no tratada), mientras que los 4 sedimentos restantes se resuspendieron en el mismo tampón suplementado con 0,1 M Na_2CO_3 (pH 11,5), urea 4 M, urea 8 M y 0,1% Triton X-100. Las muestras tratadas se mantuvieron durante 30 min en hielo y se ultracentrifugaron a 100.000 g durante 30 min. Los sobrenadantes se reservaron y los sedimentos se resuspendieron en 400 μ L del tampón de purificación de microsomas.

Las muestras se conservaron a -20 °C hasta el momento de ser analizadas mediante *Western-blot*.

Las muestras obtenidas en el fraccionamiento microsomal se suplementaron con tampón de carga (10x) compuesto por 62 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% glicerol (v/v); 2% SDS (p/v) y 0,05% azul de bromofenol (p/v) en presencia de 10 mM DTT. Las muestras fueron hervidas 95°C durante 5 min y centrifugadas a 20.000 g en centrífuga Eppendorf 5424 R y rotor FA-45-24-11 (Eppendorf®) durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue cargado en el gel de acrilamida.

6.2 Electroforesis bidimensional

La separación analítica de proteínas se realizó en sistema discontinuos y desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Los geles de empaquetamiento se realizaron al 4% de acrilamida, 0,1% dodecilsulfato sódico (SDS) (p/v), 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), mientras que los geles de separación se prepararon al 12,5% de acrilamida, 0,1% SDS (p/v), y 375 mM Tris-HCl (pH 6,8). Como agente intercalante entre la acrilamida y la bis-acrilamida se utilizó N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,05% (v/v) y como catalizador persulfato amónico (PSA) al 0,5% (p/v) (Sambrook y Russell, 2001). Los geles empleados fueron de 8 x 6 cm y 1,5 mm de grosor. La electroforesis se realizó en cubetas de Bio-Rad Mini-Protean II-2D Cell (Bio-Rad®) y se resolvieron a 200V durante 45min y temperatura ambiente. Como tampón de electroforesis se empleó una disolución de Tris-Glicina que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 8,3); 0,19 M glicina y 0,1% SDS (p/v).

Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron para su posterior transferencia a una membrana de PVDF, mediante transferencia húmeda con el sistema Mini-Transblot® (Bio-Rad®) en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (pH 9,2) (48 mM, 30 mM glicina, 20% metanol).

6.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie. Los geles se incubaron 30 min en agitación con solución de tinción de Coomassie [40% etanol, 10% CH₃COOH, 50% agua destilada y 0,01% azul Coomassie R-250 (p/v)]. Posteriormente, se destiñeron en una solución de 40% etanol y 10% CH₃COOH en agitación, hasta la adecuada visualización de las bandas. Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron comparando su movilidad electroforética con la del marcador molecular Amersham™ ECL™ High-Range Rainbow™ Molecular Weight Marker (Ge Healthcare Life Sciences).

6.4 Análisis de proteínas mediante *Western-blot*

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida, los geles de proteínas se transfirieron a una membrana de AmershamTM Polivinildifluoruro (PVDF) (Ge Healthcare Life Sciences) mediante el sistema de Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad[®]), empleando tampón Tris-Glicina [25 mM Tris-HCl (pH 8,6), 192 mM glicina] con 20% metanol y aplicando una corriente de 100 V durante 1 h y 30 min. En el caso de obtener transferencias parciales, la transferencia se realizó en cámara fría a 30 V toda la noche y agitación (Towbin y col., 1979).

Finalizada la transferencia, la membrana se sometió a diferentes tratamientos:

- **Bloqueo:** se incubó la membrana durante 1 hora en 5% leche desnatada (p/v) preparada en tampón TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), NaCl, 150 mM y 0,1% Tween-20 (v/v)], para saturar los sitios de unión no específicos.
- **Incubación con anticuerpo primario:** tras el bloqueo, la membrana se incubó durante 12-16 h a 4°C en 2,5% leche desnatada (p/v) preparada en tampón TBS-T con agitación. El anticuerpo monoclonal (anti-ratón) contra la región N-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP) (Roche[®] Diagnostics). La dilución empleada fue 1:10.000.
- **Primer lavado:** los anticuerpos unidos inespecíficamente se eliminaron mediante 3 lavados de 10 min en tampón TBS-T.
- **Incubación con anticuerpo secundario:** La membrana se incubó con anti-inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa de rábano (Roche[®] Diagnostics). El anticuerpo secundario se empleó a una dilución 1:10.000 en TBS con 2% leche (p/v). La incubación se realizó durante al menos 1 h a temperatura ambiente y agitación.
- **Segundo lavado:** la membrana se lavó 3 veces, 10 min, con tampón TBS-T.
- **Tercer lavado:** la membrana se lavó 3 veces, 10 min, con tampón TBS durante.
- **Revelado:** la detección de las bandas se realizó mediante el uso del kit de AmershamTM ECLTM Western Blotting Detection ReagentsTM (Ge Healthcare Life Sciences) y papel fotográfico de la misma casa comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante. La película fotográfica, expuesta a quimioluminiscencia, se reveló en cámara oscura en una procesadora automática X-OMAT 2000 Processor (Kodak).

7. Manipulación de microorganismos

7.1 Agroinfección de *Nicotiana benthamiana*

El plásmido pGTuMV-JPN 1 (2 µg) se transformó en la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* portadora del plásmido ayudante pCLEAN-S4837 (Thole y col., 2007). Las células transformadas se seleccionaron utilizando placas de LB suplementadas con rifampicina (50 µg/mL), tetraciclina (7,5 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Las placas se incubaron durante 6 a 9 días a 28°C. Las colonias seleccionadas se incubaron en LB líquido, suplementado con los mismos antibióticos, durante toda la noche a 150 rpm y 28°C. Los cultivos fueron centrifugados en una centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5810R con rotor A-4-62 durante 15 min a 6.000 g y resuspendidos en 10 mM MES-NaOH (pH 5,6), 10 mM MgCl₂ hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Los genes de virulencia se indujeron con 150 µM de acetosiringona durante 2 h a 24°C. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos fueron agroinfiltrados en hojas de *N. benthamiana*.

7.2 Agroinoculación de *Nicotiana benthamiana*

Los plásmidos para expresión transitoria se incubaron en LB líquido, suplementado con los antibióticos correspondientes, durante toda la noche a 150 rpm y 28°C. Los cultivos fueron centrifugados en una centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5810R con rotor A-4-62 durante 15 min a 6.000 g y resuspendidos en 10 mM MES-NaOH (pH 5,6), 10 mM MgCl₂ hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5. Los genes de virulencia se indujeron con 150 µM de acetosiringona durante 2 h a 24°C. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos fueron agroinfiltrados en hojas de *N. benthamiana*.

7.3 Inoculación mecánica

El jugo bruto para la infección mecánica de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* se preparó macerando tejido infectado y resuspendiéndolo en 0,5 M de fosfato potásico (pH 7,5). Los inóculos utilizados se prepararon con material fresco, o bien, a partir de tejido almacenado a -80°C. Las plantas se espolvorearon con carburo de silicio (Carborundum), con el objetivo de generar microabrasiones que permitan la entrada del virus. Por último se frotaron 2 hojas, previamente marcadas con rotulador, con un hisopo impregnado en inóculo. En ocasiones para aumentar la eficiencia de la infección se añadió Carborundum al propio inóculo, sin embargo, el riesgo de lesión es superior que con la técnica anterior.

8. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

8.1 ELISA indirecto para la detección de Potyvirus

Se realizó un ELISA indirecto para determinar la presencia de TuMV en las muestras. Para ello, el tejido vegetal se maceró y se resuspendió en tampón de extracción de ELISA indirecto pH 7,4 (150 mM Na_2CO_3 , 284 mM NaHCO_3 y 1% PVP-40). El extracto se clarificó centrifugando las muestras durante 1 min. Posteriormente se añadió a cada pocillo de placa de ELISA (Thermo Scientific™ Nunc™) 100 μL del extracto. La placa se cubrió con plástico transparente y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 3 min cada uno, con PBS-Tween (pH 7,4) (20 mM NaHPO_4 , 80 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 3 mM KCl y 10% Tween-20) y se añadieron 98 μL de la solución de anticuerpo monoclonal anti-Poty (Agdia®) por pocillo, diluidos 1:200 en tampón conjugado (10X PBS, 10% Tween-20, 2% PVP-40) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween, después de los cuales se adicionaron 95 μL por pocillo de la solución de anticuerpos conjugados (anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina) diluidos 1:200 en tampón conjugado y se incubó durante 1 h a TA. Se llevaron a cabo otros 3 lavados con PBS-Tween y a continuación se añadieron 100 μL por pocillo de la solución de sustrato: p-nitrofenol de concentración 1 mg/mL en tampón sustrato de fosfatasa alcalina (pH 9,8) (10% dietanolamina, 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y a 3,8 mM NaN_3), luego se cubrió la placa con papel de aluminio y se incubó a TA. Finalmente se realizaron lecturas espectrofotométricas a 405 nm transcurridos 30 min, 60 y 90 min de la incubación. Se utilizó un lector de ELISA (Tecan®).

9. Construcciones génicas

9.1 Construcción del clon infectivo de pGTuMV-JPN 1

La construcción del clon infectivo del aislado JPN 1 de TuMV se llevó a término en varias etapas. La primera etapa consistió en la construcción del plásmido pG35Z derivado del plásmido binario pGTEV (Bedoya y Daròs, 2010); para ello el cADN del Virus del grabado del tabaco (TEV, *Tobacco etch virus*) (Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) flanqueado en la región 5' por el promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CMV, *Cauliflower mosaic virus*) (Familia: *Caulimoviridae*, Género: *Caulimovirus*) fue sustituido por un sitio de multicolonación con 2 puntos de restricción *Eco31 I* separados por un *cassette* de expresión con el péptido α - de la β -galactosidasa.

La segunda etapa consistió en la amplificación del cADN proveniente del clon no infectivo de longitud completa del aislado JPN 1 (Sánchez y col., 2015). Dicha amplificación se llevó a término con oligonucleótidos flanqueados con la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción *Eco*31 I.

En la tercera etapa, el cADN del aislado JPN 1 fue insertado en el sitio de clonaje *Eco*R V del vector pBluescript II KS(+). A continuación, el plásmido fue digerido por la enzima *Eco*31 I (Thermo Fisher Scientific®) y subclonado en el vector PG35Z, previamente digerido con la enzima *Eco*31 I.

El plásmido resultante se denominó pGTuMV-JPN 1. La secuencia clonada fue comparada con la secuencia original (GenBank: KM0941714.2) observándose un cambio en la posición 6801 de la secuencia KM0941714.2, el cual produjo un cambio de nucleótido (Adenina por Guanina) y un cambio de aminoácido (Arginina por Lisina).

9.1.1 Construcción de mutantes puntuales sobre el clon infectivo de p35-Tunos

La inserción de las mutaciones puntuales en las posiciones 268, 279 y 280 de la proteína P3 del clon infectivo de p35-Tunos (Sánchez y col., 1998) se realizó mediante PCR solapante. Los oligonucleótidos utilizados para la PCR solapante vienen recogidos en la tabla 8. El fragmento amplificado fue clonado en el vector PCR-Blunt II-TOPO® (Thermofisher®) siguiendo las instrucciones del fabricante y transformado en *E. coli* DH5 α . Los plásmidos portadores de los fragmentos mutados fueron seleccionados por PCR de colonia. Los clones positivos, fueron enviados a secuenciar.

El plásmido p35-Tunos y los plásmidos pBlunt II-TOPO [UK 1 M268I], pBlunt II-TOPO [UK 1 T279K], pBlunt II-TOPO [UK 1 M280I] y pBlunt II-TOPO [UK 1 K279T-M280I] fueron digeridos con las enzimas *Sna*B I y *Btg* I (New England Biolabs®) a 37°C durante 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la enzima y se procedió a desfosforilar el vector p35-Tunos previamente digerido con las enzimas *Sna*B I y *Btg* I (p35-Tunos Δ Sna I-Btg I).

El fragmento vector e inserto fueron ligados y, posteriormente, transformados en *Escherichia coli* DH5 α . Los transformantes fueron chequeados por PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos TuMV [UK 1] E1 (D) y TuMV [UK 1] E2 (R). Los clones positivos fueron enviados a secuenciar.

Los clones seleccionados fueron inoculados en *N. benthamiana* con el objetivo de comprobar la infectividad de los mismos. El tejido procedente del pase 0 en *N. benthamiana* se empleó para la inoculación de *A. thaliana*. Con el fin de poder determinar si las mutaciones introducidas en el clon infectivo de JPN 1 eran estables se realizó IC-RT-PCR de tejido infectado procedente de *A. thaliana*, utilizando los oligonucleótidos TuMV [UK 1] E1 (D) y TuMV [UK 1] E2 (R).

9.2 Construcción de mutantes puntuales sobre el clon infectivo de pGTuMV-JPN 1

La inserción de las mutaciones puntuales en las posiciones 268, 279 y 280 de la proteína P3 del clon infectivo de pGTuMV-JPN 1 se realizó mediante PCR solapante. Los plásmidos portadores de los fragmentos mutados fueron seleccionados por PCR de colonia. Los clones positivos, fueron enviados a secuenciar.

El fragmento amplificado fue clonado en el vector PCR-Blunt II-TOPO® (ThermoFisher®) siguiendo las instrucciones del fabricante y transformado en *E. coli* DH5α. Los plásmidos portadores de los fragmentos mutados fueron seleccionados por PCR de colonia. Los clones positivos, fueron enviados a secuenciar.

El plásmido pGTuMV-JPN 1 y los plásmidos pBlunt II-TOPO [JPN 1 I268M], pBlunt II-TOPO [JPN 1 K279T] y pBlunt II-TOPO [JPN 1 K279T-I280M] fueron digeridos con la enzima *Sal* I (New England Biolabs®) a 37°C durante 3 h. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivó la enzima y se procedió a desfosforilar el vector pGTuMV-JPN 1 previamente digerido con la enzima *Sal* I (pGTuMV-JPN 1 Δ*Sal* I).

Los productos de la ligación fueron transformados en *E. coli* DH5α y chequeados por PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos TuMV [JPN 1] E1 (D) y TuMV [JPN 1] E2 (R). Los clones positivos fueron enviados a secuenciar.

Los clones seleccionados fueron inoculados en *Nicotiana benthamiana* con el objetivo de chequear la infectividad de los mismos. El tejido procedente del pase 0 en *N. benthamiana* se empleó para la inoculación de *A. thaliana*. Con el fin de poder determinar si las mutaciones introducidas en el clon infectivo de JPN 1 eran estables se realizó IC-RT-PCR de tejido infectado procedente de *A. thaliana*, utilizando los oligonucleótidos TuMV [JPN 1] E1 (D) y TuMV [JPN 1] E2 (R).

10. Construcción de vectores para expresión transitoria

Para la expresión transitoria de la proteína P3 del Virus del mosaico del nabo se fusionaron las proteínas silvestres (P3[UK 1] y P3[JPN 1]) y mutantes (P3[UK 1 K297T] y P3[JPN 1 T297K] con la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*) y la proteína roja fluorescente (ChFP, *Cherry Fluorescent Protein*). La fusión de las proteínas fluorescentes se realizó en posición C-y N-terminal de la proteína P3.

La amplificación de las proteínas P3 silvestres y mutantes se realizó mediante PCR utilizando como molde los clones infectivos p35Tunos, pGTuMV-JPN 1, p35Tunos P3[UK 1 K297T] y pGTuMV P3[JPN 1 T297K]. Los oligonucleótidos sentido y antisentido contenían dianas para las enzimas de restricción *Nhe* I y *Nco* I en los extremos 5'.

Los fragmentos amplificados fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Nco* I (Takara®) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los fragmentos resultantes fueron clonados en el vector modificado pBluescript KS (+) (Stratagene) que se encuentra bajo el control del promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor (CMV, *Cauliflower mosaic virus*) (Familia: *Caulimoviridae*, Género: *Caulimovirus*) y del terminador del gen del inhibidor II de la proteinasa de la patata (Popit, Potato proteinase inhibitor terminator, PoPit). Este vector está preparado para la fusión de las proteínas de interés, con la proteína GFP o ChFP en su posición N- o C-terminal. Las construcciones resultantes fueron: pBluescript KS P3[UK 1]-GFP, pBluescript KS GFP-P3[UK 1], pBluescript KS P3[UK 1]-ChFP, pBluescript KS ChFP-P3[UK 1], pBluescript KS P3[JPN 1]-GFP, pBluescript KS GFP-P3[JPN 1], pBluescript KS P3[JPN 1]-ChFP, pBluescript KS ChFP-[JPN 1]P3, pBluescript KS P3[UK 1 K297T]-GFP y pBluescript P3 KS [JPN 1 T297k]-GFP.

Los cassettes de expresión 35S-P3[UK 1]-GFP-PoPit, 35S-P3[UK 1]-GFP-PoPit, 35S-GFP-P3[UK 1]-PoPit, 35S-P3[UK 1]-ChFP-PoPit, 35S-ChFP-P3[UK 1]-PoPit, P3[JPN 1]-GFP-PoPit, 35S-GFP-P3[JPN 1]-PoPit, 35S-P3[JPN 1]-ChFP-PoPit, 35S-ChFP-[JPN 1]P3-PoPit, 35S-P3[UK 1 K297T]-GFP-PoPit y 35S-P3[JPN 1 T297k]-GFP-PoPit fueron escindidos de los plásmidos correspondientes mediante digestión con *Hind* III (Takara®) y clonados en el vector binario pMOG800 (Knoester y col., 1998). A las construcciones resultantes se les denominó: pMOG P3[UK 1]-GFP, pMOG GFP-P3[UK 1], pMOG P3[UK 1]-ChFP, pMOG ChFP-P3[UK 1], pMOG P3[JPN 1]-GFP, pMOG GFP-P3[JPN 1], pMOG P3[JPN 1]-ChFP, pMOG ChFP-[JPN 1]P3, pMOG P3[UK 1 K297T]-GFP y pMOG P3[JPN 1 T297k]-GFP.

La fusión de la proteína 6k2 del Virus del mosaico del nabo con la proteína fluorescente ChFP

en su posición C-terminal se llevó a término siguiendo el mismo procedimiento. Sin embargo, en esta ocasión los cassettes de expresión 35S-6k2[UK 1]-ChFP-PoPit y 35S-6k2[JPN 1]-ChFP-PoPit se escindieron con las enzimas de restricción *Xho* I/*Eco*R I y *Hind* III respectivamente (Takara®) y fueron clonadas en el vector pMOG800 digerido con las mismas enzimas de restricción. Los clones resultantes fueron: pMOG 6k2[UK 1]-ChFP y pMOG 6k2[JPN 1]-ChFP.

11. Técnicas microscópicas

11.1 Microscopía estereoscópica

Para observar tejidos con bajo aumento (entre 5 y 20 aumentos) se utilizó una lupa binocular Leica MZ16F, que está acoplada a una cámara digital Leica DFC300 FX. Las imágenes se obtuvieron con ayuda del programa LAS (Leica Application Suite).

11.2 Microscopía óptica

Los cortes histológicos y cortes de tejidos en fresco, se analizaron bajo el microscopio óptico Nikon Eclipse E600, en donde se utilizó iluminación de campo claro y la técnica de Normaski o D.I.C. (contraste diferencial por interferencia). El microscopio está acoplado a una cámara digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1). Las imágenes se obtuvieron con ayuda del programa de análisis de imagen NIS-Elements F3.0.

11.3 Microscopía laser confocal

Para esta técnica se utilizó un microscopio confocal Leica SP8, consistente en un microscopio invertido DMI6000 y una unidad espectral confocal SL con 4 detectores de fluorescencia simultáneos y 3 láseres: láser diodo ultravioleta con una frecuencia de 405 nm; láser de argón con frecuencias de 458, 488 y 514 nm; y láser HeNe con una frecuencia de 633 nm.

Para excitar la GFP, se utilizó el láser de 514 nm, y la emisión se recogió entre 500 y 520 nm (máximo de emisión: 509 nm). Para excitar la mCherry/ChFP, se utilizó el láser de 488 nm, y la emisión se recogió entre 500 y 570 nm (máximo de emisión: 558 nm). Para excitar la lignina de la pared celular, se utilizó el láser de 405 nm, y la emisión de la autofluorescencia se recogió entre 450 y 500 nm. La clorofila se excitó con el láser de 633 nm, y la emisión se recogió entre 660 y 690 nm. El calcoflúor se excitó con el láser de 405 nm, y la emisión se recogió entre 400 y 470 nm (máximo de emisión: 435 nm). El anticuerpo Alexa fluor 488 se excitó con el láser de 488 nm,

y la emisión se recogió entre 500 y 550 nm (máximo de emisión: 525 nm).

La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda (λ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

12. Técnicas histológicas

El tejido de *A.thaliana* fue recolectado en la etapa de desarrollo 6.3 (Boyes y cols. 2001), correspondiente a plantas con una altura de 15 cm (20 días post inoculación). Las secciones transversales del tallo se realizaron utilizando los primeros 5 cm de la parte basal, mientras que las secciones transversales del hipocotilo se realizaron utilizando la parte central de este y descartando la unión de éste con el tallo y la raíz.

12.1 Fijación de tejidos

Los tejidos se fijaron con una solución de FAE (3,7% formaldehído, 5% ácido acético; 50% etanol) y sometidos a 2 pulsos de vacío, de 5 min cada uno y cambiando la solución de fijación en cada pulso. La fijación se prolongó durante 16 h a 4°C con solución de fijación fresca. Seguidamente, las muestras se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de etanol del 15%, 30%, 50%, 70%, 95% y 100% durante 30 min cada una, hasta llegar a etanol absoluto, donde se dejaron durante 12 h a 4°C.

12.2 Inclusión en agarosa

Para realizar los cortes en fresco de tallos de *Arabidopsis thaliana* éstos fueron fijados en FAE e incluidos en 7% agarosa (p/v). Para evitar el choque térmico de los tejidos, estos se colocaron de forma vertical en el agar semisólido (48°C). Una vez incluidos en el agar, se dejaron enfriar en cámara fría durante dos horas a 4°C con el fin de solidificar el agar y dejarlo listo para el corte (Pradhan Mitra y Loqué, 2014).

12.3 Inclusión en resina

El material vegetal fijado previamente como se describió en el apartado x, se incluyó en resina acrílica Technovit® 7100 (Kulzer). Para ello se realizaron cambios de 1 – 2 horas en soluciones de Resina:ETOH (v/v) incrementando poco a poco la concentración de resina (1:2,

1:1, 2:1) hasta llegar a resina pura (100%) en donde se dejaron un periodo superior a 12 horas. El montaje de muestras se realizó en cápsulas de gelatina y para la polimerización se siguieron las instrucciones de por la casa comercial. A partir de las muestras incluidas en resina se obtuvieron cortes histológicos de 2 μm de espesor utilizando cuchillas de cristal y el equipo ULTRA CUT E de Reichert-Jung. Los cortes se dispusieron en portaobjetos tratados con poly-lisina, se tiñeron y se montaron con Merckglass (Merck®) y se visualizaron mediante microscopia óptica.

12.4 Tinciones histológicas

Todos los colorantes preparados fueron filtrados a través de una membrana de 0,2 μm de diámetro de poro antes de ser utilizados. Durante el proceso de tinción y lavado, se cubrió los portaobjetos para evitar la degradación del colorante, especialmente en aquellos colorantes que emiten fluorescencia.

12.4.1 Tinción con azul de toluidina O

El azul de toluidina O es un colorante metacromático que reacciona con la celulosa presente en la pared celular y es altamente afín por los polisacáridos presentes en la misma. La afinidad por los diferentes polisacáridos da lugar a una amplia gama de tonalidades: la lignina se tiñe en color turquesa, la celulosa en color azul y las hemicelulosas en morado, azul lila o rosa violáceo.

Los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 0,05% (p/v) durante 1 min. Posteriormente se lavaron con abundante agua y se visualizaron mediante microscopia óptica.

12.4.2 Tinción de Wiesner (Floroglucinol-HCl)

El floroglucinol es un colorante monocromático que se une a los grupos coniferaldehídos de la lignina dando lugar a una coloración roja-rosa o rojo cereza al reaccionar con HCl concentrado. Los cortes se tiñeron con 1% floroglucinol (p/v) durante 1 min.

Posteriormente se adicionó una gota de HCl 10 N y se visualizó rápidamente bajo el microscopio óptico puesto que no es una tinción permanente.

12.4.3 Tinción de blanco de calcoflúor

El blanco de calcoflúor es un colorante monocromático que se une a los enlaces β 1-4 de

la celulosa presente en la pared celular dando lugar a una coloración blanca. Además, esta sustancia emite fluorescencia al ser activada por radiación ultravioleta.

Los cortes se tiñeron agregando una gota de blanco de Calcoflúor White M2r (Sigma®) y una gota de 10% KOH. Las muestras teñidas se visualizaron mediante microscopia laser confocal excitando el Calcoflúor con el láser de 405 nm y recogiendo la emisión entre 400 y 470 nm.

13. Ensayos de Microscopia confocal

13.1 Ensayo de despolimerización de microfilamentos de actina y microtúbulos

El reservorio Latrunculina B (LatB, Sigma®) se preparó en dimetil sulfóxido (DMSO) y fue diluida hasta la concentración deseada en agua. Los experimentos de movilidad de P3 fueron realizados sobre discos de *N. benthamiana* que expresaron transitoriamente las construcciones P3[UK 1]-GFP o P3[JPN 1]-GFP y la proteína de anclaje talina de ratón RFP (*Red Fluorescent Protein*) (dsRFP-talin) (Genovés y col., 2010). Los discos fueron sumergidos en 1 μ M de LatB durante 10 min, los controles se realizaron sobre discos provenientes de plantas que expresaron transitoriamente RFP-talin y el fragmento de la calreticulina que codifica para la señal retención/recuperación en retículo KDEL (pMOG GFP-KDEL) (Genovés y col., 2010). Concentraciones de 2 μ M de LatB durante 10 min provocaron la disgregación del retículo endoplasmático y el citoesqueleto de actina.

Los experimentos de despolimerización de microtúbulos se llevaron a término sobre discos de *Nicotiana benthamiana* que expresaron transitoriamente las construcciones P3[UK 1]-GFP o P3[JPN 1]-GFP y la tubulina fusionado con la proteína RFP. Los discos fueron sumergidos en 100 μ M de Colchicina durante 18 h, los controles se sumergieron en agua y se realizaron sobre discos provenientes de plantas que expresaron transitoriamente RFP-tubulina.

13.2 Ensayo de tinción de la membrana plasmática

La tinción de la membrana plasmática se realizó utilizando Ioduro de Propidio (IP) (Sigma®) el cual queda retenido en la membrana de las células vivas impidiendo su paso al citoplasma. El IP se aplicó a 1 mg/mL a razón de 100 μ L por cada portaobjetos.

13.3 Ensayos de localización de proteínas virales

La localización de la proteína P3 del virus del mosaico del nabo se realizó utilizando marcadores fluorescentes de orgánulos. Golgi se marcó con la proteína α -2,6-sialyltransferasa de rata fusionada en posición N-terminal de la proteína amarilla fluorescente (YFP, *Yellow Fluorescent protein*) y la proteína roja fluorescente (ChFP, *Cherry Fluorescent Protein*): STtmdYFP and STtmdCherry (Boevink y col., 1998). El retículo endoplasmático se marcó con la región de la proteína calreticulina que codifica para la señal retención/recuperación en retículo KDEL (pMOG ChFP-KDEL) (Genovés y col., 2010).

13.4 Inmunohistoquímica para la detección de hemicelulosas

La detección de hemicelulosas en la pared celular de *Arabidopsis thaliana* se realizó mediante inmunohistoquímica. Para llevar a término esta localización, se recogieron plantas de *A. thaliana* en etapa de desarrollo 6.3 de la escala de Boyes y col. (2001), correspondiente a plantas con una altura de 15 cm. La inmunohistoquímica se realizó sobre secciones transversales procedentes de los 5 primeros cm de la parte basal de los tallos. Las secciones transversales de los tallos se fijaron en FAE (3,7% formaldehído, 5% ácido acético; 50% etanol) sin necesidad de aplicar vacío. Una vez fijados, se incubaron en 5% de albúmina sérica bovina (Sigma®) y TBS-T [20 mM Tris-HCl (pH 7,6), NaCl, 150 mM y 0,1% Tween-20 (v/v)] durante 2 h y TA. Las secciones se lavaron durante 5 min en TBS-T y se incubaron en agitación con el anticuerpo primario LM10 (McCartney y col., 2005) diluido 1:50 en TBS-T durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las secciones se lavaron durante 5 min en TBS-T y se incubaron en agitación con el anticuerpo secundario anti-rata Alexa fluor 488 diluido (Invitrogen®) 1:100 en TBS-T durante 1 h y TA. Transcurrido el tiempo de incubación las secciones se lavaron durante 5 min en TBS-T y se montaron para su visualización al microscopio confocal. El anticuerpo secundario Alexa fluor 488 fue excitado a 488 nm y su emisión fue recogida entre 500 y 550 nm.

14. Procesado de imágenes

Las imágenes del presente trabajo han sido tomadas con el equipo Nikon Coolpix 600 (Nikon®). El procesado y el maquetado de imágenes se realizó utilizando Adobe Illustrator CC 2018 (Adobe®), Adobe InDesign CC 2018 (Adobe®) y Adobe Photoshop CC 2018 (Adobe®).

El procesado de las imágenes de microscopía se realizó utilizando el programa ImageJ/Fiji (NIH) y los mismos programas de procesado y maquetado pertenecientes al paquete Adobe®.

15. Bases de datos

Las referencias bibliográficas se obtuvieron a través de los motores de búsqueda Pubmed del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y de la *Web of Science* (WOS) (Thomson Reuters®). Las referencias se organizaron con EndNote X7 (Thomson ISI ResearchSoft).

La base de datos empleada para la búsqueda de información relacionada con genes de *Arabidopsis* fue la base de datos *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR) y *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC).

16. Herramientas bioinformáticas

16.1 Herramientas de biología molecular

La visualización de secuencias, la elaboración de mapas de restricción y el diseño de oligonucleótidos se realizaron mediante el programa informático MacVector™ (Oxford Molecular Ltd.). El alineamiento de secuencias de aminoácidos y nucleótidos se llevó a término mediante el algoritmo Clustal W (v 1.83) (Thompson y col., 1994) contenido en MacVector™.

La traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos, la conversión de secuencias a la secuencia complementaria reversa, así como el estudio de las propiedades o características de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos, se llevaron a cabo mediante herramientas disponibles en MacVector™ (Oxford Molecular Ltd.).

Los oligonucleótidos para la RT-qPCR fueron diseñados tanto con MacVector™ como con el programa Primer₃Plus.

16.2 Predicción de dominios transmembrana

Las predicciones de dominios transmembrana (TMDs) de las proteínas se realizó en línea mediante el algoritmo contenido en programa TMHMM 2.0 (Krogh y col., 2001).

16.3 Generación de modelos tridimensionales

Los modelos tridimensionales de las proteínas P3 de TuMV fueron generadas utilizando el servidor I-TASSER (Roy y col., 2010). Este algoritmo predice estructura y función de una proteína a partir de su secuencia peptídica. Realiza alineamientos múltiples entre partes de la secuencia

problema y secuencias de otras proteínas cuya estructura es conocida, y las utiliza como plantilla para modelar la proteína por fragmentos. Esos fragmentos cuya estructura secundaria ha sido predicha son ensamblados para obtener la proteína completa, y se realizan repetitivos plegamientos de la proteína hasta obtener el modelo atómico tridimensional más probable. La función se predice encontrando homólogos estructurales en la base de datos de proteínas PDB. La certidumbre de las predicciones se mide mediante la puntuación GO (*GO-score*) que varía de 0 a 1, donde 1 significa la máxima similitud entre la proteína problema y la plantilla. La visualización de los resultados se realizó mediante Chimera 1.11.2 (Pettersen y col., 2004).

16.4 Determinación de potenciales electrostáticos

El cálculo de los potenciales electrostáticos de cada uno de los péptidos, se hizo utilizando el software APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) (Baker y col., 2001; Davis y McCammon, 1990). Para realizar el contraste de las cargas, se utilizó una escala de colores entre -3,0 a 3,0 (valor de potencial kT/e ; (k : constante de Boltzmann, T : temperatura absoluta = 298°K, y e : carga del electrón), de este modo se pudo obtener la superficie de color rojo, para las zonas electronegativas, azules para las electropositivas y blancas para las zonas neutras.

17. Apéndice

Tabla 6. Concentraciones de los antibióticos empleados en este trabajo según el plásmido.

Antibiótico	Plásmido	Referencia
Ampicilina (100 µg/mL)	p35Tunos	Sánchez y col. (1998)
	p35Tunos P3[UK 1 M268I]	Este trabajo
	p35Tunos P3[UK 1 T279K]	
	p35Tunos P3[UK 1 M280I]	
	p35Tunos P3[UK 1 K279T-M280I]	
	pBluescript KS P3[UK 1]-GFP	
	pBluescript KS GFP-P3[UK 1]	
	pBluescript KS P3[UK 1]-ChFP	
	pBluescript KS ChFP-P3[UK 1]	
	pBluescript KS P3[JPN 1]-GFP	
	pBluescript KS GFP-P3[JPN 1]	
	pBluescript KS P3[JPN 1]-ChFP	
	pBluescript KS ChFP-P3[JPN 1]	
	pBluescript KS P3[UK 1 K297T]-GFP	
	pBluescript KS P3 [JPN 1 T297k]-GFP	
	pBluescript KS 6k2[UK 1]-ChFP	
	pBluescript KS 6k2[JPN 1]-ChFP	
	pBluescript KS ChFP-KDEL	
	pBluescript II KS-JPN 1	
Kanamicina (50 µg/mL)	pBlunt II-TOPO[UK 1 M268I]	Este trabajo
	pBlunt II-TOPO[UK 1 T279K]	
	pBlunt II-TOPO[UK 1 M280I]	
	pBlunt II-TOPO[JPN 1 K279T-M280I]	
	pBlunt II-TOPO[JPN 1 I268M]	
	pBlunt II-TOPO[JPN 1 K279T]	
	pBlunt II-TOPO[JPN 1 K279T-I280M]	
	PG35Z	
	pGTuMV-JPN 1	

Tabla 7. Concentraciones de los antibióticos empleados en este trabajo según el plásmido o estirpe bacteriana.

Antibiótico	Plásmido	Referencia
Kanamicina (50 µg/mL)	pMOG P3[UK 1]-GFP	Este trabajo
	pMOG GFP-P3[UK 1]	
	pMOG P3[UK 1]-ChFP	
	pMOG ChFP-P3[UK 1]	
	pMOG P3[JPN 1]-GFP	
	pMOG GFP-P3[JPN 1]	
	pMOG P3[JPN 1]-ChFP	
	pMOG ChFP-P3[JPN 1]	
	pMOG P3[UK 1 K297T]-GFP	
	pMOG [JPN 1 T297k]-GFP	
	pMOG 6k2[UK 1]-ChFP	
	pMOG 6k2[JPN 1]-ChFP	
	PG35Z	
	pGTuMV-JPN 1	
	pGTuMV [JPN 1 I268M]	
	pGTuMV [JPN 1 K279T]	
	pGTuMV [JPN 1 K279T-I280M]	
	pGTEV	
	pMOG GFP-KDEL	(Bedoya y Daròs, 2010)
	pMOG ChFP-KDEL	(Genovés y col., 2010)
	pMOG-Sar1[H74L]	
	ChFFP-talina	
	ChFP-Microtubulo	
	STtmdYFP	
	STtmdCherry	(Boevink y col., 1998)
	C58C1	
Rifampicina (50 µg/mL)	C58C1	(Deblaere y col., 1985)
Tetraciclina (7,5 µg/mL)	pSoup	Thole y col. (2007)

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los mutantes puntuales del clon infectivo p35-Tunos y pGTuMV-JPN 1.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
TuMV[UK 1] E1 (S)	AAGCGTGCACTCTAGTATAGGTAATAG
TuMV[UK 1] E2 (A)	TGTGCTATTTTACCCGCGAC
TuMV[UK 1 M268I] I1 (S)	CGAGTACATT <u>G</u> ATAAACTTGAACACATC
TuMV[UK 1 M268I] I2 (A)	GATGTGTTCAAGTTTAT <u>C</u> AATGTACTCG
TuMV [UK 1 K279T] I1 (S)	CGGCAGTCATC <u>G</u> TGATTAGTAAG
TuMV[UK 1 K279T] I2 (A)	CTTACTAATCA <u>C</u> GATGACTGCCG
TuMV[UK 1 M280I] I1 (S)	CTCGGCAGT <u>G</u> ATCTTGATTAGTAAG
TuMV[UK 1 M280I] I2 (A)	CTTACTAAT <u>C</u> AAGATCACTGCCGAG
TuMV[UK 1 K279T-M280I] I1 (S)	CGGCAGT <u>G</u> ATC <u>G</u> TGATTAGTAAG
TuMV[UK 1 K279T-M280I] I2 (A)	CTTACTAATCA <u>C</u> GAT <u>C</u> ACTGCCG
TuMV [JPN 1] E1 (S)	TCGCCAACGCTGAATTGC
TuMV [JPN 1] E2 (A)	CTGGAGAATTTACCATCACTAC
TuMV [JPN 1 I268M] I2 (S)	GTTTATTAGTCACAAT <u>G</u> GCTGCTG
TuMV [JPN 1 I268M] I1 (A)	CAGCAGC <u>C</u> ATTGTGACTAATAAAC
TuMV [JPN 1 T297K] I2 (S)	GTTTATTAGTCA <u>A</u> AATAGCTGCTG
TuMV [JPN 1 T297K] I2 (A)	CAGCAGCTATT <u>T</u> TGACTAATAAAC
TuMV [JPN 1 T279K-I280M] I2 (S)	GTTTATTAGTCA <u>A</u> AAT <u>G</u> GCTGCTG
TuMV [JPN 1 T279K-I280M] I1 (A)	CAGCAGC <u>C</u> ATT <u>T</u> TGACTAATAAAC

*Letras en paréntesis se refieren a oligonucleótido sentido (S) y oligonucleótido antisentido (A)

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la qPCR

Oligonucleótido	Gen	Secuencia 5'-3'
IFL 1 (S) IFL 1 (A)	AT5G60690	CTTTGCTTATCCGGAATGA CCCGGTACAAATCTGAAGGA
IRX 9 (S) IRX 9 (A)	AT2G37090	GCGAGAAGCTGAAGGAGAAA CCGAGTGTTTTTCCACGACT
IRX 10 (S) IRX 10 (A)	AT1G27440	AATCGGACTGAAGGAGCTGA GCGTGGAATATCTGGAGGAA
MYB46 (S) MYB46 (A)	AT5G12870	GGCAACAGGTGGTCTCAGA AGAGGAATCGCTTGCTGTGT
MYB83 (S) MYB83 (A)	AT3G08500	AGAGACAAAGGCAAGCCAAA AGCGAAGGCGACAACCTTTTA
NST 1 (S) NST 1 (A)	AT2G46770	TTACTAGCTGGGCGGCTTTA CATAGCTCCATCTCCGGTGT
SND 1 (S) SND 1 (A)	AT1G32770	GCTACCGGACGTGACAAAAT CCACCCAACCTTCTTCGTTA
VND 6 (S) VND 6 (A)	AT5G62380	CTAACTGGTTCACGCAGCAA TGACCATCATCTCGTTGCAT
VND 7 (S) VND 7 (A)	AT1G71930	GAAGCCAATTCCAAACCAGA TGATGCATCGATGAGGATGT
ACTINA 8 (S) ACTINA 8 (R)	AT1G49240	AACCCAAAAGCCAACAGAGA TGGAAGTGAGAAACCCTCGT

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los plásmidos para la expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
P3[UK 1]-(S)	ACGTCCATGGGAACAGAATGGGAGGACAC
P3[UK 1]-(A)	ACGTGCTAGCTTGATGAACCACCGCCTTTTC
P3[JPN 1]-(S)	ACGTCCATGGGCACCGCGTGGGAAGGAGCACATGGGTTTAATAAC
P3[JPN 1]-(A)	ACGTGCTAGCTTGGTGCACTACTGCTTCTCCTCAGGTTCAATATG
P3[UK 1 K297T]-(S)	TTGTATCAGCTTACTAATCACGATGACTGCCGAGGCGAATC
P3[UK 1 K297T]-(A)	GATTCGCCTCGGCAGTCATCGTGATTAGTAAGCTGATACAA
P3[JPN 1 T297K]-(S)	TTGCATTAGTTTATTAGTCAAAATAGCTGCTGAAGCAAATC
P3[JPN 1 T297K]-(A)	GATTGCTTCAGCAGCTATTTTGACTAATAAACTAATGCAA
6K2[UK 1]-(S)	ACGTCCATGGGCAACACCAGCGACATGAGCAAA
6K2[UK 1]-(A)	ACGTGCTAGCTTCATGGGTTACGGGTTC
6K2[JPN 1]-(S)	ACGTCCATGGGCAACACCAACGACATGAGCAAG
6K2[JPN 1]-(A)	ACGTGCTAGCCTCGTGGGTACCGGGTTC

*Letras en paréntesis se refieren a oligonucleótido sentido (S) y oligonucleótido antisentido (A)

Capítulo 1

Capítulo 1: Generación de un clon infectivo de cADN de un aislado del Virus del mosaico del nabo especializado en infectar rábano

1. Introducción

El virus del mosaico del nabo está considerado como uno de los patógenos más importantes que afecta a cultivos vegetales e industriales, tanto de explotación intensiva como extensiva (Gibbs y col., 2015; Walsh y Jenner, 2002). A diferencia del resto de potyvirus, TuMV presenta una amplia gama de huéspedes (> 300 especies) (Walsh y Jenner, 2002) lo cual lo ha convertido en un patógeno de gran importancia, ya que causa grandes daños y pérdidas económicas. Además, ha sido objeto de estudio en diferentes áreas como la interacción entre planta y virus (Agbeci y col., 2013; Grangeon y col., 2013; Sánchez y col., 2015), replicación y expresión génica (Deng y col., 2015; Wan y col., 2015a), silenciamiento génico y su supresión, (García-Ruiz y col., 2015; Kung y col., 2014) y evolución (Nguyen y col., 2013; Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003; Vijayan y col., 2017) entre otras áreas de interés virológico.

La disponibilidad de diferentes clones infectivos de TuMV (Chen y col., 2007; Jenner y col., 2003; Sánchez y col., 1998; Suehiro y col., 2004) ha sido clave para su manejo, caracterización y generación de mutantes de los aislados más representativos. Sin embargo, todos los clones infectivos obtenidos hasta la fecha pertenecen a la cepa genética MB (Sánchez y col., 2003) o cepa World-B (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003). Por otra parte, la cepa MR (Sánchez y col., 2003) o cepa Asian BR (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003) que agrupa aislados capaces de infectar rábano (*Raphanus sativus*) ha mostrado su resistencia a ser copiada en clones infectivos (Sánchez y col., 2015). Este hecho ha impedido el avance equilibrado de la investigación de TuMV en todas las áreas mencionadas anteriormente

En este capítulo se reporta la construcción de un clon infectivo de JPN 1, aislado perteneciente a la cepa MR (Jenner y Walsh, 1996). Además, se ha realizado su caracterización y validación como representante de esta cepa de TuMV.

2. Resultados

2.1 Infectividad del plásmido pGTuMV-JPN 1

La primera aproximación para la generación de un clon infectivo de JPN 1 fue emplear la misma estrategia seguida para la construcción del clon infectivo de UK 1 (cepa MB) (Sánchez y col., 1998). El clon generado no cubría todo el genoma del aislado JPN 1, puesto que los cebadores utilizados anillaban en la posición 239 (5'UTR) y 9686 (3'UTR) de la secuencia KM0941714.2 (GenBank). El cADN, fue clonado en el vector pUC13 obteniéndose, únicamente, dos clones. Estos clones presentaban dos inserciones de ADN externo: la primera inserción se encontraba en la posición 3780 y se trataba de la secuencia de inserción 3 (IS3, *Insertion sequence 3*) (Timmerman y Tu, 1985); mientras que la segunda inserción tuvo lugar en la posición 3835 y no se pudo caracterizar el origen del ADN. Con el objetivo de evitar el problema de las inserciones de ADN externo, se ensambló un clon de longitud completa eliminando dichas inserciones. Sin embargo, el clon generado no resultó infectivo (Sánchez y col., 2015).

En este capítulo se reporta la construcción de un clon infectivo del aislado JPN 1 de TuMV. Para lograr este objetivo, se reemplazó el genoma de TEV del plásmido pGTEV (Bedoya y Daròs, 2010). La secuencia de JPN 1 clonada en este plásmido fue comparada con la secuencia original (nº de acceso KM0941714.2); se detectó un cambio de nucleótido en la posición 6801 (adenina por guanina), lo cual produjo un cambio de aminoácido (arginina por lisina). El plásmido generado fue agroinfiltrado en plantas de *N. benthamiana* junto al plásmido ayudante pCLEAN-S4837 (Thole y col., 2007) Los síntomas asociados a la infección empezaron a ser visibles a los 11 días post inoculación (dpi); sin embargo, únicamente 3 plantas de 8 mostraron síntomas. El tejido sistémicamente infectado fue utilizado para inocular mecánicamente nuevas plantas de *N. benthamiana*. En esta ocasión 10 plantas de 10 mostraron síntomas de infección a los 7 dpi (figura 15).

Figura 15. Síntomas de JPN 1 en plantas de *Nicotiana benthamiana*. (A) Detalle de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con tampón, (B) síntomas en hojas sistémicamente infectadas con el plásmido pGTuMV-JPN1.

2.2 Estudio comparativo de la gama de huésped de los aislados UK 1 y JPN 1

Uno de los aspectos más importantes de un clon infectivo es su capacidad de reproducir fielmente las características biológicas asociadas al aislado original. Por esta razón se realizó un estudio de gama de huésped comparativo entre los aislados JPN 1 y UK 1 de TuMV, ya que es una de sus características distintivas.

Para llevar a término este experimento se utilizó como inóculo de JPN 1 tejido de *N. benthamiana* infectado sistémicamente por el virus derivado del clon pGTuMV-JPN1, mientras que para UK 1 se utilizó tejido sistémicamente infectado por el virus derivado del clon p35Tunos (Sánchez y col., 1998). En el estudio de gama de huésped se utilizaron diferentes especies de Brassica: *Brassica carinata* (mostaza etíope), *Brassica juncea* (mostaza india) y *Brassica rapa* (nabo). Además, se emplearon tres cultivares de *Raphanus sativus* (rábano), dos de ellos de origen europeo (rábano redondo rojo punta blanca y rábano de pico blanco) y uno de origen oriental (Daikon).

Ambos clones fueron capaces de infectar mostaza india dando lugar a una sintomatología diferencial. El aislado JPN 1 dio lugar a mosaicos amarillos que cursaban con irregularidades de la superficie foliar, en el caso del aislado UK 1 también podían observarse dichas irregularidades, sin embargo, los mosaicos eran de color verdoso (figura 16 A). Al igual que ocurría en la infección de la mostaza india, los aislados de TuMV indujeron en el nabo irregularidades de la superficie foliar que cursaban con mosaicos verdosos (figura 16 B). Por último, la mostaza etíope únicamente fue infectada por el aislado UK 1, dando lugar a hojas de pequeño tamaño y con áreas verde pálido (figura 16 C). Los síntomas aparecieron a los 7 dpi.

Figura 16. Hojas de Brassica sistémicamente infectadas por virus derivados de los clones infectivos pGTUMV-JPN1 y p35Tunos (A) Mostaza india (*B. juncea*), (B) Nabo (*B. rapa*), (C) Mostaza etíope (*B. carinata*). Cada panel muestra, de izquierda a derecha, hojas de plantas inoculadas con tampón fosfato (control), clon infectivo de JPN 1 y clon infectivo de UK 1. (Escala: 5 cm).

El único aislado capaz de infectar rábano fue el aislado JPN 1 dando lugar a hojas con mosaicos verdosos en el caso del cv. Pico blanco y clorosis en el caso del cv. Redondo rojo de punta blanca (figura 17 A y B). El único aislado capaz de infectar rábano fue el aislado JPN 1 dando lugar a hojas con mosaicos verdosos en el caso del cv. Pico blanco y clorosis en el caso del cv. Redondo rojo de punta blanca (figura 17 A y B). El cultivar de origen oriental fue resistente a la infección por JPN 1, probablemente debido a la presencia de resistencias naturales o introducidas en este cultivar (figura 17 C) ya que el huésped original de JPN 1 fue rábano procedente de Japón. Los síntomas aparecieron a los 14 dpi.

Figura 17. Hojas de rábano sistémicamente infectadas por los clones infectivos de TuMV. (A) *R. sativus* cv. Pico blanco, (B) *R. sativus* cv. Redondo rojo punta blanca, (C) *R. sativus* cv. Daikon. Cada panel muestra, de izquierda a derecha, hojas de plantas inoculadas con tampón fosfato (control), clon infectivo de JPN 1 y clon infectivo de UK 1. (Escala: 5 cm).

La infección por TuMV fue comprobada por ELISA en hojas no inoculadas, los resultados de dicha prueba vienen recogidos en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados de ELISA realizados en diferentes especies inoculadas con TuMV

Especie vegetal	Número de plantas infectadas/inoculadas			ELISA*		
	Control	JPN 1	UK 1	Control	JPN 1	UK 1
Mostaza etíope	0/20	0/20	20/20	-	-	+
Mostaza india	0/20	18/20	20/20	-	+	+
Nabo	0/20	18/20	16/20	-	+	+
Rábano cv. Pico blanco	0/20	18/20	0/20	-	+	-
Rábano cv. Redondo rojo punta blanca	0/20	15/20	0/20	-	+	-
Rábano cv. Daikon	0/20	0/20	0/20	-	-	-

* Los resultados de ELISA se consideraron positivos cuando las lecturas colorimétricas fueron 3 veces mayores que las lecturas de sus correspondientes plantas control.

3. Discusión

Los clones infectivos son herramientas fundamentales para el estudio de la biología molecular de los virus, además en muchas ocasiones son el punto de partida para el diseño de vectores de expresión con utilidad biotecnológica. No obstante, estos plásmidos a menudo son inestables cuando se propagan en bacterias como *E. coli* ya que aparecen alteraciones de secuencia tales como mutaciones puntuales y deleciones. Entre los motivos propuestos para explicar esta inestabilidad se encuentra la toxicidad del cADN viral dentro de la bacteria, concretamente, la toxicidad de los productos de los genes virales expresados a partir de promotores crípticos en el cADN viral pero activo en bacterias.

Las dificultades para obtener clones infectivos de otros potyvirus han llevado a abordar este problema desde diferentes aproximaciones. La más aceptada consiste en interrumpir el cADN viral con intrones que evitan la expresión del producto viral en bacterias y que es adecuadamente procesado en el hospedador. Encontramos dos ejemplos en los clones infectivos del Virus del mosaico del guisante transmitido por la semilla (PSbMV, *Pea seed-borne mosaic virus*) (Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (Johansen, 1996) y el Virus de la Sharka (PPV, *Plum pox virus*) (Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) (López-Moya y García, 2000). Otra estrategia utilizada fue la generación de dos subclones solapantes del genoma del Virus Y de la patata (PVY,

Potato virus Y) (Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*), los cuales se ligaban previamente a la inoculación (Jakab y col., 1997). Estudios recientes realizados en el Virus del grabado del tabaco (TEV, *Tobacco etch virus*) (Familia: *Potyviridae*, Género: *Potyvirus*) mostraron que la eliminación de intrones exógenos de la secuencia del cADN del virus y la inserción del casete de expresión de TEV, en orientación inversa, entre el origen de replicación del plásmido y la secuencia del antibiótico de selección, aumentó la estabilidad del plásmido. El clonaje inverso del *casete* de expresión, evita la probabilidad de que la poliproteína de TEV se exprese a consecuencia de los promotores del vector o los promotores crípticos del vector. Adicionalmente el clonaje del *casete* de expresión en un plásmido binario, dio lugar a un plásmido (pGTEV) de alta estabilidad en bacteria (Bedoya y Daròs, 2010).

En este capítulo se reporta la generación por primera vez de un clon infectivo de cADN de un aislado perteneciente a la cepa genética MR. Además, el clon muestra las propiedades biológicas del aislado original. Esta nueva herramienta será de gran ayuda para el desarrollo de nuevos estudios concernientes a este potyvirus de gran importancia biológica y económica.

Capítulo 2:

Capítulo 2: Un aminoácido de la región C-terminal de la proteína P3 del Virus del mosaico del nabo es el responsable de la elongación del tallo floral y del comportamiento subcelular de la proteína

1. Introducción

Los síntomas asociados a las infecciones virales, se caracterizan por la aparición de mosaicos, moteados, lesiones locales y clorosis en tallos y venas. No obstante, los virus son capaces de alterar el plan de desarrollo de la planta infectada. Este aspecto de la interacción virus-planta ha recibido poca atención si se compara con otras áreas como la respuesta de defensa (Sánchez y Ponz, 2018).

El patosistema formado por TuMV y *A. thaliana* ha permitido estudiar la alteración diferencial inducida por los aislados UK 1 y JPN 1 sobre el plan de desarrollo de Arabidopsis. Adicionalmente, la infección inducida por TuMV se encuentra afectada por la etapa del desarrollo en la que se encuentra la planta cuando se inocula (Lunello y col., 2007). Las plantas cultivadas en condiciones de día largo (16 h de luz / 8 h de oscuridad) e inoculadas en la etapa de desarrollo 1.08 (Boyes y col., 2001) se vieron afectadas diferencialmente según el aislado: las plantas infectadas con el aislado UK 1 no desarrollaron tallo floral, mientras que las infectadas con el aislado JPN 1 sí lo hicieron (Sánchez y col., 2015). Adicionalmente, la infección con TuMV afecta a diferentes aspectos del desarrollo de la planta, como se ha revisado en la introducción de la presente tesis.

Los supresores de silenciamiento génico viral han sido señalados por diversos autores como los principales factores virales implicados en las alteraciones del desarrollo de la planta (Chapman y col., 2004; Chellappan y col., 2005; Kasschau y col., 2003), sin embargo, han sido cuestionados por otros (Mlotshwa y col., 2005). El uso de quimeras genómicas virales sobre el patosistema TuMV-Arabidopsis permitió establecer que el determinante mayoritario de los síntomas inducidos por ambos aislados se encuentra en la región C-terminal de la proteína P3, es decir, fuera de la región implicada en la formación de las proteínas de fusión P3N-PIPO y P3N-ALT (Sánchez y col., 2015).

La información referente al papel que juega la proteína P3 durante la infección viral es escasa y se encuentra fragmentada en diferentes direcciones. La bibliografía disponible propone que la proteína potyviral P3 es una proteína de membrana (Cui y col., 2010; Eiamtanastate y col., 2007), actúa como determinante: de síntomas virales (Dallot y col., 2001; Desbiez y col., 2003; Jenner y

col., 2003; Sáenz y col., 2000; Sánchez y col., 2015), de avirulencia en situaciones de resistencia (Hjulsager y col., 2002; Hjulsager y col., 2006; Johansen y col., 2001; Kim y col., 2010) y de la gama de huésped (Salvador y col., 2008; Suehiro y col., 2004; Tan y col., 2005). Adicionalmente se ha encontrado un elemento de ARN en P3 que afecta a la replicación y movimiento virales (Choi y col., 2005). La proteína P3 de TuMV ha sido identificada como determinante de las tres respuestas mencionadas (Jenner y col., 2002; Jenner y col., 2003; Kim y col., 2010; Sánchez y col., 2015; Suehiro y col., 2004; Tan y col., 2005), destacando su región C-terminal como responsable de alguna de estas respuestas (Suehiro y col., 2004; Tan y col., 2005).

Las interacciones potenciales de la proteína P3 en diferentes patosistemas al igual que su localización subcelular. Se ha propuesto que la proteína P3 interactúa (o tiene la capacidad de hacerlo) con otras proteínas virales como P1, HC-Pro, CI, NIa, NIb y VPg (Guo y col., 2001; Merits y col., 1999; Rodríguez-Cerezo y col., 1993; Rodríguez-Cerezo y col., 1997; Shen y col., 2010; Zilian y Maiss, 2011). Por el contrario, otros autores proponen que la proteína P3 solo es capaz de interactuar con algún miembro de este grupo de proteínas (Urcuqui-Inchima y col., 1999), o bien con ninguna (Kang y col., 2004). Adicionalmente se ha propuesto que la proteína P3 es capaz de interactuar consigo misma (Choi y col., 2000). Se ha descrito la interacción de la proteína P3 con diferentes proteínas vegetales como: el factor de despolimerización de la actina 2 (ADF-2, *Actin depolymerizing factor 2*) (Lu y col., 2015), el factor de elongación traduccional 1 alfa 1 (eEF1A, *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*) (Luan y col., 2016), la actina (Cui y col., 2010), la enzima RuBisCo (Lin y col., 2011) y un Dominio de Homología al Reticulón (DHR) (Cui y col., 2018).

La localización subcelular de P3 también ha recibido cierta atención siendo la información disponible algo contradictoria. Se ha propuesto que la proteína P3 se encuentra asociada tanto al retículo endoplásmico (Cui y col., 2010; Cui y col., 2017; Eiamtanasete y col., 2007) como a las vesículas de Golgi (Cui y col., 2010; Cui y col., 2017; Eiamtanasete y col., 2007). También se ha encontrado en el núcleo (Langenberg y Zhang, 1997) y asociada a las vesículas inducidas por 6K2 (Cui y col., 2010).

El estudio detallado de la proteína P3 de TuMV, mediante mutantes puntuales, permitirá correlacionar su comportamiento molecular, subcelular y fenotípico. Adicionalmente, el estudio del comportamiento subcelular de la proteína P3 junto al de la proteína 6K2 permitirá ampliar el conocimiento disponible sobre estas proteínas.

2. Resultados

2.1 La proteína P3 de TuMV es una proteína periférica de membrana asociada al retículo endoplasmático

El determinante viral responsable del desarrollo del tallo floral en plantas de *Arabidopsis* mapea en la región C-terminal de la proteína P3 de TuMV (Sánchez y col., 2015). La información disponible sobre esta proteína es escasa, sin embargo, se ha establecido que las proteínas P3 del Virus de las manchas anulares de la papaya (PRSV, *Papaya ringspot virus*), TEV y TuMV son proteínas asociadas a membrana (Cui y col., 2010; Cui y col., 2017; Eiamtanastate y col., 2007), concretamente, a la membrana del retículo endoplasmático (RE) (Cui y col., 2017). Con el objetivo de estudiar la localización subcelular de la proteína P3 de TuMV, se llevaron a término estudios de expresión transitoria de las proteínas P3 de los aislados UK 1 y JPN 1. Para ello se fusionó la proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) o la proteína fluorescente roja (ChFP, *Cherry Fluorescent Protein*) en posición C-terminal de la proteína P3. La fusión de las proteínas reporteras no se realizó en posición N-terminal puesto que dicha región forma parte de las proteínas de fusión P3N-PIPO (Chung y col., 2008) y P3N-ALT (Hagiwara-Komoda y col., 2016) ambas han sido descartadas como determinantes de la alteración del desarrollo del tallo floral (Sánchez y col., 2015).

Las construcciones proteicas generadas fueron las siguientes: P3[UK1]-GFP, P3[JPN1]-GFP, P3[UK1]-ChFP y P3[JPN1]-ChFP. Cada construcción se agroinfiltró en plantas de *Nicotiana benthamiana* y se analizó su expresión transcurridos 1 o 2 días post infiltración (dpi). Las primeras observaciones revelaron que las construcciones con mayor nivel de fluorescencia fueron P3[UK1]-GFP y P3[JPN1]-GFP, por lo que se decidió continuar el análisis de la proteína P3 con dichas construcciones. El análisis del resto de construcciones no reveló diferencias significativas en el comportamiento en comparación con las construcciones elegidas (Resultados no mostrados).

A 1 dpi la construcción P3[JPN1]-GFP indujo la aparición de una población de partículas punteadas distribuidas por el citoplasma (figura 18 A), mientras que la fluorescencia de la construcción P3[UK1]-GFP marcaba una estructura celular reticulada con acumulaciones fluorescentes asociadas a ésta (figura 18 B). A 2 dpi, ambas P3-GFP marcaban una red poligonal típica del retículo endoplásmico cortical con diferentes intensidades fluorescentes. Las partículas punteadas inducidas por P3[JPN1]-GFP incrementaron su tamaño, alcanzando dimensiones similares a las partículas de P3[UK1]-GFP a 1 dpi (figura 18 C). Sin embargo, la fluorescencia de

P3[UK1]-GFP comenzó a desaparecer del RE y a acumularse en grandes agregados (figura 18 D). La localización de los agregados inducidos por P3[UK1]-GFP se realizó utilizando yoduro de propidio (agente fluorescente intercalante que queda retenido en la superficie de las células vivas) lo cual reveló la acumulación de agregados cerca de la periferia celular (figura 18 E).

Figura 18. Expresión transitoria de la proteína P3 de TuMV fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) en hojas de *N. benthamiana*. (A) P3[JPN 1]-GFP a 1 dpi muestra una población de pequeños puntos distribuidos por todo el citoplasma. (B) P3[UK 1]-GFP a 1 dpi muestra una red poligonal decorada con pequeños agregados (flechas). (C) P3[JPN 1]-GFP a 2 dpi muestra una red poligonal decorada con pequeños agregados (flechas) (D) P3[UK 1]-GFP a 2 dpi forma grandes agregados (flechas) cercanos a la periferia celular. (E) Células epidérmicas teñidas con yoduro de propidio (rojo) expresando P3[UK 1]-GFP. Escala: 10 μ m.

Con el fin de confirmar que la estructura reticulada visible en ambas construcciones era el RE, ambas proteínas se coexpresaron junto con un marcador rojo fluorescente del RE (ChFP-KDEL) (Serra-Soriano y col., 2014). A 1 dpi, la red fluorescente tubular y poligonal visible en plantas agroinfiltradas con P3[UK1]-GFP solapaba con el marcador del RE (figura suplementaria 1 A-C). Se obtuvo una imagen muy similar con P3[JPN1]-GFP a 2 dpi (figura suplementaria 1 D-F), confirmando así que TuMV es una proteína asociada al RE en ambos aislados virales.

La proteína P3 de TEV forma inclusiones punteadas que se encuentran asociadas a Golgi (Cui y col., 2010). Las partículas P3 de TuMV mostraron un comportamiento similar a las vesículas

de Golgi, puesto que eran altamente móviles. Sin embargo, a diferencia de éstas, las partículas P3 presentaban heterogeneidad de tamaño. Con el objetivo de determinar si las proteínas P3 de TuMV estaban asociadas a Golgi se coexpresaron por separado las proteínas P3[UK1]-GFP y P3[JPN1]-GFP con el marcador de Golgi STtmd-ChFP (Serra-Soriano y col., 2014). En ninguno de los dos casos, las P3-GFP se localizaron conjuntamente con el marcador, lo cual pone de manifiesto que las proteínas P3 TuMV se asocian al RE (figura 19).

Figura 19. Coexpresión transitoria de la proteína P3 de TuMV fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) y la α -2,6-sialiltransferasa fusionada con la proteína roja (cherry) fluorescente (ChFP) (STtmd-ChFP) (marcador de Golgi), en hojas de *N. benthamiana*. Las imágenes superpuestas de los canales rojo y verde se muestran en la columna de la derecha. **(A)-(C)** No hay co-localización de P3[UK 1]-GFP con Golgi. **(D)-(F)** No hay co-localización de P3[JPN 1]-GFP con Golgi. Escala: 10 μ m.

Se ha propuesto que la proteína P3 de TEV es una proteína integral de membrana con 2 dominios transmembrana (Cui y col., 2010). Para determinar la naturaleza de la proteína P3 de TuMV se realizaron diversos procedimientos de extracción selectiva de proteínas, los cuales permitieron determinar si TuMV P3-GFP formaba parte integral de la membrana del RE, o bien, estaba periféricamente asociada a ésta. En primer lugar, el tejido foliar agroinfiltrado con las construcciones P3[UK1]-GFP y P3[JPN1]-GFP se homogeneizó en tampón de extracción de microsomas y se clarificó a baja velocidad para obtener la fracción proteica total. El sobrenadante obtenido en el paso anterior se dividió en diferentes alícuotas y se ultracentifugó para obtener

las fracciones S100 y P100 (proteína soluble y proteína asociada a membrana, respectivamente) las cuales se sometieron a diferentes tratamientos para liberar: las proteínas luminales solubles (Peremyslov y col., 2004) (tratamiento con Na_2CO_3), las proteínas débil o periféricamente asociadas a membrana (tratamiento con urea 4 u 8 M) (Schaad y col., 1997) y las proteínas integrales de membrana con la ayuda de un detergente no iónico (tratamiento con Triton X-100). Las alícuotas tratadas se analizaron mediante hibridación tipo Western haciendo uso de un anticuerpo contra la GFP (figura 20). El primer tratamiento no afectó a la asociación de las proteínas P3 con la membrana del RE, lo cual indica que no se trata de una proteína luminal. Por el contrario, el tratamiento con Triton X-100 liberó por completo las proteínas P3 de las membranas. Los tratamientos con urea permitieron la recuperación de la P3-GFP en la fracción S100 en ambos aislados, lo cual indica que ambas P3-GFP son proteínas periféricas de membrana. La presencia de la α -2,6-sialiltransferasa fusionada con GFP (STtmd-GFP (Serra-Soriano y col., 2014)) en la fracción S100 del tratamiento con Triton X-100 confirmó que el procedimiento de extracción separaba correctamente las proteínas solubles y las proteínas de membrana, puesto que dicha proteína es una proteína transmembrana residente en Golgi.

Figura 20. Fraccionamiento subcelular de tejido procedente de *N. benthamiana* agroinfiltrado con P3[UK 1]-GFP, P3[JPN 1]-GFP y STtmd-GFP. El extracto de proteínas fue ultracentrifugado obteniendo la fracción del sobrenadante (S100) y la fracción del sedimento (P100), estas fracciones se trataron con Na_2CO_3 , urea (4 y 8 M) y Triton X-100. Las proteínas procedentes de cada fracción se sometieron a SDS-PAGE e hibridadas con anticuerpo anti-GFP.

2.2 El movimiento de las partículas P3 a través del RE es dependiente del sistema actina-miosina

La evolución temporal de las P3-GFP expresadas de forma transitoria es la de incrementar el tamaño de los agregados asociados al RE, los cuales se mueven utilizando este orgánulo hasta alcanzar puntos, no identificados, de la periferia celular. El estudio del movimiento de cada una de las proteínas recombinantes se realizó tomando videos a diferentes tiempos. A 1 dpi, las partículas pequeñas y medianas de P3[UK1]-GFP presentaban una alta movilidad a lo largo del RE (video S1), mientras que otras parecían oscilar alrededor de la misma ubicación. A 2 dpi la situación había cambiado por completo, puesto que la mayor parte de la fluorescencia se encontraba formando grandes agregados inmóviles (video S2). Además, podía observarse la malla del RE decorada con agregados que habían perdido gran parte de su movilidad. En el caso de P3[JPN1]-GFP la movilidad de las partículas a 2 dpi era comparable a la movilidad de las partículas de UK 1 a 1 dpi (video S3). Transcurridos 3 días post infiltración la fluorescencia dejó de ser visible.

En células vegetales el movimiento de partículas y orgánulos por el RE, depende principalmente de microfilamentos de actina y motores de miosina (Nebenfuhr y col., 1999; Ueda y col., 2010). Dado el movimiento de las P3-GFP asociado al RE se planteó la hipótesis de si dichas proteínas utilizarían los microfilamentos de actina y miosina, asociados al RE. Para abordar esta idea se empleó latrunculina B (Lat B), un agente inhibidor de la polimerización de microfilamentos de actina (Holzinger y Blaas, 2016). El uso de esta droga requiere optimizar la concentración y el tiempo de aplicación ya que, de lo contrario, la integridad del RE podría verse afectada. Los experimentos con Lat B mostraron que la aplicación de esta droga a 1 μ M durante 10 min no alteran la integridad del RE, pero sí de los microfilamentos de actina. Por el contrario, la aplicación de la Lat B a una concentración de 2 μ M durante 10 min alteraba significativamente, tanto la integridad del RE como de los microfilamentos de actina (Resultados no mostrados).

Los ensayos de inhibición de la polimerización de microfilamentos de actina se realizaron sobre discos de hojas procedentes de plantas agroinfiltradas con las construcciones P3-GFP. Para ello, los discos se trataron 10 min con de Lat B 1 μ M, o bien con dimetilsulfóxido (DMSO) en el caso del control negativo (disolvente de Lat B). El análisis de microscopía láser confocal mostró como los tratamientos con Lat B a 1 dpi (UK 1) o 2 dpi (JPN 1) detenían el avance de los agregados fluorescentes asociados al RE, observándose agregados que oscilaban en el mismo punto (video S4 y S5). En la figura 21 D-F puede apreciarse como las proteínas P3 co-

localizan con los microfilamentos de actina. El posible movimiento de las proteínas P3 a través de los microtúbulos fue descartado por la falta de co-localización de las proteínas virales con la tubulina (figura 21 A-C). Además, el tratamiento con colchicina (100 μ M) durante 18 h, no alteró el movimiento de las proteínas P3 (resultados no mostrados). Estos resultados ponen de manifiesto que el movimiento de las proteínas P3-GFP asociado al RE depende de la integridad del citoesqueleto de actina-miosina.

Figura 21. Expresión transitoria de la proteína P3 de JPN 1 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP), el marcador de talina (microfilamentos de actina) y tubulina (microtúbulos) con la proteína roja fluorescente (RFP) (RFP-Talina y RFP-Tubulina). Las imágenes superpuestas de los canales rojo y verde se muestran en la columna de la derecha. **(A)-(C)** No co-localización de P3[JPN 1]-GFP con los microtúbulos. **(D)-(F)** Co-localización de P3[JPN 1]-GFP con los microfilamentos de actina. Escala: 10 μ m.

2.3 Modelos estructurales de la proteína P3 predicen diferencias relevantes en la región C-terminal de ambos aislados

La predicción de dominios transmembrana reveló la presencia de 2 dominios transmembrana (TMD, *transmembrane domain*) en la proteína P3 de TEV (Cui y col., 2010). Los resultados obtenidos en el apartado 1 del presente capítulo, proponen la asociación periférica de la proteína P3 a la membrana del RE, por lo que la presencia de TMDs es poco probable. Sin embargo, el uso de diferentes algoritmos de predicción de dominios transmembrana mostraron la presencia de TMDs en la proteína P3 de TuMV (figura suplementaria 2).

Dada la aparente contradicción entre los resultados obtenidos *in silico* y los resultados experimentales se procedió a realizar un modelado más detallado de la estructura tridimensional de la proteína. El programa elegido para realizar dicho modelado fue I-TASSER (*Iterative Threading ASSEmbly Refinement*) (Roy y col., 2010) el cual permite modelar proteínas que carecen de homólogos en el *Protein Data Bank* (PDB) y que son demasiado largas para una predicción *ab initio*. El algoritmo utilizado por I-TASSER compara pequeños fragmentos de la secuencia de aminoácidos (de estructura desconocida), contra una base de datos de estructuras resueltas; a continuación, ensambla estas estructuras locales mediante el reconocimiento de plegamientos en el PDB. Por otra parte, las regiones no reconocidas o desalineadas son modeladas utilizando el método de Monte Carlo, el cual realiza un modelado *ab initio* (Yang y col., 2015). I-TASSER ha sido clasificado como el mejor programa de predicción de estructura en los últimos experimentos CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*), por lo que se considera un procedimiento de amplísima aceptación (Moult y col., 2014).

La calidad de los modelos generados por I-TASSER se estima mediante el valor de confianza (*C-score*) el cual está basado en la significación de los alineamientos hechos y la convergencia de las simulaciones. La puntuación del *C-score* se encuentra típicamente entre [-5, +2], donde una puntuación más alta refleja un modelo de mejor calidad (Roy y col., 2010; Yang y col., 2015). En el caso de la proteína P3 de TuMV, los modelos estructurales de las proteínas de UK 1 y JPN 1 presentan valores de *C-score* de -2.07 y -2.04, respectivamente; por lo que la calidad de las predicciones debe de ser considerada como media (figura 22).

La estructura secundaria de ambas proteínas se identificó haciendo uso del algoritmo DSSP (*Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) el cual tiene en cuenta la geometría y los puentes de hidrógeno de los aminoácidos (Kabsch y Sander, 1983; Touw y col., 2015). En las estructuras secundarias de ambas proteínas predominan las α -hélices y las hélices 3_{10} . Globalmente, las

estructuras de las proteínas P3 de ambos aislados son similares, ya que presentan un núcleo helicoidal central (entre las posiciones ~75-~265) y 2 subdominios helicoidales localizados en la región N- y C-terminal (entre las posiciones 1-~70 y ~200-270, respectivamente). Aunque no están claramente definidos, estos grandes dominios están unidos a través de (a) 2 segmentos alrededor de los residuos 72-77 y 265-269 y (b) un segmento del núcleo que abarca aproximadamente desde el residuo 180 al 190. En ocasiones las predicciones realizadas con I-TASSER muestran desconexiones entre los subdominios, un ejemplo de esto se observa entre las posiciones 185 y 186. Sin embargo, este hecho no deja de ser un resultado artefactual, ya que no afecta a las superficies proteicas y puede ser reconstruido con programas como Chimera (Pettersen y col., 2004). La región N-terminal de la proteína P3 se orienta y localiza en la misma posición en ambos aislados; sin embargo, no ocurre lo mismo con la región C-terminal ya que ésta ocupa posiciones muy diferentes en el espacio.

Una de las opciones ofrecidas por I-TASSER es la posibilidad de realizar alineamientos entre las estructuras modeladas y las estructuras disponibles en el PDB. El resultado de dicha búsqueda muestra las 10 proteínas con mayor similitud estructural al modelo, ordenadas por la puntuación *TM-score* (0-1), donde 1 indica una perfecta alineación entre estructuras (Zhang y Skolnick, 2004). Las 3 primeras proteínas que mostraron una mayor similitud estructural a los modelos de las proteínas P3 tenían asociado un valor *TM-Score* > 0,660, mientras que las 7 proteínas restantes tenían un *TM-Score* inferior a 0,450. Las 3 proteínas con mayor similitud estructural a los modelos mostrados en la figura 22 son 2 estructuras cristalizadas de la vinculina (Códigos PDB: 1ST6 y 1TR2) y una α -catenina (Código PDB: 41GG). Tanto la vinculina como la α -catenina son proteínas periféricas de membranas implicadas de forma, directa o indirecta, con proteínas integrales de membranas y/o con lípidos de la membrana lipídica (Izard y Brown, 2016; Pokutta y col., 2008). Estas similitudes estructurales ofrecen una idea de la posible función de la proteína P3.

Figura 22. Modelo *in silico* de la estructura de las proteínas P3 de TuMV. (A) Modelo del aislado UK 1 (B) modelo del aislado JPN 1.

2.4 Un aminoácido altamente conservado de la región C-terminal de la proteína P3 es el determinante principal para la elongación del tallo floral

Las plantas de *Arabidopsis* inoculadas previamente a la aparición del botón floral con el aislado JPN 1 desarrollan tallos florales funcionales, sin embargo, no ocurre lo mismo con plantas infectadas por el aislado UK 1. El determinante viral para este carácter se ha mapeado en la región C-terminal de la proteína P3 (Sánchez y col., 2015).

En el modelo tridimensional de la proteína P3 (figura 22) la región C-terminal comprende el subdominio helicoidal localizado en esta región y un segmento corto que une esta región con el dominio helicoidal central. Con el fin de buscar aminoácidos específicos que correlacionen el fenotipo de crecimiento o no del tallo floral, se inocularon 10 aislados de TuMV (Obsequio del Profesor John Walsh. *University of Warwick*, Reino Unido) en *Arabidopsis*. Los resultados revelaron que 5 de los aislados permitieron la elongación del tallo y 5 no. El nombre de los aislados y el alineamiento de la región C-terminal de sus proteínas P3 vienen recogidos en la figura suplementaria 3.

Un análisis detallado de este alineamiento mostró que únicamente 3 posiciones de la región C-terminal (268, 279 y 280) presentaban una perfecta correlación con el crecimiento o no del tallo floral. Los aislados que detenían el crecimiento presentaban la siguiente combinación de aminoácidos: M268, K279, M280; mientras que los que sí la permitían tenían la siguiente: I268, T279, I280.

La estrecha correlación entre la combinación de aminoácidos y el crecimiento o no del tallo floral, condujo a la generación de cinco mutantes de aminoácidos individuales: tres sobre el clon infectivo de UK 1 (M268I, K279T y M280I) y dos sobre el clon infectivo de JPN 1 (T279K y I280M). Además, se construyeron dos mutantes dobles: UK 1 K279T-M280I y JPN 1 T279K-I280M. Las plantas infectadas con el mutante doble UK 1 K279T-M280I fueron capaces de desarrollar tallo floral, sin embargo, las plantas infectadas con el mutante JPN 1 T279K detuvieron completamente la elongación del tallo. La misma alteración del patrón de desarrollo pudo observarse en plantas infectadas con los mutantes simples UK 1 K279T y JPN 1 T279K. Tomando en conjunto los resultados obtenidos con los mutantes simples y dobles, puede concluirse que el cambio de aminoácido en la posición 279 de la proteína P3 es el responsable del cambio de comportamiento en el desarrollo del tallo floral. El fenotipo de las plantas infectadas con los siete mutantes puede observarse en la figura 23.

Figura 23. Efecto de la infección por los aislados UK 1 y JPN 1 y, sus respectivos mutantes puntuales, sobre el desarrollo del tallo floral de *A.thaliana*. (A) Las plantas infectadas por el aislado UK 1 no son capaces de desarrollar el tallo floral, (B) al contrario de lo que ocurre con las plantas infectadas por el aislado JPN 1. (C) La presencia de una isoleucina en vez de una metionina en posición 268 de P3[UK 1] no cambia el fenotipo asociado al parental. (D) La presencia de una treonina en vez de una lisina en posición 279 de P3[UK 1] convierte el fenotipo de UK 1 en JPN 1. (E) La presencia de una isoleucina en vez de una metionina en posición 280 de P3[UK 1] no cambia el fenotipo asociado al parental. (F) La presencia de una treonina en vez de una lisina en posición 279 y una isoleucina en vez de una metionina en posición 280 de P3[UK 1] cambia el fenotipo asociado al parental. (G) La presencia de una lisina en vez de una treonina en posición 279 de P3[JPN 1] inhibe el crecimiento del tallo floral (H) La presencia de una metionina en vez de una isoleucina en posición 280 de P3[JPN 1] no afecta al crecimiento del tallo floral. (I) La presencia de una lisina en vez de una treonina en posición 279 y una metionina en vez de una isoleucina en posición 280 de P3[JPN 1] no afecta al crecimiento del tallo floral.

2.5 El cambio de un único aminoácido en la proteína P3 determina el patrón de crecimiento del tallo floral y su patrón de acumulación y movimiento subcelular

El comportamiento subcelular de la proteína P3 (movimiento y acumulación) correlaciona con el patrón de crecimiento/detención del tallo floral. Dado que la mutación de un solo aminoácido cambia el patrón de crecimiento, se verificó si estos dos caracteres (patrón de elongación y comportamiento subcelular) estaban correlacionados en los mutantes. Con el objetivo de validar dicha hipótesis, se intercambiaron los aminoácidos correspondientes en la posición 279 de las proteínas P3-GFP de UK 1 y JPN 1 obteniéndose las proteínas mutantes P3[UK 1 K279T]-GFP y P3[JPN 1 T279K]-GFP.

Las proteínas P3[UK 1 K279T]-GFP y P3[JPN 1 T279K]-GFP se expresaron transitoriamente en *N. benthamiana* y se analizaron en el microscopio confocal transcurridos 2 días tras su agroinfiltración. El panel A de la figura 24 muestra como la presencia de lisina en la posición 279 de la proteína P3[JPN 1] indujo la formación de grandes agregados que se acumularon en la periferia celular, muy probablemente en asociación con la membrana plasmática. Por el contrario, la presencia de treonina en la misma posición de la proteína P3[UK 1] redujo la velocidad de acumulación de la fluorescencia, por lo que ésta se distribuyó marcando el RE cortical en vez de formar grandes agregados periféricos (figura 24 B).

Figura 24. El cambio de un único aminoácido en la posición 279 de la proteína P3 de TuMV afecta a su patrón de acumulación subcelular. (A) La presencia de lisina en vez de treonina en la posición 279 de P3[JPN 1] conduce a la acumulación de la fluorescencia formando grandes agregados localizados en la periferia celular. **(B)** La presencia de treonina en vez de lisina en la posición 279 de P3[UK 1] reduce la formación de grandes agregados. Escala: 10 μ m.

Paralelamente se estudió el movimiento de la proteína P3, observándose que los agregados inducidos por P3[JPN 1 T279K]-GFP eran inmóviles (vídeo S6), mientras que los pequeños agregados inducidos por P3[UK 1 K279T]-GFP tenían una alta movilidad (vídeo S7).

Los resultados obtenidos con los mutantes puntuales, permitieron establecer una estrecha correlación entre la presencia de lisina o treonina en la posición 279 con el patrón subcelular de movimiento y acumulación, así como la elongación o no de tallos florales de *Arabidopsis* infectadas por TuMV.

2.6 Las alteraciones en la elongación del tallo floral y el comportamiento subcelular de la proteína P3 puede asociarse a cambios en su exposición al solvente y su potencial electroestático

Los modelos estructurales de las proteínas P3 de los aislados UK 1 y JPN 1 mostraron diferencias estructurales entre sus dominios C-terminal. Con el objetivo de determinar si el cambio de aminoácido en la posición 279 pudiera ser el responsable del cambio estructural en la región C-terminal, se modelaron las proteínas P3[UK 1 K279T] y P3[JPN 1 T279K] (figura 25), siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 2.3 de este capítulo. La comparación de los modelos con sus respectivos parentales puso de manifiesto que el cambio de aminoácido en la posición 279 modifica levemente la geometría del esqueleto de la proteína, ya que la presencia de lisina en la posición 279 provoca que las cadenas laterales sean más protuberantes y se expuestas al solvente. Este resultado es razonable si se considera que la lisina (a) se encuentra cargada positivamente y (b) tiene una cadena más larga que la treonina. Desde un punto de vista puramente estructural, el efecto sobre el crecimiento del tallo floral y el movimiento y acumulación de la proteína P3 podría estar asociado a una mayor exposición de la lisina al medio acuoso con respecto a la treonina.

A

B

Figura 25. Modelo *in silico* de la estructura de las proteínas P3 de TuMV. (A) Modelo del aislado P3[UK 1 K279T]. (B) Modelo del aislado P3[JPN 1 T279K].

En la interacción proteína-membrana, los potenciales electrostáticos tienen mayor importancia que los cambios estructurales locales o incluso la morfología global de la proteína (Davis y McCammon, 1990; Honig y Nicholls, 1995). Por esta razón se calcularon los potenciales electrostáticos de los aislados UK 1 y JPN 1, así como de los mutantes puntuales P3[UK 1 K279T] y P3[JPN 1 T279K] resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann (PB) con el programa APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) (Baker y col., 2001; Davis y McCammon, 1990). Los resultados se muestran en la figura 28, donde el código de color representa el potencial PB expresado en unidades kT/e (k : constante de Boltzmann, T : temperatura absoluta = 298 K y e : carga del electrón). El potencial PB puede adoptar valores entre -3 (rojo intenso) y 3 (azul intenso). La vista frontal y trasera de las predicciones de los potenciales electrostáticos revela una marcada polaridad en los potenciales electrostáticos entre el dominio central (negativo) y los dominios laterales (positivo) (figura 26). El predominio de superficies cargadas positivamente, es una característica bien establecida en proteínas que interactúan con membranas (Mulgrew-Nesbitt y col., 2006). Por ejemplo, la presencia de lisina en vez de treonina en la posición 279 induce un aumento de la naturaleza electrostática positiva, tanto en la cadena lateral del aminoácido como en la región adyacente.

La presencia de treonina en la posición 279 de la proteína P3[JPN 1] y P3[UK 1 K279T] ralentiza la acumulación de la proteína en agregados y permite el crecimiento del tallo floral. Por otra parte, la presencia de lisina en la posición 279 de la proteína P3[UK 1] y P3[JPN 1 T279K] tiene los efectos opuestos. Dicho comportamiento biológico podría estar explicado por el cambio de potencial electrostático entre las proteínas P3 de los parentales y las proteínas P3 de los mutantes puntuales.

Figura 26. Potenciales electrostáticos de la proteína P3 (visión frontal y trasera). El color rojo intenso indica potencial electrostáticos positivo, mientras que el azul intenso indica un potencial electrostáticos negativo **(A)** P3[UK1] **(B)** P3[JPN 1]; **(C)(D)** P3[UK 1]; **(E)(F)** P3[UK 1 K279T] y **(G)(H)** P3[JPN 1 T279K].

2.7 El comportamiento conjunto de las proteína P3 y 6K2 difiere entre el aislado UK 1 y el aislado JPN 1

La proteína 6K2 es la principal responsable de la reorganización generalizada del sistema de endomembranas, tanto dentro (Wei y col., 2013) como fuera del contexto de una infección viral (Cotton y col., 2009; Grangeon y col., 2012; Wei y Wang, 2008). En la presente tesis se llevó a término el estudio del comportamiento de las proteínas P3 y 6K2 de ambos aislados de TuMV mediante expresión transitoria en *N. benthamiana*. Para alcanzar este objetivo, se fusionó la proteína 6K2 con la proteína fluorescente mCherry (mChFP) dando lugar a las siguientes construcciones: 6K2[UK1]-mChFP y 6K2[JPN1]-mChFP. La expresión transitoria de la proteína 6K2 de ambos aislados mostró el mismo comportamiento, es decir, ambas proteínas presentaron una localización que incluía la envoltura externa y/o el estroma de los cloroplastos, una serie de vesículas de diferentes tamaños y formas que muchas veces se encontraban asociadas a los cloroplastos y que, por tanto, podrían derivar de estos orgánulos. Finalmente, la proteína 6K2 también se observó en un conjunto de estructuras filamentosas originadas a partir de los cloroplastos y que podrían corresponderse con la inducción de estrómulos. Además, ambas proteínas promovieron la acumulación de cloroplastos en la región perinuclear, alguno de ellos marcados en su envoltura externa con 6K2 y asociados a acúmulos y vesículas de la misma proteína (figura suplementaria 3).

La expresión conjunta de las proteínas 6K2[UK1]-mChFP y P3[UK1]-GFP no provocó un cambio significativo en la distribución subcelular de la primera que continuó presentado una distribución como la descrita anteriormente e induciendo la acumulación de cloroplastos en la región perinuclear. Sin embargo, la distribución de la proteína P3, presentó, además de su localización característica en acúmulos de diversos tamaños distribuidos por todo el citoplasma y la periferia celular, acúmulos de mayor tamaño en torno al núcleo siempre junto con otros acúmulos de la proteína 6K2 y cloroplastos como los descritos (figura 27 A-B). Estos acúmulos de 6K2, P3 y cloroplastos también se observaron frecuentemente en el citoplasma, aunque de un tamaño considerablemente inferior a los observados en la región perinuclear. Un estudio del comportamiento dinámico de ambas proteínas reveló como éstas pueden moverse conjuntamente arrastrando los cloroplastos a través del citoplasma (video S8). Como se observa en el video (sobre todo en el campo claro) el destino final de los acúmulos de P3, 6K2 y cloroplastos es una zona próxima al núcleo donde ya existen otros acúmulos de igual composición. La localización de ambas proteínas en la región perinuclear y la implicación de la proteína P3 en la formación del complejo de replicación apuntan a que los cloroplastos son

transportados por ambas proteínas para acumularse finalmente en la región perinuclear donde podrían formar parte del complejo de replicación viral.

En cambio, ni la distribución subcelular ni la dinámica de la proteína P3 del aislado JPN 1 se vio afectada en presencia de la correspondiente proteína 6K2, puesto que la proteína P3 continuó formando pequeños agregados móviles distribuidos por todo el citoplasma, aún en presencia de grandes acúmulos de cloroplastos y 6K2 en la región perinuclear (figura 27 C-D). Aunque ocasionalmente también se pudo observar la proteína P3 asociada a 6K2, este patrón fue considerablemente menos frecuente que en el caso de las correspondientes proteínas del aislado UK1. Esta carencia de asociación entre ambas proteínas también se observó durante el movimiento de las vesículas de 6K2 ya que, éstas no presentaron una asociación con los agregados móviles de P3, que se desplazaron en otras direcciones (video S9).

La fusión de la proteína GFP en el extremo C-terminal de la proteína P3 de JPN 1 podría ser la responsable de la falta de interacción con la proteína 6K2. Con el objetivo de descartar esta posibilidad, se coexpresó la fusión en el extremo N-terminal GFP-P3[JPN1], la cual presenta libre su extremo C-terminal, junto a la 6K2[JPN1]-mChFP. En la figura 22 G-H puede observarse como el resultado fue el mismo, ambas proteínas se distribuyen como se ha descrito anteriormente, es decir, aunque la proteína 6K2 se encuentra localizada en parte en la región perinuclear, la proteína P3 sigue formando pequeños agregados distribuidos por el citoplasma (figura 27 C-D). Se siguió el mismo abordaje para el aislado UK1, por lo que se expresó la proteína GFP-P3[UK1] conjuntamente con la proteína 6K2[UK1]-mChFP. La localización perinuclear de la proteína GFP-P3[UK1] fue mucho más evidente que en el caso de P3[UK1]-GFP al observarse la formación en un mayor número de células de estos acúmulos de P3 en torno al núcleo (figura 27 E-F). Esta situación podría reflejar una mayor accesibilidad del extremo C-terminal de P3 para interaccionar con su entorno puesto que se ha descrito como un elemento estructural necesario para el transporte al VRC y para su asociación con 6K2.

Es relevante resaltar que, tanto la proteína P3 como la proteína 6K2, interactúan con el RE ya que ambas proteínas lo abandonan desde los ERES para acabar interactúan con los cloroplastos (Cui y col., 2017; Grangeon y col., 2012; Wei y col., 2010; Wei y col., 2013). La presencia de P3-UK 1 en estas estructuras membranosas es similar a lo que se ha descrito previamente para TEV por otros autores. Sin embargo, el comportamiento de la proteína P3-JPN 1 es la primera vez que se describe.

Figura 27. Co-expresión transitoria de la proteína P3 fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína 6K2 fusionada con la proteína roja fluorescente(mRFP). (A)-(B) Co-expresión 6K2[UK1]-mRFP y P3[UK1]-GFP. (C)-(D) Co-expresión 6K2[JPN1]-mRFP y P3[JPN1]-GFP. (E)-(F) Co-expresión 6K2[UK1]-mRFP y GFP-P3[UK1]. (G)-(H) Co-expresión 6K2[JPN1]-mRFP y GFP-P3[JPN1]. En la columna de la derecha se muestra el campo claro que permite la localización del núcleo (n). Escala: 10 μ m.

3. Discusión

La proteína P3 de TuMV se ha identificado como la principal mediadora de la elongación o detención del crecimiento del tallo floral de plantas infectadas de *Arabidopsis*, siendo su región C-terminal la responsable de este carácter de desarrollo (Sánchez y col., 2015). Recientemente, la proteína P3 de TuMV ha sido implicada en el ciclo vital del virus (Cui y col., 2017). Estos estudios revelaron la implicación de esta proteína en el movimiento intracelular, la replicación viral, su co-localización con otras proteínas de membrana (6K2) y la formación de agregados de cloroplastos unidos por la proteína 6K2. Todos estos procesos se encuentran regulados por la región C-terminal de la proteína P3. Además, en esta región se ha identificado el motivo molecular responsable, de la resistencia de no-huesped de la mostaza etíope a la infección del aislado JPN 1 de TuMV (Sardaru y col., 2018). Todas estas evidencias proporcionaron el contexto adecuado para la comparación de las proteínas P3 de aislados UK 1 y JPN 1 dado su efecto diferencial en el desarrollo de *Arabidopsis*.

Durante la expresión transitoria de las proteínas P3-GFP de UK 1 y JPN 1 en *N. benthamina*, éstas se asociaron al RE resaltando su forma reticulada. Además, se formaron agregados de proteína que se movían a través del RE y se descartó la posibilidad de que estos agregados se asociaran con las vesículas de Golgi. Los experimentos de extracción de proteínas revelaron la asociación periférica de las proteínas al RE. Ambas proteínas indujeron la formación de grandes agregados fluorescentes, a diferentes velocidades. La proteína P3-UK 1 formó grandes agregados un día después de su agroinoculación, mientras que la proteína P3-JPN 1 tardó un día más en agregarse. En ambos casos la acumulación de los agregados tuvo lugar en la periferia celular, situación que podría estar relacionada con el papel de la proteína P3 en el movimiento intercelular viral. En trabajos recientes, se ha propuesto la presencia de subdominios específicos del RE implicados en el movimiento viral a través de los plasmodesmos. Estos subdominios se conocen como c-MERS (puntos del RE asociados a microtúbulos) o puntos de contacto entre la membrana plasmática y el RE (puntos de contacto MP-RE) (Pitzalis y Heinlein, 2017) y podrían ser los lugares de agregación de la proteína P3 en la periferia celular. En trabajos previos realizados con los aislados UK 1 y JPN 1 se observó que a tiempos cortos, había una mayor acumulación del virus en plantas infectadas por UK 1 que en plantas infectadas por el aislado JPN 1 (Manacorda y col., 2013), probablemente debido a la diferencia en la tasa de acumulación de la proteína P3 y por ende del movimiento célula a célula del virus.

La interacción que establecen las proteínas periféricas con la membrana es más flexible que la que se establece las proteínas integrales, además esta interacción puede estar mediada por otras proteínas, tanto periféricas como integrales (Monje-Galván y Klauda, 2016). La estructura tridimensional de las proteínas determina, en gran medida, el tipo de asociación que establece la proteína con la membrana o con sus mediadores de unión a membrana. En el caso de TuMV no se ha resuelto ninguna estructura tridimensional, es por esta razón que se recurrió a los algoritmos I-TASSER y DSSP para modelar y detectar las estructuras secundarias, respectivamente. Los modelos obtenidos constan de 2 grandes dominios helicoidales separados por una región helicoidal central. Cabe destacar que en ninguno de los modelos obtenidos se observaron dominios transmembrana, lo cual se encuentra en consonancia con el carácter periférico de la proteína. La región N-terminal de la proteína P3 ocupaba una localización similar para ambos aislados. Sin embargo, la región C-terminal, implicada en el desarrollo del tallo floral, era espacialmente diferente.

Las diferencias en el comportamiento subcelular de la proteína P3, junto a las diferencias en su estructura tridimensional condujeron a la identificación del motivo(s) molecular implicado en el alargamiento/detención del tallo floral. La identificación del determinante viral permitiría vincular directamente las diferencias fenotípicas, subcelulares y moleculares. La comparación de la secuencia de la proteína P3 de diferentes aislados de la raza MB y MR favoreció la identificación de 3 posiciones altamente conservadas en la región C-terminal de la proteína. La obtención de mutantes simples y dobles sobre los clones infectivos de UK 1 y JPN 1 permitieron identificar que la posición 279 era la responsable del crecimiento, o no, del tallo floral en plantas de Arabidopsis. El intercambio de comportamiento entre las proteínas P3 también pudo observarse a nivel subcelular, lo que permitió correlacionar el comportamiento fenotípico con el subcelular. Adicionalmente, la presencia de lisina en la posición 279 aumentó significativamente el potencial electrostático de esta región, lo cual podría alterar la interacción de la proteína P3 con la membrana. Actualmente se desconoce el mediador de la interacción entre la proteína P3 y la membrana del RE. Sin embargo, se ha propuesto que la proteína P3 del Virus del mosaico de la soja interacciona directamente con un Dominio de Homología al Reticulón, una proteína integral del RE (Cui y col., 2018).

La diferencia más significativa en el comportamiento de las proteínas P3 se observa cuando éstas se encuentran en presencia de sus respectivas proteínas 6K2. La proteína P3 de UK 1 presentó su localización característica en acúmulos de diversos tamaños distribuidos por todo el citoplasma y en la periferia celular, además pudo observarse acúmulos de mayor tamaño en

torno al núcleo y siempre junto a acúmulos de la proteína 6K2 y cloroplastos. A pesar de que no se ha descrito interacción directa entre la proteína P3 y 6K2, el estudio dinámico de ambas proteínas reveló como éstas pueden moverse conjuntamente arrastrando los cloroplastos a través del citoplasma hasta la región perinuclear donde formarán el complejo de replicación viral. Recientemente se ha puesto de manifiesto la importancia de la presencia de la proteína P3 para la formación de este complejo de replicación viral (Cui y col., 2017). Por el contrario, ni la distribución subcelular ni la dinámica de la proteína P3 del aislado JPN 1 se vio afectada en presencia de su correspondiente proteína 6K2. Los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que los potyvirus adoptan diferentes soluciones para la formación del complejo de replicación viral y su movimiento intracelular.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en la presente tesis, puede proponerse un modelo (todavía incompleto) para los posibles papeles desempeñados por la proteína P3 durante la infección por TuMV (figura 28).

La replicación es uno de los procesos clave en el ciclo viral siendo la proteína P3 es un elemento clave en la formación del complejo de replicación viral (Cui y col., 2017). Los resultados obtenidos en esta tesis ponen de manifiesto la actuación conjunta de las proteínas P3 y 6K2 a la hora de transportar cloroplastos hacia la región perinuclear donde tendrá lugar el proceso de replicación. El transporte de estos cloroplastos está mediado por el movimiento de ambas proteínas a través del sistema de actina-miosina. La situación descrita corresponde al comportamiento exhibido por el aislado UK 1, sin embargo, se requieren nuevos experimentos que permitan establecer si realmente la proteína P3 de TuMV participa en la formación del complejo de replicación viral.

El movimiento célula a célula es una etapa crucial en la dispersión del virus en la planta. Por esta razón es un proceso altamente coordinado en el que se han implicado las proteínas de movimiento (CI y P3N-PIPO) (Movahed y col., 2017) además de la proteína P3 (Cui y col., 2017). Probablemente, la participación de la proteína P3 en el movimiento célula a célula sea la de mediar el transporte de los complejos de replicación viral inducidos por la proteína 6K2 hasta ubicaciones específicas de la periferia celular (¿c-MERs/sitios de contacto RE-MP?). Una vez alcanzados estos puntos, mediado por el sistema de actina-miosina, las proteínas dedicadas al movimiento serían las responsables de mediar el paso de los complejos de replicación a través de los plasmodesmos. Dadas las diferencias en la acumulación de la proteína P3 en la periferia celular, la velocidad de dispersión del virus será dependiente del aislado viral.

La posible relación entre el comportamiento subcelular de la proteína P3, su estructura

tridimensional y las alteraciones inducidas en el fenotipo de la planta requieren de experimentos adicionales que permitan tener una visión integradora del mecanismo de acción de la proteína P3.

Figura 28. Representación esquemática de los principales eventos que tienen lugar durante el ciclo de infección de TuMV. (1) Los viriones entran en la célula huésped pegados al estilete del pulgón vector o por inoculación mecánica. (2) Desencapsidación del virión. (3) El ARN genómico es traducido por los ribosomas del huésped y la poliproteína generada es procesada dando lugar a las proteínas virales. (4) Formación de la estructura globular inducida por las proteínas virales. (5) Las vesículas decoradas con la proteína 6K2 y la proteína P3 de UK 1 se acumulan en los ERES desde donde salen del RE dirección a los cloroplastos. El trabajo coordinado de ambas proteínas permite el transporte de estos orgánulos hacia la estructura perinuclear. (6) Los cloroplastos sufren una serie de modificaciones de membrana que permitirán albergar el proceso de replicación (7) Parte de los VRCs evolucionan a DMTs donde tiene lugar el proceso de encapsidación. (8) Las partículas virales ensambladas abandonan la estructura globular y se dirigen a la vacuola central donde serán almacenadas. (9) Una proteína con un dominio de homología a reticulón (RHP) media el movimiento del VRC y la proteína P3 de UK 1, a través del RE, hasta los C-MERs. La proteína P3 de JPN 1 participaría en un proceso similar. (10) Los VRCs atraviesan los plasmodesmos asistidos por las proteínas de movimiento (CI y P3N-PIPO). (11-13) Los VRCs viajan a través de diferentes tipos celulares hasta alcanzar los tubos cribosos donde comenzaran su movimiento a larga distancia (14-15).

4. Material suplementario

Figuras suplementarias

Figura suplementaria 1. Expresión transitoria de la proteína P3 de TuMV fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) y el marcador de retículo endoplasmático fusionado con la proteína roja fluorescente (cherry) (ChFP-KDEL). Las imágenes superpuestas de los canales rojo y verde se muestran en la columna de la derecha. **(A)-(C)** Co-localización de P3[UK 1]-GFP con RE. **(D)-(F)** Co-localización de P3[JPN 1]-GFP con RE. Escala: 10 μ m.

Figura suplementaria 2. Predicción de regiones transmembrana de la proteína P3 de TuMV. Las gráficas mostradas corresponden al programa TMHMM (*Trans-Membrane prediction Hidden Markov Models*), en las cuales las regiones transmembranas se muestran en rojo, mientras que el resto de regiones predichas pueden estar en el interior (azul) o fuera (rosa) de la membrana. **(A)** La predicción de la proteína P3[JPN 1] muestra la presencia de 2 dominios transmembrana localizados en la posición N- y C-terminal de la proteína. **(B)** La predicción de P3[UK 1] muestra un único dominio transmembrana localizado en la region C-terminal de la proteína.

CDN 1 (BAC79407)	239	RSSMSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	TAEANHIVTTQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTLD	328
CZE 1 (BAC79405)	239	RSSVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	MAVEANHMIAATQRLKLDVEEAERRKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTID	328
FRA 2 (BAM99226)	239	RSSVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	IAEANNIITQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHSMLTQSAGQHPTLD	328
NLD 1 (BAF31178)	239	RSSISWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	TAEANHIVTTQRLKLDVEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTID	328
UK 1 (AF169561_1)	239	RSSMSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	TAEANHIVTTQRLKLDVEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTID	328
CHN 1 (BAC79423)	239	RSSVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	AAEANRIVTTQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTLD	328
GK 1 (BAM99214)	239	RNSASWVSGKISSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	MAEANRIVTAQRLKLDVAESERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTID	328
ITA 7 (BAC79397)	239	RNTVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	AAEANRIVTTQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTLE	328
DEU 4 (BAM99219)	239	RNTVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	AAEANRIVTTQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTLD	328
JPN 1 (AIR95656)	239	RSSVSWTSSKVSNSVCRTINYLVPDVFKF	NVLVCISLLIK	AAEANRIVTTQRLKLDIEETERKKIEWELAFHHNLTQSAGQHPTLD	328
CDN 1 (BAC79407)	329	EFIAYIAEKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
CZE 1 (BAC79405)	329	EFRTYIAEKAPHLSDHIEPEEKAVVHQ			355
FRA 2 (BAM99226)	329	EFTAYIAEKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
NLD 1 (BAF31178)	329	EFRAYIADKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
UK 1 (AF169561_1)	329	EFRAYIADKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
CHN 1 (BAC79423)	329	EFTTYIGEAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
GK 1 (BAM99214)	329	EFIAYISEKAPHLTEYVKEPEEKAVVHQ			355
ITA 7 (BAC79397)	329	EFTAYITEKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
DEU 4 (BAM99219)	329	EFTAYIAEKAPHLSEHIEPEEKAVVHQ			355
JPN 1 (AIR95656)	329	EFTAYIGEAPHLNEHIEPEEKAVVHQ			355

Aislados que detienen el crecimiento del tallo floral
Aislados que permiten el crecimiento del tallo floral

Figura suplementaria 3. Alineamiento múltiple de secuencias correspondientes a la región C-terminal de la proteína P3. El número de accesoión correspondiente a los aislados de TuMV viene entre paréntesis. Los números a la derecha y a la izquierda indican la posición de aminoácido.

Figura suplementaria 4. Expresión transitoria de la proteína 6K2 de TuMV fusionada con la proteína roja fluorescente (ChFP). (A) Autofluorescencia de los cloroplastos. **(B)** Proteína 6K2 fusionada con la proteína ChFP. **(C)** Imágenes superpuestas de los canales morado y rojo. Escala: 10 μ m.

Vídeos suplementarios

Vídeo S1: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[UK 1]-GFP a 1 dpi.

Vídeo S2: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[UK 1]-GFP a 2 dpi.

Vídeo S3: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[JPN 1]-GFP a 2 dpi.

Vídeo S4: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[UK 1]-GFP a 1 dpi y tratadas con 1 μ M de Lat B.

Vídeo S5: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[JPN 1]-GFP a 2 dpi y tratadas con 1 μ M de Lat B.

Vídeo S6: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[JPN 1 T279K]-GFP.

Vídeo S7: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando P3[UK 1 K279T]-GFP.

Vídeo S8: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando 6K2[UK1]-mChFP y P3[UK1]-GFP. La autofluorescencia de los cloroplastos se puede observar en color morado. En la parte izquierda del video puede verse el campo claro.

Vídeo S9: *Time-lapse* de células de *N.benthamiana* expresando 6K2[JPN1]-mChFP y P3[JPN1]-GFP. La autofluorescencia de los cloroplastos se puede observar en color morado. En la parte izquierda del video puede verse el campo claro.

Capítulo 3

Capítulo 3: La infección por el Virus del mosaico del nabo provoca grandes alteraciones en la biosíntesis de la pared celular secundaria de Arabidopsis

La temática tratada en el presente capítulo, hace necesaria una breve revisión sobre la composición, biosíntesis, estructura y regulación genética de la pared celular vegetal.

1. Introducción

El desarrollo y crecimiento en organismos multicelulares depende esencialmente de dos procesos: la división y la diferenciación. La división consiste en la generación de células hijas a partir de una célula madre. En las plantas, los procesos de división celular ocurren fundamentalmente en estructuras especializadas llamadas meristemos. Por el contrario, la diferenciación consiste en la especialización de una célula a un tipo celular concreto. Estos dos procesos completamente opuestos están altamente conectados durante el desarrollo y regulados por señales que determinan si la célula va a dividirse o diferenciarse en un tipo celular determinado.

Existen dos tipos de crecimiento: primario y secundario. El primero resulta de la actividad de los meristemos apicales, situados en los extremos de raíces (meristemo apical de la raíz) y tallos (meristemo apical del tallo). El crecimiento secundario es consecuencia de la actividad de los meristemos laterales (cámbium vascular) que se dividen periclinalmente dando lugar a las células que se diferenciarán dando lugar a los tejidos.

Tradicionalmente los tejidos de las plantas se agrupan en tres sistemas:

- **Sistema de protección:** protege la superficie de la planta (epidermis y peridermis)
- **Fundamental:** hace la fotosíntesis y almacena agua y nutrientes. Rellena el espacio entre el tejido dérmico y el vascular, formando el córtex (parénquima, colénquima y esclerénquima)
- **Vascular:** transporta agua y nutrientes por toda la planta (xilema y floema).

El tejido vascular tiene como función principal la de conformar una estructura física destinada al sostén de la planta, el transporte de sustancias (agua y nutrientes) y facilitar la defensa. Además, constituye principal red celular destinada a la interconexión de los principales órganos de la planta a través del **xilema** y el **floema**.

El xilema es el encargado del transporte del agua y los minerales desde las raíces hasta las

partes áreas de la planta. Por su parte, el floema es esencial para el transporte de productos (azúcares, ARN, proteínas y otros compuestos orgánicos), desde la fuente hasta los órganos sumidero.

1.1 Biogénesis del tejido vascular

El desarrollo del sistema vascular de las plantas se puede dividir en primario y secundario. El desarrollo primario tiene lugar en la etapa globular del cigoto, momento en el cual se forma el **procámbium** que se diferenciará dando lugar al xilema y floema primarios. En plantas con crecimiento secundario, como es el caso de *Arabidopsis*, aparece un nuevo tejido meristemático denominado **cámbium** (derivado del procámbium) el cual originará el xilema y el floema secundario durante el desarrollo secundario. Estos cuatro tejidos presentan los mismos tipos celulares. (Revisado en De Rybel y col. (2015); Jouannet y col. (2015); Ruonala y col. (2017)).

Durante la formación del xilema primario, el primer elemento formado es el **protoxilema** cuyas células presentan paredes celulares secundarias de patrón espiral. A continuación, éstas se sustituyen por el **metaxilema** que se caracteriza por células con paredes secundarias reticuladas o punteadas. Del mismo modo tiene lugar la formación del **protofloema** y el **metafloema** que dará lugar a la formación de elementos tubulares y células acompañantes (Schuetz y col., 2013). El proceso de diferenciación viene detallado en la figura 29.

Figura 29. Representación gráfica de la diferenciación de las células del xilema y del floema. Durante el crecimiento primario, las células del procámbium se diferencian en los elementos del xilema y del floema que darán lugar al protoxilema y protofloema, los cuales serán sustituidos por el metaxilema y el metafloema que darán lugar al xilema y floema primarios. Durante la transición del crecimiento primario al crecimiento secundario, las células del procámbium dan lugar a un nuevo tejido meristemático denominado cámbium, el cual sufrirá las mismas diferenciaciones que el procámbium para dar lugar al xilema y floema secundarios (Schuetz y col. (2013)).

1.2 Componentes del tejido vascular

El xilema está compuesto por tres tipos celulares: elementos de los vasos o tráqueas, fibras del xilema (fibras interfasciculares o xilares) y células del parénquima del xilema. Los elementos de los vasos o tráqueas se conocen bajo el nombre de elementos traqueales (ET). Son células con una pared celular secundaria gruesa, dura y lignificada, en las cuales el contenido citoplasmático se elimina tras su diferenciación, que incluye la muerte celular programada. Uno de los rasgos más llamativos de estas células es la modificación de la pared celular secundaria para la formación de perforaciones que permitirán el transporte de agua y solutos entre los diferentes órganos. Las fibras interfasciculares, al igual que los ETs, presentan una pared celular secundaria gruesa, dura y lignificada, en las cuales el contenido citoplasmático se elimina tras su diferenciación. Son células cortas y con pequeñas punteaduras en la pared celular; su principal función es la de servir de sostén a la planta y dotarla de cierta elasticidad. Las células del parénquima xilemático son células alargadas con pared primaria y protoplasto. Su principal función es la de reserva de almidón, lípidos y otras sustancias (Peña, 2011). Los diferentes tipos celulares presentes en una sección transversal de un tallo, raíz e hipocotilo de *Arabidopsis* vienen ilustrados en la figura 30.

Figura 30. Representación esquemática de diferentes tejidos presentes en *Arabidopsis thaliana*. (A) Sección transversal de un tallo joven, **(B)** sección transversal de un tallo adulto, **(C)** sección transversal de la raíz **(D)** sección transversal del hipocotilo. Adaptado de Matte Risopatron y col. (2010).

1.3 Pared celular

El protoplasto de las células vegetales se encuentra rodeado por una resistente, flexible y polimérica pared que le otorga características morfológicas singulares. La visión clásica de la pared celular como una simple barrera, ha evolucionado a un nuevo concepto en el que se considera la pared celular una estructura compleja, dinámica y metabólicamente activa que juega un papel esencial en procesos fisiológicos, procesos de señalización celular y de respuesta a factores bióticos y abióticos.

La pared celular comienza a sintetizarse durante la telofase de la división celular, cuando a nivel del fragmoplasto empiezan a fusionarse vesículas procedentes de Golgi cargadas con polisacáridos pécticos que darán lugar a la **lámina media** (LM). Inmediatamente, entre la membrana plasmática y la LM se deposita la **pared celular primaria** (PCP). La PCP y la LM están presentes en las células que conservan la capacidad de dividirse y/o elongarse, sin embargo, en muchos tipos celulares y sujeto a programas de desarrollo, las células pierden la capacidad de división/elongación y se especializan acumulando entre la membrana plasmática y la PCP una estructura multicapa constituida básicamente por celulosa y lignina denominada **pared celular secundaria** (PCS).

El estudio de la PCS ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a su esencial papel biológico además un marcado interés económico ya que se emplea como producto natural en industrias como la textil, la papelera, la maderera, la petrolera y la biotecnológica. En el presente capítulo se abordará el estudio de la pared celular haciendo uso de herramientas virales, lo cual permitirá un entendimiento holístico y dinámico de los procesos subyacentes de la dinámica de la pared celular, el cual dista del uso de sistemas estáticos, como es el uso de mutantes, de la genética clásica.

1.3.1 Composición y biosíntesis de la pared celular primaria

La PCP es una estructura compleja en arquitectura y composición. Está formada por celulosa cristalina (25-30% del peso seco) embebida en una matriz de polisacáridos complejos y glicoproteínas (70-75% peso seco), cuya composición varía dependiendo de la especie que consideremos, del tipo de tejido e incluso del grado de diferenciación del tipo celular (Knox, 2008). La formación de la pared celular implica la coordinada ejecución de diferentes programas de biosíntesis y transporte (Kumar y col., 2016).

1.3.1.1 Celulosa

La celulosa es un polisacárido formado por 12-36 cadenas de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4, que hace que cada residuo esté girado 180° con respecto al residuo adyacente, haciendo que el disacárido celobiosa sea realmente la unidad que se repite dentro de la molécula. La disposición de la celobiosa junto a la ausencia de ramificaciones laterales, hacen que las moléculas de β -1,4-glucano adquieran una estructura espacial plana, permitiendo la interacción estrecha de unas cadenas con otras mediante fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno intramoleculares (entre las distintas moléculas de glucosa de una misma cadena) e intermoleculares (entre moléculas de glucosa de distintas cadenas). El resultado es una estructura microfibrilar cristalina con algunas zonas amorfas.

1.3.1.2 Hemicelulosa

Las hemicelulosas son polisacáridos neutros con una estructura no cristalina, compuestos principalmente por cadenas lineales de pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa). Las hemicelulosas más características son:

- **Xiloglucanos:** presentan una estructura muy similar a la de la celulosa, ya que están constituidos por una cadena lineal de residuos de glucosa (unidos por enlaces tipo β -1,4; este esqueleto presenta residuos laterales de xilosa, fucosa o galactosa).

- **Mananos:** presentan un esqueleto principal constituido por residuos de manosa unidos con enlaces tipo β -1,4 que pueden estar ramificados con residuos de galactosa (galactomananos) o glucosa (glucomananos).

- **β -glucanos:** presentan una estructura química similar a la celulosa, pero los enlaces β -1,4 que unen las unidades de glucosa están intercalados al azar con enlaces tipo β -1,3.

- **Xilanos:** son las hemicelulosas más abundantes en la PCS de las plantas leñosas. Presentan una cadena lineal de residuos de xilosas unidas por enlaces β -1,4 decoradas con diferentes residuos laterales:

- o **Arabinoxilanos:** ramificados con arabinosa.

- o **Glucuronoxilanos:** ramificados con ácido glucurónico.

- o **Glucuronoarabinoxilanos:** ramificados con ácido glucurónico y arabinosa.

- o **4-O-metil-glucuronoxilanos:** ramificados con ácido 4-O metilglucurónico.

1.3.1.3 Pectinas

Las pectinas son un grupo complejo y heterogéneo de polisacáridos ramificados y muy hidratados, cuyo componente más relevante es el ácido galacturónico. Las pectinas se pueden clasificar en cuatro dominios diferentes en función de su composición:

- **Homogalacturonano:** están constituidas por una cadena lineal de residuos de ácido galacturónico, unidos por enlace de tipo α -1,4.
- **Ramnogalacturonano tipo I:** están constituidos por una cadena de residuos de ácido galacturónico intercalados con residuos de ramnosa a los que se unen cadenas laterales neutras de arabanos (unidades de arabinosa), galactanos (unidades de galactosa) y arabinogalactanos (unidades de arabinosa y galactosa).
- **Ramnogalacturonano tipo II:** presentan un esqueleto de homogalacturonos con cadenas laterales diversas que pueden dimerizar mediante enlaces diéster de borato.

1.3.1.4 Proteínas estructurales y solubles

Las proteínas son un componente minoritario pero esencial de la pared celular, ya que interaccionan con proteínas de la superficie de membrana plasmática, lo que incrementa la cohesión celular, y participan en la modificación de los diferentes componentes de la pared celular. Las proteínas se clasifican en dos grupos:

- **Proteínas estructurales:** suelen estar inmovilizadas en la pared celular y suelen tener secuencias altamente repetitivas de 1 ó 2 aminoácidos. Las proteínas estructurales se clasifican en: proteínas ricas en hidroxiprolina, extensinas, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina, arabinogalactanos y extensinas.
- **Proteínas solubles:** pueden estar ancladas o libres en el apoplasto, y la mayoría presentan actividades enzimáticas relacionadas con procesos de extensión de la pared celular, transporte de moléculas, reconocimiento celular y resistencia a patógenos. Dentro del grupo de las proteínas solubles se encuentran: hidroxilasas, transglucosilasas, quinasas y peroxidasas extracelulares.

1.4 Modificaciones de la pared celular

Durante el desarrollo de la PCS aparecen sustancias adicionales que modifican las propiedades físico-químicas de la pared celular. Entre las modificaciones más comunes de la PCS se encuentra: la suberificación, la **lignificación** y la deposición de **cutina** y **ceras**. En esta tesis se prestará especial atención al proceso de lignificación.

La síntesis de lignina se produce en la PCS de células del xilema, fibras del xilema y fibras del floema (Bonawitz y Chapple, 2010). La deposición de lignina en este tipo de células tiene como objetivos actuar como agente de cohesión entre los polisacáridos de la pared (impide que se produzca intercambio de agua y minerales con el exterior) y proporcionar soporte mecánico a la planta. Adicionalmente, la lignina se sintetiza como respuesta de defensa frente a infecciones de organismos patógenos o heridas; la síntesis de lignina en estas situaciones favorece la retención de agua de la planta ya que se trata de un compuesto hidrofóbico y ayuda a reforzar las paredes de los tejidos para evitar la entrada de nuevos patógenos (Miedes y col., 2014).

1.5 Biosíntesis de los componentes de la pared celular

La formación de la pared celular implica la coordinada ejecución de diferentes programas de biosíntesis y transporte hacia la membrana (Kumar y col., 2016). Los polisacáridos de la pared celular se sintetizan principalmente en Golgi y son liberados a la pared por vesículas secretoras siguiendo la ruta de secreción convencional o exocitosis (Véase apartado 2.5 de la introducción general). Por el contrario, la celulosa se sintetiza en el lado apoplástico de la membrana plasmática y se deposita directamente en la pared. Recientemente, se ha implicado la ruta de secreción no convencional en la secreción de proteínas ricas en arabinogalacturanos.

1.5.1 Celulosa

La biosíntesis de la celulosa tiene lugar en la superficie externa de la membrana plasmática, catalizada por el complejo celulosa sintasa (CSC, *Cellulose Synthase Complex*) formado por enzimas celulosa sintasa (CESA). Clásicamente, se creía que ≥ 36 CESA constituían un CSC completo, sin embargo, actualmente existe controversia sobre si los CSC están formados por 18 ó 24 CESA (Revisado en Nixon y col. (2016)). El modelo emergente propone que el CSC es un hexámero de trímeros o tetrámeros de CESA que producen de 18 a 24 cadenas de β -1,4-glucano que se ensambla formando las microfibrillas. En *Arabidopsis* se han descrito 10 genes CESA

que participan selectivamente en la formación de la pared primaria o secundaria. Durante la biosíntesis de la pared primaria se requieren los genes *CESA1*, *CESA3* y *CESA2/5/6/9*, mientras que para la biosíntesis de la PCS se requieren los genes *IRX1/CESA8*, *IRX3/CESA7* e *IRX5/CESA4*. Las proteínas Cesa se expresan y se ensamblan en Golgi, desde donde son transportadas hacia la membrana plasmática vía TGN (Véase apartado 5.1 de la introducción general) (Revisado en Kumar y col. (2016); Meents y col. (2018)).

1.5.2 Hemicelulosas

A diferencia de la celulosa, la síntesis del xilano tiene lugar en el lumen de Golgi gracias a las enzimas IRX9 e IRX14 pertenecientes a la familia glicosiltransferasa 43 (GT43) e IRX10 perteneciente a la familia GT47. El esqueleto de xilano generado en Golgi, es empaquetado en vesículas y secretado hacia la membrana plasmática. Las mutaciones en los genes IRX (*Irregular Xilem*) *IRX9*, *IRX10* o *IRX14* de *Arabidopsis* conllevan la reducción del xilano en la pared celular, sin embargo, este fenotipo puede ser rescatado con la sobreexpresión de sus parálogos *IRX9-Like* (*IRX9-L*), *IRX10-Like* (*IRX10-L*) y *IRX14-Like* (*IRX14-L*), respectivamente. El doble mutante correspondiente a cada uno de los pares redundantes (*irx9irx9-like*, *irx10irx10-like* e *irx14irx14-like*) se encuentra más afectado que sus respectivos mutantes simples. Este hecho muestra el papel esencial que juegan estos pares de proteínas en la elongación del esqueleto de xilano (Revisado en Kumar y col. (2016); Meents y col. (2018)).

1.5.3 Pectinas

Entre las enzimas que intervienen en el proceso de biosíntesis de las pectinas se encuentran galacturonosiltransferasas, metiltransferasas y acetiltransferasas, localizadas en Golgi. Sin embargo, su baja concentración e inestabilidad dificulta su estudio y por tanto no puede descartarse la presencia de otras enzimas biosintéticas en el RE o la membrana plasmática (Harholt y col., 2010).

El proceso de biosíntesis mejor caracterizado es el del homogalacturano; en la síntesis de este polisacárido participa el complejo enzimático formado por la galacturonosiltransferasa 1 (GAUT1) y galacturonosiltransferasa 7 (GAUT7) (Atmodjo y col., 2011). El anclaje de este dominio a la membrana de Golgi tiene lugar a través del dominio transmembrana de GAUT1 lo cual deja el dominio globular de la enzima hacia el lumen de Golgi (Harholt y col., 2010).

1.5.4 Proteínas estructurales: arabinogalactanos

Los arabinogalactanos (AGPs) están constituidas por un núcleo central de naturaleza proteica del que parten cadenas laterales de polisacáridos y oligosacáridos. En función del tipo de aminoácidos que formen la parte proteica, los AGPs se clasifican en (Rumyantseva, 2005):

- **Clásicos:** el dominio proteico contiene como aminoácidos mayoritarios hidroxiprolina/prolina, alanina, serina, treonina y glicina.
- **No clásicos:** la composición en aminoácidos varía considerablemente, habiendo sido descritas AGPs pobres en hidroxiprolina, pobres en alanina, ricos en histidina y ricos en aspartato.

Otra diferencia es la presencia en el dominio C-terminal de una señal para la unión de un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), que se encuentra en los AGPs clásicas y está ausente en los no clásicas. Desde el punto de vista estructural, la función del GPI es permitir la unión de los AGPs a la membrana plasmática. La biosíntesis de los AGPs es un proceso coordinado, donde una vez se sintetiza la parte proteica, los residuos de prolina se modifican a hidroxiprolina y se une el grupo GPI. Los AGPs unidos a GPI son transportadas por vesículas de tipo COPII hasta Golgi donde tiene lugar la glicosilación de los residuos de hidroxiprolina. Los AGPs sintetizados son liberados a la pared celular mediante vesículas de secreción convencional. Recientemente se ha descrito una nueva vía de glicosilación en la que los AGPs procedentes del RE serían glicosilados por una ruta de secreción EXPO desde donde serían liberados a la pared celular (vía de secreción no convencional) (Revisado en Kim y Brandizzi (2016); Van de Meene y col. (2017)).

1.5.5 Lignina

La lignina es un heteropolímero de naturaleza fenólica resultante de la polimerización oxidativa de tres alcoholes monolignoles: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. La polimerización de estos tres monolignoles da lugar a las unidades que componen la estructura de la lignina: p-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S), las cuales se diferencian exclusivamente en el grado de metoxilación que tiene cada unidad. Los monolignoles se polimerizan entre sí sin seguir un orden fijado lo cual da lugar a un polímero de alta variabilidad estructural. La lignina establece enlaces éster con la celulosa y hemicelulosa.

La síntesis de los monolignoles es llevada a término por complejos multienzimáticos localizados en el citosol (PAL, 4CL, CCoAOMT, CCR, CAD y COMT) y retículo endoplásmico (C4H, C3H y F5H)

(Revisado en Barros y col. (2015)). Se han propuesto tres mecanismos de transporte para la secreción extracelular de los monómeros de lignina: difusión pasiva, exocitosis mediada por vesículas de Golgi y transporte dependiente de ATP mediada por transportadores ABC acoplados a antiportadores de protones. Una vez depositados en la pared celular, los monolignoles son oxidados/deshidrogenados por peroxidasas de clase III (CIII-POX)/lacasas dando lugar a la formación de radicales 4-O-fenoxilo que polimerizan espontánea y aleatoriamente dando lugar a la lignina (Revisado en Barros y col. (2015); Meents y col. (2018)).

1.6 Ultraestructura de la pared celular

La biosíntesis de la pared celular comienza durante la telofase de la división celular momento en el que, a nivel del fragmoplasto, comienzan a acumularse y fusionarse vesículas procedentes de Golgi cargadas con polisacáridos pécticos dando lugar a la LM. Entre la LM y la membrana plasmática, tiene lugar el depósito de microfibrillas de celulosa, polisacáridos hemicelulósicos y las glicoproteínas que darán lugar a la PCP. La PCP y la LM están presentes en las células que conservan la capacidad de dividirse y/o elongarse. En muchos tipos celulares y sujetas a programas de desarrollo, las células pierden la capacidad de división/elongación y se especializan acumulando entre la membrana plasmática y la PCP una estructura multicapa constituida por lignina y microfibrillas que hacen que la PCS sea más gruesa y rígida (Revisado en Kumar y col. (2016)).

1.6.1 Lámina media

La LM es una capa muy fina ($< 0,5 \mu\text{m}$ de grosor) que se deposita en primer lugar y se sitúa entre las paredes primarias de dos células vecinas. Es la capa más externa de la pared y está formada principalmente por pectina e iones (Ca^{2+} y Mg^{2+}) y presenta un alto grado de hidratación. Esta capa es extensible, muy plástica y no es capaz de desviar la luz polarizada (isótropa) ya que no existe ordenación molecular en su estructura (García Irles y Segovia Huertas, 2013; Peña, 2011).

1.6.2 Pared celular primaria

La PCP está presente en la gran mayoría de las células vegetales, aunque con diferencias en su estructura, composición y espesor ($0,1\text{-}0,5 \mu\text{m}$). La PCP contiene celulosa (25-30%), hemicelulosa (30%), pectina (35%) y glicoproteína (1-5%) (Knox, 2008).

Los componentes de la PCP se depositan entre la membrana plasmática y la LM, por lo que ambas se van alejando entre sí. La PCP de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no commelinoides se caracteriza por presentar una red estructural de celulosa-hemicelulosa. Esta red se encuentra embebida en una trama de polisacáridos pécticos que forma una matriz que determina el tamaño del poro de la pared celular, o la dirección y extensión del crecimiento de la célula. La tercera red que compone la PCP es la de proteínas estructurales. Las uniones que se establecen entre las diferentes redes no se conocen con exactitud, pero sí se sabe que dichas uniones juegan un papel esencial en el reforzamiento y estabilización de la pared (Knox, 2008).

La distribución de los componentes de la PCP, hacen que esta sea ópticamente anisótropa debido a una orientación definida de sus componentes. Como resultado, las paredes primarias son birrefringentes (aparecen brillantes bajo la luz polarizada) (Revisado en Peña (2011)).

1.6.3 Pared celular secundaria

La PCS se deposita a continuación de la PCP, sin embargo, esta estructura no está presente en todas las células vegetales. Entre las funciones de la PCS se encuentra la de proporcionar sostén (resistencia a la compresión), rigidez (resistencia a la flexión) y fuerza (resistencia a la presión interna). La PCS forma parte esencial de los tallos (aguanta el peso de la parte aérea de la planta) y de todos los tejidos vasculares (sistemas de conducción de agua, sales minerales, sustancias nutritivas y hormonas). La composición de la PCS es variable entre especies vegetales y tipos celulares, sin embargo, sus componentes principales son la celulosa (40-50%), hemicelulosa (20-30%) y lignina (25-30%) junto a pequeñas cantidades de pectina y proteínas (Déjardin y col., 2010; Mellerowicz y Sundberg, 2008).

La PCS está formada principalmente por celulosa con pequeñas cantidades de lignina que se depositan formando tres subcapas S1 (capa externa), S2 (capa media o central) y S3 (capa interna). Las microfibrillas de celulosa se depositan de forma ordenada en varios planos, de modo que en cada subcapa todas las microfibrillas son paralelas, esto provoca que las subcapas sean birrefringentes. El espesor de las tres subcapas es variable, siendo las subcapas S1 (0,1 a 0,3 μm) y la S3 (0,1 μm) las más delgadas. Por el contrario, la subcapa S2 es la más gruesa, supone alrededor del 80% del espesor de la PCS y es la principal responsable de la rigidez de la célula (Revisado en Peña (2011)).

En la figura 31 se muestra un esquema de la estructura de la pared celular, así como la composición de la pared celular primaria y secundaria.

Figura 31. Esquema de la pared celular vegetal (A) Dibujo esquemático de la pared celular vegetal donde se muestran las distintas capas de la pared secundaria (S1 , S2 y S3), la pared primaria y la lámina media (Modificado de Kretschmann (2003)). **(B)** Modelo esquemático en el que se muestra la composición y estructura de la pared celular primaria y **(C)** la pared celular secundaria (Loqué y col., 2015).

1.7 Regulación genética de la biosíntesis de la pared celular secundaria

La formación de la PCS requiere de la coordinada regulación de las redes transcripcionales implicadas en la biosíntesis de sus principales componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina) (Revisado en Ko y col. (2014); Schuetz y col. (2013)). En la figura 32 se muestra un diagrama esquematizado de la regulación genética de la biosíntesis de la PCS.

Figura 32. Red transcripcional de la biosíntesis de la pared celular secundaria en *Arabidopsis thaliana*. Los factores de transcripción MYB46/MYB83 (recuadro verde) son los reguladores centrales de la diferenciación de fibras (SND1, NST1, NST2), metaxilema (VND6) y protoxilema (VND7) (recuadro azul), así como de la biosíntesis de lignina (recuadro morado), celulosa y hemicelulosa (recuadro naranja). Los factores de transcripción MYB4, MYB7 y MYB32 se han reportado como reguladores negativos de la biosíntesis de los componentes de la pared celular secundaria (recuadro rojo). *KNAT7 se ha postulado como un regulador positivo y negativo de diferentes genes implicados en la biosíntesis de la pared celular (Schuetz y col., 2013).

1.7.1 Reguladores aguas arriba de los FTs MYB46/MYB83

Los FTs VND6 (*Vascular-related NAC Domain 6*), VND7 (*Vascular-related NAC Domain 7*), NST1 (*NAC Secondary wall Thickening promoting factor 1*), NST2 (*NAC Secondary wall Thickening promoting factor 2*) y NST3/SND1 (*NAC Secondary wall Thickening promoting factor 3/Secondary wall-associated NAC Domain protein 1*) pertenecientes a la familia NAC, son reguladores directos de los FTs MYB46 y MYB83. Los FTs pertenecientes a la familia NAC son exclusivos de plantas, y se encuentran involucrados en procesos de crecimiento y desarrollo (Olsen y col., 2005).

La expresión de los genes VND está espacial y temporalmente correlacionada con la diferenciación de los elementos traqueales (vasos). Los FTs VND6 y VND7 se expresan en los vasos del xilema. Sin embargo, cuando se sobreexpresan inducen la formación ectópica de metaxilema y protoxilema respectivamente, en células especializadas como la epidermis, estomas, tricomas y pelos de las raíces de *Arabidopsis*. Por otra parte, la supresión de la expresión de los FTs VND6 y VND7 conduce a la formación defectuosa del metaxilema y protoxilema respectivamente, en raíces de *Arabidopsis* (Kubo y col., 2005). Las mutaciones simples de estos FTs no alteran la formación de los vasos del xilema, lo cual indica que actúan redundantemente junto a otros FTs de la familia VND (Kubo y col., 2005).

Los FTs NST1, NST2, NST3/SND1 han sido identificados como reguladores clave en la biosíntesis de la PCS en fibras (fibras xilares del xilema y fibras interfasciculares) (Mitsuda y col., 2007; Mitsuda y col., 2005; Zhong y col., 2006). La sobreexpresión de estos genes conduce a la deposición ectópica de PCS en células no vasculares, mientras que su supresión reduce el grosor de la pared secundaria en fibras. Cabe destacar que únicamente el FT SND1 es el responsable de controlar la correcta formación de las fibras xilares (Zhong y col., 2006), mientras que la correcta diferenciación de las fibras interfasciculares recae sobre el gen *IFL1/REV* (*Interfascicular fibreless/Revoluta*) (Zhong y col., 1997; Zhong y Ye, 1999).

El doble mutante *nst1snd1* presenta una completa pérdida de engrosamiento de PCS en fibras (Mitsuda y col., 2007; Zhong y col., 2007b) (figura 33 B-C). La pérdida de la PCS en fibras interfasciculares y xilares genera un fenotipo de tallos frágiles con tendencia rastrera (figura 33 A) (Zhong y Ye, 2015). Las plantas mutantes *ifl1* presentan un fenotipo similar al del mutante doble *nst1snd1*, es decir, presentan tallos frágiles y tendencia rastrera (figura 33 D). En secciones transversales de tallos de *Arabidopsis* procedentes del mutante *ifl1*, se observa la ausencia de fibras interfasciculares (figura 33 E-F) (Zhong y Ye, 1999).

1.7.2 Dianas aguas abajo de MYB46 y MYB83

La red transcripcional activada por los FTs NAC es dependiente de los FTs MYB46 y MYB83 (figura 32). Ambos FTs son claves en la regulación de la biosíntesis de los componentes de la PCS, puesto que las plántulas del doble mutante *myb46myb83* son defectivas en la formación de la PCS y detienen su crecimiento/desarrollo poco tiempo después de su germinación (Wang y Dixon, 2012). Por otra parte, la supresión de la expresión de MYB46 reduce significativamente el engrosamiento de la PCS en fibras y ETs provocando que las plantas mutantes presenten un porte rastrero debido a la caída de sus tallos (Ko y col., 2009; Zhong y col., 2007a) (Véase figura 33 paneles G-I). Un rasgo importante del FT MYB46, es que es el único FT capaz de regular directamente la expresión de genes implicados en la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina (Revisado en Ko y col. (2014)).

El FT SND1 es un regulador maestro para la activación de MYB46 y MYB83. Numerosos FTs incluyendo SND2, SND3, MYB103, MYB85 y MYB52 operan aguas abajo de MYB46 y MYB83 (Ko y col., 2009; McCarthy y col., 2009; Zhong y col., 2007a). La represión dominante negativa de cada uno de estos genes se ve reflejada en la reducción del grosor de la PCS en fibras xilares y fibras interfasciculares, pero no en ETs (Zhong y col., 2008).

MYB46 regula genes y FTs implicados en la biosíntesis de los componentes de la PCS gracias a la presencia del motivo M46RE en sus promotores (Kim y col., 2012). La lista de genes y FTs capaces de interactuar con MYB46 incluyen genes que codifican para la biosíntesis de celulosa, hemicelulosa y lignina.

MYB46 es capaz de interactuar directamente con las subunidades de la celulosa sintasa (IRX5/CESA4, IRX3/CESA7, IRX1/CESA8) gracias a la presencia del motivo M46RE en sus promotores (Kim y col., 2012). Por otra parte, MYB46 también regula los genes implicados en la biosíntesis de hemicelulosa (IRX7/FRA, IRX8, IRX9, IRX14). La elongación de las cadenas de hemicelulosa es dependiente de la actividad coordinada de las transferasas que catalizan la adición de xilas y cadenas laterales de ácido glucurónico. La pérdida de función del gen IRX9 provoca la síntesis de cadenas cortas de xilano y por tanto una reducción en la deposición de lignina en la PCS de fibras xilares e interfasciculares (Peña y col., 2007; Petersen y col., 2012) (figura 33. K-L).

Al igual que los genes implicados en la biosíntesis de xilano, los genes implicados en la biosíntesis de ligninas, también presentan más de un motivo M46RE en su región promotora (Kim y col., 2012). MYB46 regula directamente los FTs maestros de la síntesis de ligninas (MYB58

y MY63) (Ko y col., 2009; Zhou y col., 2009) así como siete de los nueve genes implicados en la síntesis de monolignoles (Revisado en. Ko y col. (2014); Schuetz y col. (2013)).

1.7.3 Reguladores negativos de la biosíntesis de la pared celular secundaria

La expresión de los cuatro FT (KNAT7, MYB4, MYB7, and MYB32), que actúan como represores transcripcionales de la red transcripcional de biosíntesis de la PCS, se encuentran regulados por MYB46 y/o MYB83 (Ko y col., 2009; McCarthy y col., 2009). Sin embargo, KNAT7 es activado directamente por SND1 y MYB83 (Ko y col., 2009; Zhong y col., 2008). La expresión de KNAT7 se ha localizado en el sistema vascular de todos los órganos, así como en las fibras interfasciculares y región del córtex de tallos e hipocotilos (Li y col., 2012; Zhong y col., 2008). Se ha propuesto que KNAT7 actúa como un represor transcripcional de dos genes *CESA* (PCS), de diversos genes implicados en la biosíntesis de hemicelulosa y de la mayoría de genes implicados en la biosíntesis de lignina (Li y col., 2012).

MYB4, MYB7 y MYB32 actúan como represores de la biosíntesis de lignina; no se puede considerar que su función sea redundante, puesto que cada uno de ellos se encuentra involucrado en la regulación fina de otros FTs que están encargados de la activación de numerosas enzimas involucradas en la biosíntesis de la PCS (Revisado en Ko y col. (2014); Schuetz y col. (2013)).

La presencia de un nodo de regulación negativa de la red transcripcional provee de un mecanismo de retroalimentación negativa que permite un importante control homeostático de toda la red transcripcional implicada en la biosíntesis de la PCS.

En el presente capítulo se realizará una caracterización histológica de la PCS de tallos de *Arabidopsis* infectados por los aislados UK 1 y JPN 1. Además, se realizará un análisis de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de la PCS, lo cual ofrecerá una visión global de los procesos genéticos subyacentes.

Figura 33. Fenotipo de mutantes de diversos genes implicados en la red transcripcional de biosíntesis de la pared celular secundaria. (A-C) Mutante doble *sdn1nst1*. Secciones transversales de tallos de *A.thaliana* teñidos con floroglucinol. (Escala 115 μ m) (Adaptado de Zhong y Ye (2015)). (D-F) Mutante simple *ifl1*. Secciones transversales de tallos de *A. thaliana* teñidos con Azul de Toluidina. (Escala 5 μ m) (Adaptado de (Zhong y Ye, 1999)). (G-I) Mutante *myb46*. Secciones transversales de tallos de *A. thaliana* teñidos con Azul de Toluidina. Escala (40 μ m) (Adaptado de Zhong y col. (2007a)). (J-L) Mutante simple *irx9*. Inmunolocalización de xilano (Anticuerpo LM10) en secciones transversales de tallos de *A. thaliana*. (Escala (154 μ m) Adaptado de (Peña y col., 2007; Petersen y col., 2012).

2. RESULTADOS

2.1 La infección por TuMV afecta el crecimiento secundario de plantas de *Arabidopsis thaliana*

La infección por TuMV afecta a diferentes caracteres del desarrollo de *Arabidopsis*, siendo la alteración del desarrollo del tallo floral el más significativo (Sánchez y col., 2015). Sin embargo, la reducción del grosor y la elevada fragilidad son rasgos que han recibido menos atención, aunque son de gran interés desde el punto de vista del desarrollo (Sánchez y col., 2015). Con el fin de determinar si la infección por TuMV afecta el crecimiento secundario, se cuantificó el área de secciones transversales ($100\ \mu\text{m}^2$) procedentes de la región basal del tallo floral de *Arabidopsis* (primeros 5 cm por encima de la roseta; 20 días post inoculación). El análisis se realizó sobre un total de 30 secciones procedentes de 10 plantas control, 10 plantas infectadas por UK 1 y 10 plantas infectadas por JPN 1. El análisis estadístico ($P < 0,05$) mostró que existía diferencia significativa entre el área de los tallos control ($2587 \pm 41\ \mu\text{m}^2$) y los tallos procedentes de plantas infectadas por UK 1 ($606 \pm 59\ \mu\text{m}^2$) y JPN 1 ($1540 \pm 11\ \mu\text{m}^2$).

2.2 La reducción en grosor de los tallos infectados por TuMV viene acompañado de una reducción en el contenido de hemicelulosa y lignina de la pared celular secundaria

Los efectos de la infección de TuMV sobre el desarrollo del tallo floral se analizaron más detalladamente mediante técnicas histoquímicas, con el fin de evaluar el efecto de la infección sobre la arquitectura y composición de la PCS. Al igual que en el apartado anterior, se emplearon secciones transversales ($100\ \mu\text{m}^2$) procedentes de tallos basales de *Arabidopsis* (20 dpi).

El azul de toluidina O (TOB) es un colorante policromático que reacciona con diferentes componentes químicos de la pared celular, entre ellos la lignina, dando lugar a una coloración variada (Pradhan Mitra y Loqué, 2014). El patrón de deposición de la lignina (azul) está altamente afectado en las fibras interfasciculares de plantas infectadas por JPN 1 (figura 34 B). Este hecho podría explicar la falta de rigidez y alta fragilidad de los tallos de plantas infectadas por el aislado JPN 1. Por otra parte, la visión global de estas secciones revela la presencia de lignina en los vasos del xilema y en ciertas fibras interfasciculares acotadas a un único haz vascular. Los tallos de plantas infectadas por UK 1, parecen tener una distribución de la lignina (en fibras interfasciculares y xilema) (figura 34 C) similar a la de los tallos control (figura 34 A). El reducido tamaño de las células de los tallos infectados por UK 1 parece ser la causa del deficiente crecimiento secundario. La

tinción con floroglucinol/HCl reacciona con los grupos cinamaldehído terminales lo cual permite visualizar la lignina en color rojo cereza o fucsia en el xilema y fibras interfasciculares (Pradhan Mitra y Loqué, 2014). Esta tinción confirmó las observaciones realizadas con la tinción de TOB, es decir, la ausencia de lignina en fibras interfasciculares del tallo de JPN 1 (figura 34 E) y su correcta deposición en los tallos de UK 1 (figura 34 F) en comparación con las plantas control (figura 34 D). Por último, la ausencia de lignina en fibras interfasciculares de tallos de JPN 1 fue confirmada bajo luz UV (figura 34 H).

El xilano es la hemicelulosa más abundante de la PCS, es por esta razón que se decidió estudiar su distribución mediante inmunolocalización. Para ello se empleó el anticuerpo LM10, el cual es un anticuerpo monoclonal específico para el xilano (McCartney y col., 2005) que permitió la visualización de este glucano en el xilema y fibras interfasciculares en tallos de plantas control (figura 34 J). La infección por UK 1 provoca una situación similar al control, puesto que el xilano se encuentra depositado en fibras interfasciculares y xilema (figura 34 L). En el caso de JPN 1, se observa una situación muy similar a la de la lignina, puesto que el xilano únicamente se encuentra en el xilema (figura 34 K).

Por último, el blanco de calcoflúor es un fluorocromo que tiñe celulosa, calosa y otros β -glucanos no sustituidos o débilmente sustituidos bajo luz UV. Este fluorocromo resulta muy útil para la visualización de la morfología celular ya que permite la visualización de las células de la epidermis, el córtex y la médula, ya que tienen un alto contenido en celulosa (Pradhan Mitra y Loqué, 2014). En la figura 34 M y O se observa como no existen alteraciones morfológicas en ninguno de los tallos; además, se aprecia una región débilmente teñida debido a la dificultad del calcoflúor blanco de penetrar en tejidos lignificados como el xilema y las fibras interfasciculares (Pradhan Mitra y Loqué, 2014). En el caso de las plantas infectadas por JPN 1 se puede observar como esta región presenta una mayor fluorescencia debido a que el contenido en lignina es menor en estos tejidos (figura 34 N)

Figura 34. Análisis histoquímico de la pared celular secundaria. Secciones transversales de 100 μm^2 procedentes de la región basal del tallo de *Arabidopsis* (1-5cm) (20 días post inoculación). (A-C) Tinción con azul de toluidina. (D-F) Tinción con fluoroglucinol-HCl. (G-I) Luz UV. (J-L) Inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal LM10. (M-O) Tinción con blanco de calcoflúor. Escala: 100 μm .

2.3 La expresión de los genes implicados en la formación de la pared celular secundaria se encuentra alterada por la infección de TuMV

Durante la infección por TuMV se produce la alteración del perfil transcriptómico de los genes implicados en la biosíntesis de la PCS. Dada la gran cantidad de genes implicados en la red transcripcional de la biosíntesis de la PCS, se decidió únicamente estudiar aquellos genes que ocupan posiciones centrales en la regulación. Es por esta razón que se estudió la expresión de los siguientes genes: *SND1*, *NST1*, *VND*, *VND7*, *MYB46* y *MYB83*. Adicionalmente, y dado el fenotipo observado en JPN 1, se decidió verificar la expresión de los genes codificantes de las glicosiltransferasas, *IRX9* e *IRX10*, proteínas implicadas en la biosíntesis del esqueleto de xilano mediante RT-qPCR. Por otra parte, se analizó la expresión del gen *IFL1* dada la similitud del fenotipo del mutante simple *ifl1* (Zhong y Ye, 1999) con el de la infección de JPN 1. Los perfiles transcripcionales obtenidos son muy distintos entre ambos aislados de TuMV. La infección por UK 1 induce la represión de los genes *MYB83*, *SND1* y la sobreexpresión de *NST1* (figura 35 A). Por otra parte, la infección por JPN 1 induce la represión de los genes *MYB46*, *IRX9*, *IRX10*, *SND1* y *NST1* (figura 35 B)

Figura 35. Expresión relativa de los genes implicados en la biosíntesis de la pared celular durante la infección por UK 1 (A) y JPN 1 (B). Se analizaron 3 réplicas biológicas (4 tallos por réplica) de cada una de las muestras (Control, UK 1 y JPN 1), además cada réplica se analizó por triplicado. Las réplicas biológicas se recogieron en diferentes experimentos (todos a 20 dpi) y los resultados fueron analizados conjuntamente para minimizar las posibles variaciones debidas a las condiciones ambientales. La media de la expresión de cada gen viene acompañada por su error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre la infección por los aislados UK 1 o JPN 1 con respecto al control. El test utilizado fue un test *t-student* con un $p < 0,05$.

2.4 El determinante viral para la elongación del tallo floral, no es el determinante del porte rastrero de las plantas infectadas por JPN 1

Estudios previos realizados con quimeras P3 (Sánchez y col., 2015) y los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, han permitido establecer que el determinante viral responsable de la elongación del tallo floral se encuentra en la región carboxi de la proteína P3. En la figura 36 A puede observarse como la quimera Ch.U(2511-3767)J permite la elongación del tallo floral, mientras que la quimera Ch.J(2511-3767)U detiene completamente el crecimiento de éste (figura 36). Sin embargo, en ninguna de las infecciones se observa porte rastrero del tallo floral. A pesar de estas observaciones, se realizó un análisis histoquímico con TOB y el anticuerpo monoclonal LM10.

Figura 36. Fenotipo asociado a la infección por las quimeras P3 de TuMV. (A) Fenotipo asociado a la quimera Ch.U(2511-3767)J **(B)** Fenotipo asociado a la infección por la quimera Ch.J(2511-3767)U.

La visualización de los cortes bajo luz UV permitió comprobar que la lignificación en fibras interfasciculares no se encontraba alterada (figura 37 A-C). Por otra parte, la detección inmunohistoquímica del xilano con el anticuerpo monoclonal LM10 reveló que tampoco existía

alteración en la deposición de este compuesto en las fibras interfasciculares, sin embargo, parece que existe una reducción en la deposición de xilano en el xilema (figura 37 D-F).

Figura 37. Análisis histoquímico de la pared celular secundaria. Secciones transversales de 100 μm^2 procedentes de la región basal del tallo de *Arabidopsis* (1-5cm) (20 días post inoculación). (A-C) Luz UV. (D-F) Inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal LM10. Escala: 100 μm .

3. Discusión

La infección por TuMV altera significativamente el perfil de expresión génica de *A.thaliana*. Por ejemplo, la infección por el aislado UK 1 altera significativamente la expresión de aproximadamente 1000 genes, de los cuales 970 inducen su sobreexpresión y unos 30 la reprimen. Los números son muy distintos para la infección por el aislado JPN 1, ya que únicamente induce la sobreexpresión de 40 genes y reprime la expresión de 20 (Sánchez y col., 2015). Las subredes de interacción proteína-proteína deducidas a partir de los resultados de la comparación de las micromatrices generadas durante la infección por UK 1 y JPN 1 muestran los cinco genes con mayor número de conexiones (con otros genes). Por tanto, el interactoma presenta 5 nodos altamente conectados, entre los cuales se encuentran genes de defensa (AT3G45640, AT5G60120, AT2G2500) y genes de señalización (AT2G41100 y AT2G41090). El análisis comparativo entre los genes involucrados en la transición entre el crecimiento primario y el secundario (Ko y col., 2004) y los genes alterados durante la infección por TuMV, muestran nueve genes en común, entre los que se encuentran proteínas de regulación transcripcional, transducción de señal y proteínas de unión a calcio. Entre las proteínas de unión a calcio se encuentra la proteína tipo calmodulina 4 (CML-4, *Calmodulin-like 4*) (AT2G41100) la cual es un nodo del interactoma proteína-proteína. Tomando en conjunto los datos obtenidos en la presente tesis, junto a los obtenidos en el análisis de las micromatrices (Ko y col., 2004; Sánchez y col., 2015) puede considerarse que la reducción del diámetro de tallos de *A. thaliana* durante la infección por TuMV se debe a una alteración en el crecimiento secundario.

El análisis histológico de tallos de plantas infectados por TuMV no reveló ninguna alteración morfológica, sin embargo se requieren secciones más finas para poder realizar este análisis en profundidad. Por otra parte, el análisis histoquímico de los tallos puso de manifiesto la baja concentración de lignina en las fibras interfasciculares en tallos infectados por JPN 1. El porte rastrero y la fragilidad de los tallos de plantas infectadas por el aislado JPN 1 recuerdan en gran medida al fenotipo desarrollado por el mutante doble *snd1nst1* (Zhong y Ye, 2015), el mutante *jfl1* (Zhong y Ye, 1999) y el mutante *myb46* (Zhong y col., 2007a). A pesar de estas similitudes fenotípicas, únicamente los mutantes *snd1nst1* y *myb46* carecen de lignina en las fibras interfasciculares. La infección por JPN 1 reprime la expresión de los FTs implicados en la correcta lignificación de las fibras xilares e interfasciculares (SND1 y NST1) lo cual ofrecería una posible explicación de los resultados obtenidos en los análisis histoquímicos. Muy probablemente, esta misma situación esté ocurriendo en las fibras xilares, no obstante, se requieren de secciones con mayor resolución que permitan analizar en detalle dichas células.

Durante la infección por JPN 1 se observa una reducción significativa del contenido de xilano en fibras interfasciculares y xilares. Con el objetivo de poder determinar a qué nivel transcripcional se encuentra alterada la biosíntesis de xilanos, se decidió comprobar la expresión de los genes *MYB83*, *MYB46*, *IRX9* e *IRX10*. Los resultados del análisis transcripcional muestran cómo los genes *MYB46*, *IRX9* e *IRX10* se encuentran reprimidos durante la infección por JPN 1. La represión de estos genes debe tener una estrecha relación con la reducción de la deposición de xilano en la pared celular.

Con el objetivo de poder determinar a qué nivel transcripcional se encuentra alterada la biosíntesis de xilanos, se decidió comprobar la expresión de los genes *MYB83*, *MYB46*, *IRX9* e *IRX10*. Los resultados transcripcionales muestran como los genes *MYB46*, *IRX9* e *IRX10* se encuentran reprimidos durante la infección por JPN 1. La represión de estos genes debe tener una estrecha relación con la reducción de la deposición de xilano en la pared celular.

La infección por UK 1 muestra un panorama totalmente distinto del de la infección por JPN 1. Los FTs NST1 y SND1 juegan un papel muy importante en la diferenciación y lignificación de fibras xilares e interfasciculares. Los trabajos de Zhong y col. (2007b) demuestran que la actividad de NST1 y SND1 es redundante, es decir, se requiere de la represión de ambos FTs para que se altere la diferenciación de las fibras y su lignificación. Durante la infección por UK 1 la expresión de estos FTs es antagónica, es decir, el FT NST1 se encuentra fuertemente sobre expresado, mientras que el FT SND1 se encuentra fuertemente reprimido. Los tallos infectados por UK 1 no muestran alteraciones detectables en la lignificación y diferenciación de las células interfasciculares, por lo que es probable que la represión de la actividad de SND1 está siendo compensada por la sobreexpresión de NST1. Por otra parte, el FT SND1 regula directamente la expresión del FT MYB83 (McCarthy y col., 2009). Durante la infección por UK 1 la reducción de la expresión del FT SND1 conlleva la reducción de la expresión del FT MYB83. A pesar de la represión de la expresión del FT MYB83, los tallos infectados por UK 1 no presentan alteraciones en el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa. Esta situación podría deberse a que el FT MYB46 es homólogo al FT MYB83 (McCarthy y col., 2009; Zhong y Ye, 2012), por lo que la supresión de la expresión de MYB83 sería compensada por la actividad de MYB46. Dado el elevado número de genes afectados durante la infección por UK 1, junto a la alteración de genes implicados en el crecimiento secundario o crecimiento en grosor, no es descartable la posibilidad de que esta alteración se la responsable de la falta de elongación del tallo floral.

La biosíntesis de los componentes de la pared celular tiene lugar en el RE desde donde son transportados a Golgi para su posterior secreción a la pared celular. Como se ha descrito

anteriormente, la proteína P3 es la responsable de la elongación o inhibición del tallo floral (Sánchez y col., 2015) y desempeña su función asociada al RE (Véase capítulo 2). Dada la implicación del RE en la biosíntesis y el transporte de muchos componentes de la pared, no puede descartarse la posibilidad que la acumulación de la proteína P3 en el RE esté alterando de alguna forma la biosíntesis y la ruta de secreción convencional. Por otra parte, las diferencias en la velocidad de acumulación de la proteína P3 podrían explicar, al menos en parte, el impacto diferencial del virus sobre la composición de la pared celular. Como se ha descrito para otros potyvirus (revisado en Pitzalis y Heinlein (2017)), y se ha presentado en el capítulo 2, la proteína P3 del aislado UK 1 podría estar moviéndose por una ruta no convencional de secreción que implica el movimiento de la proteína P3 a través del sistema de actina-miosina asociado al RE. El destino final de la proteína serían los puntos de contacto entre el RE y la membrana plasmática donde asistiría el paso del complejo de replicación a la célula vecina. La rápida velocidad de acumulación de esta proteína vendría unida a la rápida dispersión del virus, activando la respuesta de defensa y desviando y congelando diferentes programas celulares, como podría ser el crecimiento secundario. Por otra parte, la rápida acumulación de la proteína P3 en la periferia celular, permitiría el desbloqueo del RE y por tanto de las vías de secreción, convencionales y no convenciones, responsables del transporte de los componentes de la pared celular. Por su parte, el mecanismo de acción de la proteína P3 de JPN 1 sería más sutil ya que permitiría el crecimiento del tallo floral, probablemente al no desencadenar una respuesta de defensa tan fuerte. Además, el posible bloqueo de los componentes hacia la pared celular, podría explicarse por el mayor tiempo de residencia de la proteína P3 en el RE, lo cual involucraría una mayor distorsión en la biosíntesis y transporte de los componentes de la pared, que se vería reflejado en una alteración de la composición de la pared celular. Debido a la complejidad de los sistemas de transporte intracelulares y el descubrimiento de nuevas rutas de secreción (revisado en Goring y Di Sansebastiano (2017)) conviene considerar la posibilidad de que la proteína P3 esté interrumpiendo alguna ruta no descrita de transporte de los componentes o las enzimas encargadas de catalizar la síntesis de los componentes de la pared celular. Los posibles efectos de las infecciones de TuMV en el transporte intracelular de componentes de la pared, constituirían un componente adicional al de la alteración de la expresión génica de genes reguladores de la síntesis de la pared, lo que contribuiría al efecto final global de las alteraciones encontradas.

La caracterización en profundidad de la ruta seguida por la proteína P3 durante la infección viral permitirá establecer el mecanismo por el cual la proteína es capaz de bloquear el crecimiento del tallo y, probablemente, contribuir a alterar la composición de la pared celular.

Discusión general

Los virus de plantas han sido utilizados como modelos para el estudio de diferentes aspectos de la biología básica, los mecanismos moleculares de la interacción entre planta y virus y la regulación genética que acontece durante las infecciones virales. El conocimiento generado desde estas áreas, han permitido el desarrollo de diferentes herramientas moleculares, como la construcción de vectores para estudio de VIGS (*Virus-induced gene silencing*) (Lange y col., 2013), expresión heteróloga en plantas (Gleba y col., 2007; Hadrien y P., 2015; Porta y Lomonossoff, 2002) y uso de nanopartículas virales en biomedicina (Duval y col., 2016; Gonzalez-Gamboa y col., 2017). La naturaleza parasítica de los virus, imposibilita su cultivo mediante técnicas clásicas de microbiología; es por esta razón que el desarrollo de elementos para su estudio es de vital importancia. La mayoría de virus vegetales presentan genomas de ARN, por lo que el desarrollo de técnicas de síntesis de ADN complementario y su clonaje en plásmidos bacterianos (Dawson y col., 1986) fue determinante para el desarrollo de clones infectivos de cADN. Los clones infectivos permiten la infección, relativamente fácil, de plantas y la modificación genética de su genoma.

El virus del mosaico del nabo es uno de los patógenos más importantes que afecta a cultivos vegetales e industriales, es por esta razón que la disponibilidad de diferentes clones infectivos de TuMV (Chen y col., 2007; Jenner y col., 2003; Sánchez y col., 1998; Suehiro y col., 2004) ha sido clave para su manejo y caracterización. Los clones infectivos desarrollados, hasta la fecha, pertenecen a la cepa genética MB (Sánchez y col., 2003) o cepa World-B (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003). Sin embargo, la cepa MR (Sánchez y col., 2003) o cepa Asian BR (Ohshima y col., 2002; Tomimura y col., 2003) ha sido resistente a ser copiada en clones infectivos (Sánchez y col., 2015). En la presente tesis doctoral se ha desarrollado un clon infectivo del aislado JPN 1 de TuMV perteneciente a la cepa MR.

Las estrategias para mejorar la estabilidad de los clones virales se basan en la modificación de la propia secuencia viral. Por ejemplo, la introducción de intrones para la interrupción de genes potencialmente tóxicos (Johansen, 1996; López-Moya y García, 2000) o la generación de 2 subclones solapantes (Jakab y col., 1997). Para la generación del clon infectivo del aislado JPN 1, se sustituyó cADN de TEV por el cADN de JPN 1 en el clon infectivo pGTEV (Bedoya y Daròs, 2010). Para la generación del clon infectivo pGTEV se manipuló el vector plasmídico, en vez del genoma viral, intentando conservar únicamente el origen de replicación y los genes de resistencia a antibióticos. Los resultados obtenidos en el trabajo de Bedoya y Daròs (2010) pusieron de manifiesto que la inestabilidad de los clones infectivos no siempre se encuentra asociada a la expresión de los genes virales, sino que los componentes vectoriales pueden tener

un papel relevante. Para la generación del clon infectivo pGTEV se eliminaron las secuencias innecesarias del vector y se insertó la secuencia de TEV en dirección contraria al marcador de selección y el origen de replicación. Por lo que el clon infectivo generado está clonado en un vector mínimo, compuesto por el promotor, el terminador el origen de replicación y el marcador de selección (Bedoya y Daròs, 2010). Tanto el clon infectivo pGTEV como pGTuMV-JPN1 están contruidos sobre un vector binario que permite su agroinoculación en *Nicotiana benthamiana*. La capacidad de reproducir fielmente las características biológicas asociadas al aislado original, convierten al clon infectivo de JPN 1 en una herramienta de incalculable valor.

El patosistema formado por TuMV y *Arabidopsis thaliana* ha permitido estudiar la alteración diferencial inducida por los aislados UK 1 y JPN 1 sobre el plan de desarrollo de *Arabidopsis*. Los síntomas inducidos por los aislados UK 1 y JPN 1 son muy distintos y en cierta medida antagónicos. La infección por JPN 1 permite el crecimiento del tallo, mientras que la infección por UK 1 frena completamente el crecimiento, o incluso, inhibe su aparición (Sánchez y col., 2015). Los diferentes estudios realizados durante la presente tesis doctoral han permitido establecer que el determinante de síntomas diferenciales se encuentra en la posición 279 de la proteína, correspondiente a su región C-terminal. Además, el comportamiento subcelular de la proteína viene determinado por el aminoácido presente en la posición 279 de la proteína. La presencia de lisina en el aislado UK 1 induce la acumulación de la proteína en puntos cercanos a la membrana (¿c-MERs?) mediante su movimiento a través del retículo endoplasmático. En el caso de que la posición 279 esté ocupada por una treonina, como en el caso del aislado JPN 1, la proteína P3 se distribuye por el retículo endoplasmático por donde se desplaza. El apagado de la fluorescencia en la expresión transitoria, limita en gran medida el estudio de la proteína P3 de JPN 1 puesto que no permite determinar cuál es su destino final. Muy probablemente el destino final de la proteína P3 sea la de acumularse en los c-MERs desde donde asista el movimiento célula a célula del complejo de replicación.

La intervención de la proteína P3 en la formación del complejo de replicación, en colaboración con la proteína 6K2, se ha propuesto para TuMV. Los resultados obtenidos en la presente tesis apuntan a que el comportamiento de la proteína P3 no es universal puesto que la proteína P3 de JPN 1 no parece estar implicada en la formación del complejo de replicación. La expresión transitoria de proteínas está ampliamente extendida para el estudio de éstas, no obstante, se trata de un escenario *artificial* puesto que la proteína se encuentra fuera de una infección viral. El estudio de la proteína P3 de JPN 1 durante la infección viral permitirá establecer si realmente

esta proteína juega, o no, un papel en la formación del complejo de replicación.

En la presente tesis doctoral se ha descrito por primera vez el carácter periférico de la proteína P3. Además las predicciones tridimensionales de la proteína P3 apuntan a la posible interacción de ésta con otras proteínas de membrana como se ha descrito para la proteína P3 del Virus del mosaico de la soja. Estas observaciones abren una nueva vía de trabajo en la cual se aborde la posible interacción o interacciones de la proteína P3 con otras proteínas y si éstas pudieran ser diferentes entre aislados.

Los síntomas asociados a la infección por el aislado JPN 1, caída y fragilidad del tallo floral, recuerdan en gran medida al fenotipo de los mutantes de *Arabidopsis* con defectos en la pared celular. El análisis histológico de los componentes de la pared celular y los genes implicados en la biosíntesis de éstos revelaron la posible correlación entre la caída del tallo floral y la deficiencia de xilano y lignina en la PCS. Por otra parte, la localización de la proteína P3 en el RE podría estar bloqueando de alguna manera el transporte, convencional o no convencional, de componentes del xilano y lignina a la pared celular. En el caso del aislado UK 1, los análisis histológicos y transcriptómicos no pusieron de manifiesto ninguna alteración que pudiera explicar la detención del crecimiento del tallo. Sin embargo, la rápida acumulación de la proteína P3 en la periferia celular junto al perfil transcriptómico obtenido durante la infección por UK 1 permiten especular cómo la rápida acumulación de P3 pudiera estar alterando diferentes rutas y procesos de regulación implicados en el crecimiento secundario.

Los resultados obtenidos en esta tesis incrementan el conocimiento sobre la proteína P3, una de las proteínas virales menos caracterizada. Además se liga por primera vez el fenotipo de una infección viral con el comportamiento subcelular y molecular de su determinante de síntomas. Los avances realizados en el patosistema TuMV/*Arabidopsis thaliana* lo convierten en la herramienta perfecta para la caracterización de nuevas rutas intracelulares implicadas en el transporte hacia la pared, u otros destinos celulares, de una forma dinámica.

Conclusiones

Los resultados obtenidos durante la presente tesis han permitido concluir:

1. El clon de cADN del aislado JPN 1 del Virus del mosaico del nabo reproduce fielmente los síntomas asociados a la infección por el aislado original de JPN 1.
2. El determinante viral responsable de la elongación diferencial del tallo de plantas infectadas de *Arabidopsis thaliana* se encuentra en la posición 279 de la proteína P3.
3. La proteína P3 es una proteína periférica de membrana.
4. La proteína P3 del Virus del mosaico del nabo se localiza en el retículo endoplasmático por donde se desplaza haciendo uso del sistema actina-miosina asociado a éste.
5. La proteína P3 de UK 1 se agrega en puntos, no caracterizados, de la periferia celular donde cesa su movimiento. Por su parte, la proteína P3 de JPN 1 se mantiene móvil durante todo el periodo de observación y asociada al retículo endoplasmático.
6. La posición 279 de la proteína P3 es la responsable del comportamiento diferencial de las proteínas a nivel subcelular.
7. La proteína P3 de UK 1 y su correspondiente proteína 6K2 actúan conjuntamente en el transporte de cloroplastos hacia la región perinuclear.
8. El modelado tridimensional de la proteína P3 apunta a su posible interacción con proteínas de membrana.
9. El porte rastrero de los tallos de plantas infectadas por el aislado JPN 1 se debe a la ausencia de lignina y xilano en su pared celular secundaria.
10. El perfil transcriptómico de los genes implicados en la biosíntesis de los componentes de la pared celular se encuentra alterado debido a la infección por el Virus del mosaico del nabo.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abdelkefi, H., Sugliani, M., Ke, H., Harchouni, S., Soubigou-Taconnat, L., Citerne, S., Mouille, G., Fakhfakh, H., Robaglia, C., Field, B. (2018) Guanosine tetraphosphate modulates salicylic acid signalling and the resistance of *Arabidopsis thaliana* to Turnip mosaic virus. *Mol Plant Pathol* **19**, 634-646.

Adams, M.J., Antoniwi, J.F., Beaudoin, F. (2005) Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Mol Plant Pathol* **6**, 471-487.

Agbeci, M., Grangeon, R., Nelson, R.S., Zheng, H., Laliberté, J.-F. (2013) Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of Turnip mosaic virus. *PLoS Pathog* **9**, e1003683.

An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., Ha, S.B. (1989) Binary vectors, in: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., Verma, D.P.S. (Eds.), *Plant Molecular Biology Manual*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 29-47.

Arabidopsis Genome, I. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

Atmodjo, M.A., Sakuragi, Y., Zhu, X., Burrell, A.J., Mohanty, S.S., Atwood, J.A., 3rd, Orlando, R., Scheller, H.V., Mohnen, D. (2011) Galacturonosyltransferase (GAUT)1 and GAUT7 are the core of a plant cell wall pectin biosynthetic homogalacturonan:galacturonosyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20225-20230.

Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-10041.

Barajas, D., Xu, K., de Castro Martin, I.F., Sasvari, Z., Brandizzi, F., Risco, C., Nagy, P.D. (2014) Co-opted oxysterol-binding ORP and VAP proteins channel sterols to RNA virus replication sites via membrane contact sites. *PLoS Pathog* **10**, e1004388.

Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E. (2015) The cell biology of lignification in

higher plants. *Ann Bot* **115**, 1053-1074.

Bayer, E.M., Sparkes, I., Vanneste, S., Rosado, A. (2017) From shaping organelles to signalling platforms: the emerging functions of plant ER-PM contact sites. *Curr Opin Plant Biol* **40**, 89-96.

Bedoya, L.C., Daròs, J.-A. (2010) Stability of *Tobacco etch virus* infectious clones in plasmid vectors. *Virus Res* **149**, 234-240.

Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., Hawes, C. (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J* **15**, 441-447.

Bonawitz, N.D., Chapple, C. (2010) The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annu Rev Genet* **44**, 337-363.

Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., Grolach, J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**, 1499-1510.

Brandizzi, F., Barlowe, C. (2013) Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 382-392.

Carette, J.E., Verver, J., Martens, J., van Kampen, T., Wellink, J., van Kammen, A. (2002) Characterization of plant proteins that interact with cowpea mosaic virus '60K' protein in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **83**, 885-893.

Carrington, J.C., Freed, D.D. (1990) Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J Virol* **64**, 1590-1597.

Carrington, J.C., Freed, D.D., Oh, C.S. (1990) Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO J* **9**, 1347-1353.

Cevher-Keskin, B. (2013) ARF1 and SAR1 GTPases in endomembrane trafficking in plants. *Int J Mol Sci* **14**, 18181-18199.

Chapman, E.J., Prokhnevsky, A.I., Gopinath, K., Dolja, V.V., Carrington, J.C. (2004) Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**, 1179-1186.

Chellappan, P., Vanitharani, R., Fauquet, C.M. (2005) MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10381-10386.

Chen, C.-C., Chen, T.-C., Raja, J.A., Chang, C.-A., Chen, L.-W., Lin, S.-S., Yeh, S.-D. (2007) Effectiveness and stability of heterologous proteins expressed in plants by *Turnip mosaic virus* vector at five different insertion sites. *Virus Res* **130**, 210-227.

Cheng, F.-y., Williamson, J.D. (2010) Is there leaderless protein secretion in plants? *Plant Signal Behav* **5**, 129-131.

Cheng, F.Y., Zamski, E., Guo, W.W., Pharr, D.M., Williamson, J.D. (2009) Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: a possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta* **230**, 1093-1103.

Choi, I.R., Horken, K.M., Stenger, D.C., French, R. (2005) An internal RNA element in the P3 cistron of *Wheat streak mosaic virus* revealed by synonymous mutations that affect both movement and replication. *J Gen Virol* **86**, 2605-2614.

Choi, I.R., Stenger, D.C., French, R. (2000) Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritrovirus. *Virology* **267**, 185-198.

Chung, B.Y., Miller, W.A., Atkins, J.F., Firth, A.E. (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5897-5902.

Chung, K.P., Zeng, Y. (2017) An overview of protein secretion in plant cells. *Methods Mol Biol* **1662**, 19-32.

Cline, M.G. (1991) Apical dominance. *Bot Rev* **57**, 318-358.

Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., Laliberté, J.F. (2009) Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J Virol* **83**, 10460-10471.

Csorba, T., Kontra, L., Burgyan, J. (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology* **479-480**, 85-103.

Cui, X., Lu, L., Wang, Y., Yuan, X., Chen, X. (2018) The interaction of soybean reticulon homology domain protein (GmRHP) with Soybean mosaic virus encoded P3 contributes to the viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 2105-2110.

Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., Wang, A. (2010) The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* **397**, 56-63.

Cui, X., Yaghmaiean, H., Wu, G., Wu, X., Chen, X., Thorn, G., Wang, A. (2017) The C-terminal region of the *Turnip mosaic virus* P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology* **510**, 147-155.

Dallot, S., Quiot-Douine, L., Sáenz, P., Cervera, M.T., García, J.A., Quiot, J.B. (2001) Identification of *Plum pox virus* determinants implicated in specific interactions with different *Prunus spp.* *Phytopathology* **91**, 159-164.

Davis, M.E., McCammon, J.A. (1990) Electrostatics in biomolecular structure and dynamics. *Chem Rev* **90**, 509-521.

Dawson, W.O., Beck, D.L., Knorr, D.A., Grantham, G.L. (1986) cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1832-1836.

De Rybel, B., Mähönen, A.P., Helariutta, Y., Weijers, D. (2015) Plant vascular development: from early specification to differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 30-40.

Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* **13**, 4777-4788.

Déjardin, A., Laurans, F., Arnaud, D., Breton, C., Pilate, G., Leplé, J.-C. (2010) Wood formation in Angiosperms. *C R Biol* **333**, 325-334.

Deng, P., Wu, Z., Wang, A. (2015) The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virology* **12**, 141.

Desbiez, C., Gal-On, A., Girard, M., Wipf-Scheibel, C., Lecoq, H. (2003) Increase in *Zucchini yellow mosaic virus* symptom severity in tolerant zucchini cultivars is related to a point mutation in P3 protein and is associated with a loss of relative fitness on susceptible plants. *Phytopathology* **93**, 1478-1484.

Ding, Y., Robinson, D.G., Jiang, L. (2014) Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants. *Curr Opin Cell Biol* **29**, 107-115.

Drakakaki, G., Dandekar, A. (2013) Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci* **203**, 74-78.

Duval, F., Cruz-Vega, D.E., González-Gamboa, I., González-Garza, M.T., Ponz, F., Sánchez, F., Alarcón-Galván, G., Moreno-Cuevas, J.E. (2016) Detection of autoantibodies to vascular endothelial growth factor receptor-3 in bile duct ligated rats and correlations with a panel of traditional markers of liver diseases. *Dis Markers* **2016**, 7.

Eiamtanasate, S., Juricek, M., Yap, Y.K. (2007) C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum. *Virus Genes* **35**, 611-617.

Gallois, J.L., Charron, C., Sánchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C., German-Retana, S. (2010) Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J Gen Virol* **91**, 288-293.

García Irles, M., Segovia Huertas, Y. (2013) Manual d'histologia vegetal. Universitat d'Alacant. Servei de Política Lingüística.

García-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., Fahlgren, N., Gilbert, K.B., Takeda, A., Giampetruzzi, A., Ruiz, M.T.G., McGinn, M.G., Lowery, N., MartinezBaladejo, M.T., Carrington, J.C. (2015) Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during *Turnip*

Mosaic Virus infection. *PLoS Pathog* **11**.

Genovés, A., Navarro, J.A., Pallás, V. (2010) The Intra- and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 263-272.

Gibbs, A.J., Huy Duc, N., Ohshima, K. (2015) The 'emergence' of turnip mosaic virus was probably a 'gene-for-quasi-gene' event. *Curr Opin Virol* **10**, 20-26.

Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S. (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 134-141.

Gonzalez-Gamboa, I., Manrique, P., Sanchez, F., Ponz, F. (2017) Plant-made potyvirus-like particles used for log-increasing antibody sensing capacity. *J Biotechnol* **254**, 17-24.

Goring, D.R., Di Sansebastiano, G.P. (2017) Protein and membrane trafficking routes in plants: conventional or unconventional? *J Exp Bot* **69**, 1-5.

Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H., Laliberté, J.F. (2012a) Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J Virol* **86**, 9255-9265.

Grangeon, R., Jiang, J., Laliberté, J.F. (2012b) Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Curr Opin Virol* **2**, 683-690.

Grangeon, R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H., Laliberté, J.F. (2013) 6K₂-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* **4**, 351.

Griffing, L.R., Lin, C., Perico, C., White, R.R., Sparkes, I. (2017) Plant ER geometry and dynamics: biophysical and cytoskeletal control during growth and biotic response. *Protoplasma* **254**, 43-56.

Guo, D., Rajamaki, M.L., Saarma, M., Valkonen, J.P. (2001) Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the

yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **82**, 935-939.

Hadrien, P., P., L.G. (2015) When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnol J* **13**, 1121-1135.

Hagiwara-Komoda, Y., Choi, S.H., Sato, M., Atsumi, G., Abe, J., Fukuda, J., Honjo, M.N., Nagano, A.J., Komoda, K., Nakahara, K.S., Uyeda, I., Naito, S. (2016) Truncated yet functional viral protein produced via RNA polymerase slippage implies underestimated coding capacity of RNA viruses. *Sci Rep* **6**, 21411.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

Harholt, J., Suttangkakul, A., Vibe Scheller, H. (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol* **153**, 384.

Harrison, B.D., Roberts, I.M. (1971) Pinwheels and crystalline structures induced by *Atropa Mild Mosaic Virus*, a plant virus with particles 925 nm long. *J Gen Virol* **10**, 71-78.

Heinlein, M. (2015) Plant virus replication and movement. *Virology* **479-480**, 657-671.

Hjulsager, C.K., Lund, O.S., Johansen, I.E. (2002) A new pathotype of *Pea seedborne mosaic virus* explained by properties of the P3-6k1- and viral genome-linked protein (VP-g)-coding regions. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 169-171.

Hjulsager, C.K., Olsen, B.S., Jensen, D.M., Cordea, M.I., Krath, B.N., Johansen, I.E., Lund, O.S. (2006) Multiple determinants in the coding region of *Pea seed-borne mosaic virus* P3 are involved in virulence against *sbm-2* resistance. *Virology* **355**, 52-61.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.

Holzinger, A., Blaas, K. (2016) Actin-dynamics in plant cells: the function of actin-perturbing substances: jasplakinolide, chondramides, phalloidin, cytochalasins, and latrunculins. *Methods Mol Biol* **1365**, 243-261.

Honig, B., Nicholls, A. (1995) Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **268**, 1144-1149.

Ivanov, K.I., Eskelin, K., Löhmus, A., Mäkinen, K. (2014) Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J Gen Virol* **95**, 1415-1429.

Izard, T., Brown, D.T. (2016) Mechanisms and functions of vinculin interactions with phospholipids at cell adhesion sites. *J Biol Chem* **291**, 2548-2555.

Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D., Malnoe, P. (1997) Infectious *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *J Gen Virol* **78**, 3141-3145.

Jenner, C.E., Tomimura, K., Ohshima, K., Hughes, S.L., Walsh, J.A. (2002) Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* **300**, 50-59.

Jenner, C.E., Walsh, J.A. (1996) Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathol.* **45**, 848-856.

Jenner, C.E., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F., Walsh, J.A. (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of *Turnip mosaic virus* as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 777-784.

Jiang, J., Patarroyo, C., García Cabanillas, D., Zheng, H., Laliberté, J.F. (2015) The vesicle-forming 6K₂ protein of turnip mosaic virus interacts with the COPII coatomer Sec24a for viral systemic infection. *J Virol* **89**, 6695-6710.

Johansen, I.E. (1996) Intron insertion facilitates amplification of cloned virus cDNA in *Escherichia coli* while biological activity is reestablished after transcription *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12400-12405.

Johansen, I.E., Lund, O.S., Hjulsager, C.K., Laursen, J. (2001) Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. *J Virol* **75**, 6609-6614.

Jouannet, V., Brackmann, K., Greb, T. (2015) (Pro)cambium formation and proliferation: two sides of the same coin? *Curr Opin Plant Biol* **23**, 54-60.

Kabsch, W., Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**, 2577-2637.

Kang, S.H., Lim, W.S., Kim, K.H. (2004) A protein interaction map of soybean mosaic virus strain G7H based on the yeast two-hybrid system. *Mol Cells* **18**, 122-126.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A., Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Dev Cell* **4**, 205-217.

Kim, B.M., Suehiro, N., Natsuaki, T., Inukai, T., Masuta, C. (2010) The P3 protein of *Turnip mosaic virus* can alone induce hypersensitive response-like cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying *TuNI*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 144-152.

Kim, S.J., Brandizzi, F. (2016) The plant secretory pathway for the trafficking of cell wall polysaccharides and glycoproteins. *Glycobiology* **26**, 940-949.

Kim, W.C., Ko, J.H., Han, K.H. (2012) Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis. *Plant Mol Biol* **78**, 489-501.

Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F., Linthorst, H.J.M. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 1933-1937.

Knox, J.P. (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 308-313.

Ko, J.-H., Han, K.-H., Park, S., Yang, J. (2004) Plant body weight-induced secondary growth in *Arabidopsis* and its transcription phenotype revealed by whole-transcriptome profiling. *Plant Physiol* **135**, 1069-1083.

Ko, J.H., Jeon, H.W., Kim, W.C., Kim, J.Y., Han, K.H. (2014) The MYB46/MYB83-media-

ted transcriptional regulatory programme is a gatekeeper of secondary wall biosynthesis. *Ann Bot* **114**, 1099-1107.

Ko, J.H., Kim, W.C., Han, K.H. (2009) Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **60**, 649-665.

Kretschmann, D. (2003) Velcro mechanics in wood. *Nat Mater* **2**, 775.

Kriechbaumer, V., Botchway, S.W., Slade, S.E., Knox, K., Frigerio, L., Oparka, K., Hawes, C. (2015) Reticulomics: protein-protein interaction studies with two plasmodesmata-localized reticulon family proteins identify binding partners enriched at plasmodesmata, endoplasmic reticulum, and the plasma membrane. *Plant Physiol* **169**, 1933-1945.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. *J Mol Biol* **305**, 567-580.

Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., Mimura, T., Fukuda, H., Demura, T. (2005) Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev* **19**, 1855-1860.

Kumar, M., Campbell, L., Turner, S. (2016) Secondary cell walls: biosynthesis and manipulation. *J Exp Bot* **67**, 515-531.

Kung, Y.-J., Lin, P.-C., Yeh, S.-D., Hong, S.-F., Chua, N.-H., Liu, L.-Y., Lin, C.-P., Huang, Y.-H., Wu, H.-W., Chen, C.-C., Lin, S.-S. (2014) Genetic analyses of the FRNK motif function of *Turnip mosaic virus* uncover multiple and potentially interactive pathways of cross-protection. *Mol Plant-Microbe Interact* **27**, 944-955.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.

Laín, S., Riechmann, J., Méndez, E., García, J.A. (1988) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res* **10**, 325-341.

- Laliberté, J.F., Sanfaçon, H. (2010)** Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu Rev Phytopathol* **48**, 69-91.
- Lange, M., Yellina, A.L., Orashakova, S., Becker, A. (2013)** Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods Mol Biol* **975**, 1-14.
- Langenberg, W.G., Zhang, L. (1997)** Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J Struct Biol* **118**, 243-247.
- Levy, A., Zheng, J.Y., Lazarowitz, S.G. (2015)** Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement. *Curr Biol* **25**, 2018-2025.
- Li, E., Bhargava, A., Qiang, W., Friedmann, M.C., Forneris, N., Savidge, R.A., Johnson, L.A., Mansfield, S.D., Ellis, B.E., Douglas, C.J. (2012)** The Class II KNOX gene KNAT7 negatively regulates secondary wall formation in Arabidopsis and is functionally conserved in Populus. *New Phytol* **194**, 102-115.
- Li, Y., Xiong, R., Bernards, M., Wang, A. (2016)** Recruitment of *Arabidopsis* RNA helicase AtRH9 to the viral replication complex by viral replicase to promote Turnip mosaic virus replication. *Sci Rep* **6**, 30297.
- Lin, L., Luo, Z., Yan, F., Lu, Y., Zheng, H., Chen, J. (2011)** Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. *Virus Genes* **43**, 90-92.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
- López-Moya, J.J., García, J.A. (2000)** Construction of a stable and highly infectious intron-containing cDNA clone of plum pox potyvirus and its use to infect plants by particle bombardment. *Virus Res* **68**, 99-107.
- Loqué, D., Scheller, H.V., Pauly, M. (2015)** Engineering of plant cell walls for enhanced

biofuel production. *Curr Opin Plant Biol* **25**, 151-161.

Lu, L., Wu, G., Xu, X., Luan, H., Zhi, H., Cui, J., Cui, X., Chen, X. (2015) Soybean actin-depolymerizing factor 2 interacts with *Soybean mosaic virus*-encoded P3 protein. *Virus Genes* **50**, 333-339.

Luan, H., Shine, M.B., Cui, X., Chen, X., Ma, N., Kachroo, P., Zhi, H., Kachroo, A. (2016) The potyviral P3 protein targets eukaryotic elongation factor 1A to promote the unfolded protein response and viral pathogenesis. *Plant Physiol* **172**, 221-234.

Lunello, P., Mansilla, C., Sánchez, F., Ponz, F. (2007) A developmentally linked, dramatic, and transient loss of virus from roots of *Arabidopsis thaliana* plants infected by either of two RNA viruses. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1589-1595.

Manacorda, C.A., Mansilla, C., Debat, H.J., Zavallo, D., Sánchez, F., Ponz, F., Asurmendi, S. (2013) Salicylic Acid Determines Differential Senescence Produced by Two Turnip mosaic virus Strains Involving Reactive Oxygen Species and Early Transcriptomic Changes. *Mol Plant-Microbe Interact* **26**, 1486-1498.

Martínez-Herrera, D., Romero, J., Martínez-Zapater, J.M., Ponz, F. (1994) Suitability of *Arabidopsis thaliana* as a system for the study of plant-virus interactions. *Fitopatologia* **29**, 132-136.

Matte Risopatron, J.P., Sun, Y., Jones, B.J. (2010) The vascular cambium: molecular control of cellular structure. *Protoplasma* **247**, 145-161.

McCarthy, R.L., Zhong, R., Ye, Z.H. (2009) MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* **50**, 1950-1964.

McCartney, L., Marcus, S.E., Knox, J.P. (2005) Monoclonal antibodies to plant cell wall xylans and arabinoxylans. *J Histochem Cytochem* **53**, 543-546.

Meents, M.J., Watanabe, Y., Samuels, A.L. (2018) The cell biology of secondary cell wall biosynthesis. *Ann Bot* **121**, 1107-1125.

Mellerowicz, E.J., Sundberg, B. (2008) Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 293-300.

Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., Saarma, M. (1999) Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**, 15-22.

Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A. (2014) The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front Plant Sci* **5**, 358.

Miki, B., McHugh, S. (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* **107**, 193-232.

Mingot, A., Valli, A., Rodamilans, B., San León, D., Baulcombe, D.C., García, J.A., López-Moya, J.J. (2016) The P1N-PISPO trans-frame gene of Sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor. *J Virol* **90**, 3543-3557.

Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M. (2007) NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 270-280.

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., Ohme-Takagi, M. (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* **17**, 2993-3006.

Mlotshwa, S., Schauer, S.E., Smith, T.H., Mallory, A.C., Herr, J.M., Jr., Roth, B., Merchant, D.S., Ray, A., Bowman, L.H., Vance, V.B. (2005) Ectopic DICER-LIKE1 expression in P1/HC-Pro *Arabidopsis* rescues phenotypic anomalies but not defects in microRNA and silencing pathways. *Plant Cell* **17**, 2873-2885.

Monje-Galván, V., Klauda, J.B. (2016) Peripheral membrane proteins: Tying the knot between experiment and computation. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 1584-1593.

Montesinos, J.C., Langhans, M., Sturm, S., Hillmer, S., Aniento, F., Robinson, D.G.,

Marcote, M.J. (2013) Putative p24 complexes in Arabidopsis contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway. *J Exp Bot* **64**, 3147-3167.

Montesinos, J.C., Pastor-Cantizano, N., Robinson, D.G., Marcote, M.J., Aniento, F. (2014) Arabidopsis p24delta5 and p24delta9 facilitate Coat Protein I-dependent transport of the K/HDEL receptor ERD2 from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Plant J* **80**, 1014-1030.

Moult, J., Fidelis, K., Kryzhtafovich, A., Schwede, T., Tramontano, A. (2014) Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP)--round x. *Proteins* **82 Suppl 2**, 1-6.

Mulgrew-Nesbitt, A., Diraviyam, K., Wang, J., Singh, S., Murray, P., Li, Z., Rogers, L., Mirkovic, N., Murray, D. (2006) The role of electrostatics in protein-membrane interactions. *Biochim Biophys Acta, Mol Cell Biol Lipids* **1761**, 812-826.

Nebenfuhr, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol* **121**, 1127-1142.

Nguyen, H.D., Tomitaka, Y., Ho, S.Y.W., Duchêne, S., Vetten, H.-J., Lesemann, D., Walsh, J.A., Gibbs, A.J., Ohshima, K. (2013) Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *Plos One* **8**, e55336.

Nixon, B.T., Mansouri, K., Singh, A., Du, J., Davis, J.K., Lee, J.-G., Slabaugh, E., Vandavasi, V.G., O'Neill, H., Roberts, E.M., Roberts, A.W., Yingling, Y.G., Haigler, C.H. (2016) Comparative structural and computational analysis supports eighteen cellulose synthases in the plant cellulose synthesis complex. *Sci Rep* **6**, 28696.

Nolasco, G., de Blas, C., Torres, V., Ponz, F. (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J Virol Methods* **45**, 201-218.

Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J.A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., Gibbs, A. (2002) Molecular evolu-

tion of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J Gen Virol* **83**, 1511-1521.

Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., Skriver, K. (2005) NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *Trends Plant Sci* **10**, 79-87.

Olsper, A., Chung, B.Y., Atkins, J.F., Carr, J.P., Firth, A.E. (2015) Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. *EMBO Rep* **16**, 995-1004.

Pastor-Cantizano, N., Montesinos, J.C., Bernat-Silvestre, C., Marcote, M.J., Aniento, F. (2016) p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway. *Protoplasma* **253**, 967-985.

Peña, A. (2011) Manual de Histología Vegetal. Mundi-Prensa.

Peña, E.J., Heinlein, M. (2013) Cortical microtubule-associated ER sites: organization centers of cell polarity and communication. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 764-773.

Peña, M.J., Zhong, R., Zhou, G.K., Richardson, E.A., O'Neill, M.A., Darvill, A.G., York, W.S., Ye, Z.H. (2007) Arabidopsis irregular xylem8 and irregular xylem9: Implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell* **19**, 549-563.

Peremyslov, V.V., Pan, Y.W., Dolja, V.V. (2004) Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Virol* **78**, 3704-3709.

Pérez-Sancho, J., Vanneste, S., Lee, E., McFarlane, H.E., Esteban Del Valle, A., Valpuesta, V., Friml, J., Botella, M.A., Rosado, A. (2015) The Arabidopsis synaptotagmin1 is enriched in endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites and confers cellular resistance to mechanical stresses. *Plant Physiol* **168**, 132-143.

Petersen, P.D., Lau, J., Ebert, B., Yang, F., Verhertbruggen, Y., Kim, J.S., Varanasi, P., Suttangkakul, A., Auer, M., Loqué, D., Scheller, H.V. (2012) Engineering of plants with improved properties as biofuels feedstocks by vessel-specific complementation of xylan biosynthesis mutants. *Biotechnol Biofuels* **5**, 84.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.

Pitzalis, N., Heinlein, M. (2017) The roles of membranes and associated cytoskeleton in plant virus replication and cell-to-cell movement. *J Exp Bot* **69**, 117-132.

Pokutta, S., Drees, F., Yamada, S., Nelson, W.J., Weis, W.I. (2008) Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans* **36**, 141-147.

Porta, C., Lomonossoff, G.P. (2002) Viruses as Vectors for the Expression of Foreign Sequences in Plants. *Biotechnol Genet Eng Rev* **19**, 245-292.

Pradhan Mitra, P., Loqué, D. (2014) Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. *J Vis Exp* **87**, e51381.

Revers, F., García, J.A. (2015) Molecular biology of potyviruses. *Adv Virus Res* **92**, 101-199.

Riechmann, J.L., Laín, S., García, J.A. (1990) Infectious in Vitro transcripts from a plum pox potyvirus cDNA clone. *Virology* **177**, 710-716.

Robinson, D.G., Ding, Y., Jiang, L. (2016) Unconventional protein secretion in plants: a critical assessment. *Protoplasma* **253**, 31-43.

Rodamilans, B., Valli, A., Mingot, A., San León, D., Baulcombe, D., López-Moya, J.J., García, J.A. (2015) RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* family. *J Virol* **89**, 6965-6967.

Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., Shaw, J.G. (1993) Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J Gen Virol* **74**, 1945-1949.

Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J.G., Lomonossoff, G.P., Qiu, S.G., Linstead, P., Shanks, M., Risco, C. (1997) The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**, 296-306.

Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**, 725-738.

Rumyantseva, N.I. (2005) Arabinogalactan proteins: involvement in plant growth and morphogenesis. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 1073-1085.

Ruonala, R., Ko, D., Helariutta, Y. (2017) Genetic networks in plant vascular development. *Annu Rev Genet* **51**, 335-359.

Sáenz, P., Cervera, M.T., Dallot, S., Quiot, L., Quiot, J.B., Riechmann, J.L., García, J.A. (2000) Identification of a pathogenicity determinant of *Plum pox virus* in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K(1). *J Gen Virol* **81**, 557-566.

Salvador, B., Delgadillo, M.O., Sáenz, P., García, J.A., Simón-Mateo, C. (2008) Identification of *Plum pox virus* pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 20-29.

Sambrook, J., Russell, D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, F., Manrique, P., Mansilla, C., Lunello, P., Wang, X., Rodrigo, G., López-González, S., Jenner, C., González-Melendi, P., Elena, S.F., Walsh, J., Ponz, F. (2015) Viral strain-specific differential alterations in *Arabidopsis* developmental patterns. *Mol Plant Microbe Interact* **28**, 1304-1315.

Sánchez, F., Martínez-Herrera, D., Aguilar, I., Ponz, F. (1998) Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res* **55**, 207-219.

Sánchez, F., Ponz, F. (2018) Viruses and Plant Development, in: Gaur, R., Khurana, S., Dorokhov, Y. (Eds.), Plant Viruses: Diversity, Interaction and Management. CRC Press, Boca Raton. Florida, USA, pp. 267-278.

Sánchez, F., Wang, X., Jenner, C.E., Walsh, J.A., Ponz, F. (2003) Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus*

Res **94**, 33-43.

Sardaru, P., Sinausia, L., Lopez-Gonzalez, S., Zindovic, J., Sanchez, F., Ponz, F. (2018) The apparent non-host resistance of Ethiopian mustard to a radish-infecting strain of Turnip mosaic virus is largely determined by the C-terminal region of the P3 viral protein. *Mol Plant Pathol* DOI: 10.1111/mpp.12674.

Schaad, M.C., Jensen, P.E., Carrington, J.C. (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* **16**, 4049-4059.

Scholthof, K.B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G.D. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **12**, 938-954.

Schuetz, M., Smith, R., Ellis, B. (2013) Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *J Exp Bot* **64**, 11-31.

Serra-Soriano, M., Pallás, V., Navarro, J.A. (2014) A model for transport of a viral membrane protein through the early secretory pathway: minimal sequence and endoplasmic reticulum lateral mobility requirements. *Plant J* **77**, 863-879.

Shen, W.T., Wang, M.Q., Yan, P., Gao, L., Zhou, P. (2010) Protein interaction matrix of Papaya ringspot virus type P based on a yeast two-hybrid system. *Acta Virol* **54**, 49-54.

Siaw, M.F., Shahabuddin, M., Ballard, S., Shaw, J.G., Rhoads, R.E. (1985) Identification of a protein covalently linked to the 5' terminus of tobacco vein mottling virus RNA. *Virology* **142**, 134-143.

Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., Okuda, S. (2004) An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J Gen Virol* **85**, 2087-2098.

Tan, Z., Gibbs, A.J., Tomitaka, Y., Sanchez, F., Ponz, F., Ohshima, K. (2005) Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *J Gen Virol* **86**, 501-

510.

Tang, W.F., Yang, S.Y., Wu, B.W., Jheng, J.R., Chen, Y.L., Shih, C.H., Lin, K.H., Lai, H.C., Tang, P., Horng, J.T. (2007) Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication. *J Biol Chem* **282**, 5888-5898.

Thole, V., Worland, B., Snape, J.W., Vain, P. (2007) The pCLEAN dual binary vector system for Agrobacterium-Mediated plant transformation. *Plant Physiol* **145**, 1211-1219.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.

Timmerman, K.P., Tu, C.P. (1985) Complete sequence of IS3. *Nucleic Acids Res* **13**, 2127-2139.

Tomimura, K., Gibbs, A.J., Jenner, C.E., Walsh, J.A., Ohshima, K. (2003) The phylogeny of Turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia. *Mol Ecol* **12**, 2099-2111.

Touriño, A., Sánchez, F., Fereres, A., Ponz, F. (2008) High expression of foreign proteins from a biosafe viral vector derived from *Turnip mosaic virus*. *Span J Agric Res* **6**, 48-58.

Touw, W.G., Baakman, C., Black, J., te Beek, T.A.H., Krieger, E., Joosten, R.P., Vriend, G. (2015) A series of PDB-related databanks for everyday needs. *Nucleic Acids Res* **43**, D364-D368.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.

Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., Hara-Nishimura, I. (2010) Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6894-6899.

Urcuqui-Inchima, S., Walter, J., Drugeon, G., German-Retana, S., Haenni, A.L., Can-

dresse, T., Bernardi, F., Le Gall, O. (1999) Potyvirus helper component-proteinase self-interaction in the yeast two-hybrid system and delineation of the interaction domain involved. *Virology* **258**, 95-99.

Van de Meene, A.M., Doblin, M.S., Bacic, A. (2017) The plant secretory pathway seen through the lens of the cell wall. *Protoplasma* **254**, 75-94.

Vijayan, V., López-González, S., Sánchez, F., Ponz, F., Pagán, I. (2017) Virulence evolution of a sterilizing plant virus: Tuning multiplication and resource exploitation. *Virus Evol* **3**, vex033-vex033.

Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., Miller, W.A. (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog* **8**, e1002639.

Walsh, J.A., Jenner, C.E. (2002) Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Mol Plant Pathol* **3**, 289-300.

Wan, J., Basu, K., Mui, J., Vali, H., Zheng, H., Laliberté, J.-F. (2015a) Ultrastructural characterization of Turnip mosaic virus-induced cellular rearrangements reveals membrane-bound viral particles accumulating in vacuoles. *J Virol* **89**, 12441-12456.

Wan, J., Cabanillas, D.G., Zheng, H., Laliberté, J.F. (2015b) Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. *Plant Physiol* **167**, 1374-1388.

Wang, H.Z., Dixon, R.A. (2012) On-off switches for secondary cell wall biosynthesis. *Mol Plant* **5**, 297-303.

Wang, P., Hawes, C., Hussey, P.J. (2017a) Plant Endoplasmic Reticulum-plasma membrane contact sites. *Trends Plant Sci* **22**, 289-297.

Wang, P., Hawkins, T.J., Richardson, C., Cummins, I., Deeks, M.J., Sparkes, I., Hawes, C., Hussey, P.J. (2014) The plant cytoskeleton, NET3C, and VAP27 mediate the link between the plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Curr Biol* **24**, 1397-1405.

Wang, P., Richardson, C., Hawkins, T.J., Sparkes, I., Hawes, C., Hussey, P.J. (2016) Plant VAP27 proteins: domain characterization, intracellular localization and role in plant development. *New Phytol* **210**, 1311-1326.

Wang, T., Li, L., Hong, W. (2017b) SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* **18**, 767-775.

Ward, C.W., Shukla, D.D. (1991) Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology* **32**, 269-296.

Wei, T., Huang, T.S., McNeil, J., Laliberté, J.F., Hong, J., Nelson, R.S., Wang, A. (2010a) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J Virol* **84**, 799-809.

Wei, T., Wang, A. (2008) Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J Virol* **82**, 12252-12264.

Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., Wang, A. (2010b) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**, e1000962.

Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfaçon, H., Wang, A. (2013) The SNARE protein Syp71 is essential for turnip mosaic virus infection by mediating fusion of virus-induced vesicles with chloroplasts. *PLoS Pathog* **9**, e1003378.

Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M.G., Laliberté, J.F. (1997) Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84-92.

Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M., Ictv Report, C. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. *J Gen Virol* **98**, 352-354.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* **12**, 7-8.

Zhang, Y., Skolnick, J. (2004) Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins* **57**, 702-710.

Zhong, R., Demura, T., Ye, Z.H. (2006) SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3158-3170.

Zhong, R., Lee, C., Zhou, J., McCarthy, R.L., Ye, Z.H. (2008) A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 2763-2782.

Zhong, R., Richardson, E.A., Ye, Z.H. (2007a) The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2776-2792.

Zhong, R., Richardson, E.A., Ye, Z.H. (2007b) Two NAC domain transcription factors, SND1 and NST1, function redundantly in regulation of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Planta* **225**, 1603-1611.

Zhong, R., Taylor, J.J., Ye, Z.H. (1997) Disruption of interfascicular fiber differentiation in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **9**, 2159-2170.

Zhong, R., Ye, Z.H. (1999) *IFL1*, a gene regulating interfascicular fiber differentiation in *Arabidopsis*, encodes a homeodomain-leucine zipper protein. *Plant Cell* **11**, 2139-2152.

Zhong, R., Ye, Z.H. (2012) MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes. *Plant Cell Physiol* **53**, 368-380.

Zhong, R., Ye, Z.H. (2015) The *Arabidopsis* NAC transcription factor NST2 functions together with SND1 and NST1 to regulate secondary wall biosynthesis in fibers of inflorescence stems. *Plant Signal Behav* **10**, e989746.

Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., Ye, Z.H. (2009) MYB58 and MYB63 are transcriptional ac-

tivators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 248-266.

Zilian, E., Maiss, E. (2011) Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions *in planta* using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J Gen Virol* **92**, 2711-2723.