



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL**

***EFFECTO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS  
PLANTAS EN LA EFICACIA DE TRANSMISIÓN POR  
SEMILLA DE LOS VIRUS***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor: Adrián García Herrero**

**Tutor: Jesús Israel Pagán Muñoz**

**8 de julio de 2021**



**POLITÉCNICA**



## **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**Escuela Técnica Superior De  
Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas**

### **GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

**EFFECTO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA  
DE LAS PLANTAS EN LA EFICACIA DE  
TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LOS VIRUS**

#### **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**Adrián García Herrero  
Madrid, 2021**

Director: Jesús Israel Pagán Muñoz  
Profesor Contratado Doctor  
Dpto. de Biotecnología – Biología Vegetal (ETSIAAB, UPM)



**POLITÉCNICA**



**EFEECTO DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS EN LA EFICACIA  
DE TRANSMISIÓN POR SEMILLA DE LOS VIRUS**

**Memoria presentada por Adrián García Herrero para la obtención del título  
de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

**Fdo: Adrián García Herrero**

**VºBº Tutor y director del TFG**

**Dr. Jesús Israel Pagán Muñoz  
Profesor Contratado Doctor  
Dpto. de Biotecnología – Biología Vegetal  
ETSIAAB-Universidad Politécnica de Madrid**

**Madrid, 8 de Julio de 2021**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por apoyarme en todo, por respetar todas mis decisiones, por buscar mi felicidad antes que la suya y por ser un pilar indestructible a nivel emocional, económico y de valores.

A mi abuela Puri, por preocuparse siempre de que me encuentre bien y de que coma, y por preguntar siempre acerca de todo, aunque no se entere de nada y solo lo haga para que sienta que lo que hago es importante.

A mi hermana Ana, por echarme una mano siempre que lo necesito, para lo que sea y cuando sea.

A mi primo Rafel, por siempre buscar hablar conmigo y preguntarme como me van las cosas, por esas tardes de rollo magnifico y por los innumerables e inolvidables momentos siempre que voy a Valencia.

A mis amigos Irene y Kevin, por compartir sus mejores momentos conmigo y soportar mis peores experiencias, y por no juzgarme sino entenderme, por llorar porque les dolía tanto como a mí y por abrazarme cuando no lo pedía, pero lo necesitaba.

A mis amigos Jenny y Saul, por todas esas noches de conversación profunda, por todas esas noches de fiesta y por hacerme sentir que tengo una casa a la que acudir donde sea que estéis.

A mi amigo Francesc, por bostearme y enseñarme todo lo que sé de WoW, por los fiestones en el chalet, por las tardes de salir a correr juntos y por dejarme convertirme en el 'siniestros'.

A mi amigo Álvaro, por ser el que se queda conmigo hasta que cierra todo, el que saca un plan de la nada y el que siempre hace por alegrarme, aunque la cosa esté fea.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Israel Pagán, por aceptar ser mi tutor en este proyecto, por dejarme formar parte de su equipo de investigación durante más de medio año y por la buena relación que siempre hemos tenido.

A Miriam Gil, por ser mi madre adoptiva dentro del laboratorio, por haberme enseñado cómo funciona un laboratorio por dentro, por enseñarme a usar todos los aparatos técnicos del laboratorio y por tratarme como a un compañero más.

A Alberto Cobos, por ayudarme siempre que parecía perdido y por darme ánimos cuando parecía que el trabajo no se acabaría nunca.

A Álvaro Gutiérrez, por aprender conmigo y ayudarme mucho con los extractos de RNA.

A Rafael de Andrés, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por haberme descubierto la magnífica plataforma online Benchling.

# ÍNDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Importancia de los virus de plantas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Métodos de defensa de las plantas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Modos de transmisión de los virus de plantas</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Sistema experimental</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.1 El virus del mosaico del nabo</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.2 <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1.5 Antecedentes de este Trabajo de Fin de Grado</b> .....	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 2: OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Material biológico</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.1 Genotipos virales</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.2 Genotipos del huésped</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Diseño experimental</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2.1 Germinación de las semillas y recolección de plántulas</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.2 Cuantificación de la transmisión por semilla</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 Análisis estadístico</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.1 Estimación de la transmisión por semilla</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3.2 Análisis multivariantes</b> .....	<b>13</b>
<b>3.3.3 Análisis de la relación entre la eficacia de transmisión por semilla y otros caracteres de la infección</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1 Efecto de la evolución de TuMV sobre la transmisión por semilla</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2 Asociación entre la eficacia de transmisión por semilla y la tolerancia a la infección por TuMV</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 Asociación entre la eficacia de transmisión por semilla y caracteres de la infección</b> .....	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 7: REFERENCIAS</b> .....	<b>26</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Diagrama del genoma de TuMV. ....</b>	<b>5</b>
<b>Figura 2. Diseño del experimento previo a este TFG. ....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3. Diagrama del diseño experimental. ....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 4. Placas Petri de los diferentes genotipos. ....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 5. Niveles de transmisión por semilla según la población en la que se evolucionó el virus. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 6. Graficas de regrsión entre la eficacia de transmisión por semilla y los caracteres fenotipicos FT Y MT. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 7. Graficas de la regrsión entre la eficacia de transmision por semilla y diversos caracteres de la infección. ....</b>	<b>20</b>

## **INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1. Lista de las proteínas de TuMV y sus principales funciones. ....</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2. Porcentajes de germinación de las semillas (%). ....</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 3. Parámetros estadísticos globales de ST (%). ....</b>	<b>15</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- MRG:** gen de resistencia mayor (major resistance gene)
- MT:** tolerancia a la mortalidad (mortality tolerance)
- FT:** tolerancia de fecundidad (fecundity tolerance)
- ST:** transmisión por semilla (seed transmission)
- TuMV:** virus del mosaico del nabo (turnip mosaic virus)
- RNA:** ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
- JPN1:** JPN 1-TuMV
- UK1:** UK 1-TuMV
- F:** cebador de sentido positivo (forward)
- R:** cebador de sentido negativo (reverse)
- GzLM:** Modelo lineal generalizado (generalized linear model)
- AIC:** Criterio de Información de Akaike
- GP:** periodo vegetativo (growth period)
- RP:** periodo reproductor (reproductive period)
- PRP:** periodo post reproductor (post-reproductive period)
- LP:** periodo de vida (life period)
- SW:** peso de las semillas (seed weight)
- IW:** peso de la inflorescencia (inflorescence weight)
- RW:** peso de la roseta (rosette weight)
- VA:** acumulación viral (viral accumulation)
- P0:** Población de huésped con un porcentaje del 0% de plantas tolerantes a TuMV
- P100:** Población de huésped con un porcentaje del 100% de plantas tolerantes a TuMV

## LISTA DE SÍMBOLOS

**μmol:** micromoles

**μl:** microlitro

**ng:** nanogramos

## RESUMEN

The two main plant defense mechanisms against parasites are resistance and tolerance. Despite accumulating evidence indicates that tolerance is as widespread and successful as resistance, it has been comparatively much less studied. As a defense mechanism, tolerance is expected to affect parasite fitness, and particularly its capacity for dispersal. However, the consequences of tolerance for the rate of parasite transmission are largely unknown, especially for the efficiency of seed transmission rate. Seed transmission rate is a main mode for plant parasite spread. Therefore, the study of how plant tolerance influences this trait will contribute to develop more efficient control strategies, which would have significant economic, social, and ecological benefits. Using *Arabidopsis thaliana* and two isolates of *Turnip mosaic virus* (TuMV; JPN 1 & UK 1) as host-parasite system, this study analyzed how do viruses evolve their seed transmission rate in the presence/absence of host tolerance. To do so, seeds from four different plant genotypes, each one infected with lineages evolved from JPN1 and UK1 ancestors in host populations with different levels of tolerance, were grown and tested for the presence/absence of the virus. The efficiency of seed transmission was also compared with the effect of virus infection in various plant traits to gather information on the possible processes underlying the evolution of seed transmission rate. The results showed that lineages evolved in highly tolerant host populations had significantly higher seed transmission rate than the lineages evolved in less tolerant hosts or than the ancestral viruses. The increase of seed transmission rate was then found to be associated with the rise of the host tolerance, and also with higher viral accumulation within the host. Additionally, this work presents tentative evidence that for the increase in seed transmission rate to occur, this parameter must be decoupled from other infection traits related with the growth and reproduction of the host. Overall, this work provides novel insights on the processes of parasite adaptation to host tolerance and shows that improved plant defenses not necessarily result in a negative effect on virus fitness.

# **CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Importancia de los virus de plantas**

Los virus son organismos acelulares, muchas veces de carácter patógeno que actúan como parásitos biotrofos ya que necesitan de la maquinaria energética y genética de sus células huésped para poder completar su ciclo vital.

Los virus de plantas tienen una gran relevancia debido a que afectan directamente a los cultivos de cereales, frutas y verduras que conforman una gran parte de nuestra dieta diaria. Los virus, al infectar estos cultivos, provocan una reducción en su rendimiento y calidad nutricional<sup>1</sup>. Su impacto a nivel global puede provocar pérdidas de hasta el 8% de toda la producción agrícola del planeta<sup>2</sup> y pérdidas de en torno a 13 mil millones de dólares anualmente<sup>3</sup>. Estas pérdidas no sólo tienen un gran impacto económico, sino también social ya que ponen en peligro alcanzar los estándares de seguridad alimentaria de la población humana a nivel mundial, y pueden poner en peligro la supervivencia de las personas, sobre todo en países en vías de desarrollo donde una gran parte de la población vive de una agricultura de subsistencia<sup>4</sup>. Además de su impacto en la agricultura y la economía, los virus de plantas también afectan a los ecosistemas silvestres, donde su efecto sobre las especies más susceptibles se ha relacionado con la extinción local de éstas, lo que reduce la biodiversidad<sup>5</sup>.

Debido al impacto económico, ecológico y social de los virus de plantas, el desarrollo de estrategias de control y de posibles métodos de erradicación frente a estos patógenos es un tema de máxima importancia. Dentro de estas estrategias es tan importante conocer e implementar mecanismos de defensa de las plantas frente a los virus como identificar los modos principales de dispersión de éstos y desarrollar mecanismos para evitarlos o al menos minimizarlos<sup>6</sup>. Dado que tanto los mecanismos de defensa de las plantas como los de dispersión de los virus tienen un efecto directo sobre la eficacia biológica del patógeno, para que las estrategias de control sean eficaces deben tener en cuenta cómo ambos factores interactúan entre sí.

## **1.2 Métodos de defensa de las plantas**

Las plantas han desarrollado dos métodos de defensa principales frente a las infecciones de los virus y de otros patógenos. Estos dos métodos son la resistencia y la

tolerancia<sup>7</sup>.

La resistencia es la capacidad de la planta para limitar los niveles de multiplicación del patógeno<sup>7</sup>. Este tipo de respuesta puede presentarse de forma cualitativa o cuantitativa en la planta infectada. La resistencia cualitativa ha sido el método de resistencia más estudiado, ya que evita prácticamente por completo la multiplicación del virus y su implementación en variedades cultivadas es más sencilla que la de otros mecanismos de defensa. Se basa en un modelo de interacción gen a gen entre la planta y el patógeno en el cual la planta huésped debe poseer un gen de resistencia mayor (MRG) que reconozca al gen de avirulencia del virus<sup>8,9</sup>. Este reconocimiento provoca una respuesta de la planta, denominada “respuesta de hipersensibilidad”, que lleva a la localización del patógeno en el foco inicial de infección, evitando que sea capaz de propagarse y colonizar el resto de la planta. Por otro lado, la resistencia cuantitativa permite a la planta reducir los niveles de multiplicación del patógeno, pero en general no lo elimina por completo. Este tipo de resistencia ha sido menos estudiada ya que requiere la interacción de múltiples genes de resistencia con efecto menor que dotan a la planta huésped de niveles de resistencia variables<sup>8,10,11</sup>, siendo por tanto un sistema de control difícil de implementar en cultivos y una solución solamente parcial al problema. Sin embargo, suele ser el método de resistencia más usual en especies silvestres.

La tolerancia es la capacidad de la planta huésped para minimizar el efecto de la infección viral sobre su eficacia biológica a una determinada carga viral. Dado que la producción de semillas es una medida directa de la eficacia biológica de la planta, los estudios realizados hasta ahora miden en general la tolerancia como el efecto sobre este parámetro en función de la carga viral, en lo que se denomina tolerancia de fecundidad (FT). Sin embargo, la tolerancia puede manifestarse a través de otros caracteres que afectan directa o indirectamente a la eficacia biológica de la planta, por ejemplo, su esperanza de vida: cuanto mayor sea la mortalidad debida a la infección, menos tiempo tendrá la planta para producir su descendencia. La tolerancia medida como el efecto de la infección en la esperanza de vida de la planta se denomina tolerancia a la mortalidad (MT)<sup>12</sup>. Dado que la tolerancia se define como la relación entre el efecto de la infección y la carga viral, el método matemático para determinar los valores de FT y MT consiste en el cálculo de la pendiente de una regresión entre la fecundidad del huésped (número de semillas) para FT o la longevidad del huésped (días hasta senescencia) para MT y la

carga de patógeno en el huésped (concentración viral)<sup>12,13</sup>. La tolerancia generalmente tiene carácter cuantitativo y parece estar controlada por la interacción de múltiples genes que aún están por determinarse<sup>14</sup>. Aunque no se conocen los determinantes genéticos de este mecanismo de defensa, los estudios más recientes asocian la tolerancia con una posible redistribución de recursos en la planta que limita el crecimiento y prioriza la reproducción, llevando a pensar que genes implicados en procesos como la fotoasimilación o la floración podrían tener una función clave en el desarrollo de una respuesta de tolerancia frente a patógenos<sup>14</sup>.

El tipo de mecanismo de defensa que adopten las plantas huésped y el efecto que éste tenga sobre la población de los virus que las infecten, influirá en su evolución. La respuesta de resistencia impide la multiplicación del virus, aplicando una gran presión de selección sobre el patógeno y haciendo que éste trate de evolucionar hacia un genotipo capaz de superar los genes de resistencia de la planta. Mientras, la tolerancia no aplica tal presión de selección sobre el virus ya que no limita la multiplicación viral, y además genera una relación planta-patógeno en la que los genotipos tolerantes tienen una ventaja selectiva con respecto a los genotipos no tolerantes. Debido a esta co-evolución entre planta y patógeno, lo esperable es que los genes relacionados con la tolerancia tengan tendencia a fijarse en los huéspedes (siempre que el coste biológico de esa tolerancia no sea demasiado alto para el huésped) y que el patógeno no evolucione hacia una mayor virulencia<sup>13-15</sup>. Es importante destacar que FT y MT tendrían un efecto similar sobre el huésped, pero no sobre el virus, y que según cuál de estos dos caracteres se asocie con la tolerancia puede tener un impacto significativo sobre los mecanismos de dispersión del virus. Se ha propuesto que la FT favorece la producción de semillas en la planta infectada, por lo que una evolución del virus hacia el aumento en la eficacia de transmisión vertical a través de esas semillas aumentaría su eficacia biológica. Por el contrario, la MT aumenta el tiempo de la infección y favorece una transmisión horizontal mediante vectores<sup>16</sup>. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido analizada experimentalmente, lo que es el objetivo principal de este trabajo.

### **1.3 Modos de transmisión de los virus de plantas**

Los virus de plantas pueden transmitirse de planta a planta (transmisión horizontal), generalmente mediante insectos vectores o por contacto entre plantas, o desde los parentales a su progenie a través de la semilla (transmisión vertical).

El modo más común de transmisión de los virus de plantas es el modo horizontal a través de insectos vectores (principalmente pulgones), aunque algunos virus como los tobamovirus y ciertos potexvirus pueden también transmitirse por contacto<sup>17</sup>. Estos modos de transmisión generalmente limitan el área de dispersión de los virus, ya que ésta se reduce a la zona de forrajeo del insecto, que es de unas decenas de kilómetros de radio, o a las plantas adyacentes en caso de la transmisión por contacto. Muchos virus se transmiten por vectores de modo no persistente, es decir, que el vector solo permanece virulífero durante unos pocos minutos. Por tanto, la transmisión por insectos también limita el tiempo durante el que los virus pueden dispersarse<sup>18</sup>.

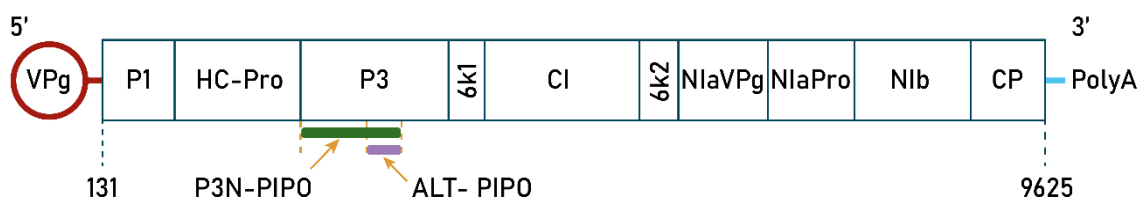
La transmisión por semilla (ST), es un modo menos común de dispersión de los virus de plantas. Aun así, más del 25% de los virus conocidos tienen esta capacidad. La ST es un modo de transmisión que incrementa la posibilidad de supervivencia de los virus, permitiendo que persistan dentro de las semillas durante largos periodos de tiempo cuando las condiciones ambientales no son favorables, cuando sus huéspedes tienen un ciclo estacional y no están presentes todo el año o cuando no pueden transmitirse horizontalmente por la ausencia de vectores<sup>19</sup>. De hecho, algunos virus pueden sobrevivir durante décadas en las semillas<sup>20</sup>. La ST también sirve a los virus como un método excepcional de propagación a larga distancia, ya que las semillas son el principal modo de movimiento de germoplasma. Algunos estudios demuestran que la transmisión por semilla ha permitido el movimiento de virus incluso a escala transcontinental<sup>21</sup>. Una vez germinan las semillas infectadas, ya sea en campos de cultivo o en ecosistemas silvestres, éstas supondrán una potente fuente de inóculo para la transmisión horizontal por vectores<sup>19</sup>. Esto puede originar la emergencia del virus y de la enfermedad que éste causa en nuevas zonas, lo cual supone un gran riesgo para las poblaciones de plantas susceptibles. Por lo tanto, el estudio de la ST toma una gran relevancia a la hora de tratar de evitar pérdidas económicas en el sector agrícola y posibles alteraciones en los ecosistemas<sup>19</sup>.

## **1.4 Sistema experimental**

### **1.4.1 El virus del mosaico del nabo**

El virus del mosaico del nabo (*Turnip mosaic virus*, TuMV) pertenece al género *Potyvirus* (Familia *Potyviridae*). Su virión está formado por una partícula tubular flexuosa que encapsida un genoma formado por una única molécula de ARN de cadena simple con

polaridad positiva y un total de 9 830 nucleótidos<sup>22,23</sup>. El genoma de TuMV tiene una proteína terminal denominada VPg en su extremo 5', una cola de adeninas (poliA) en su extremo 3' y un único origen de replicación desde el cual se codifica una poliproteína de 3 164 aminoácidos que se post-procesa para generar 10 proteínas funcionales diferentes, además de dos proteínas auxiliares: ALT-PIPO y P3N-PIPO. La organización genómica de TuMV y la función de las proteínas que su genoma codifica, se resumen en la Figura 1 y la Tabla 1<sup>24,25</sup>.



**Figura 1. Diagrama del genoma de TuMV.** 5' UTR, primera proteína (P1), componente auxiliar - proteasa (HC-Pro), tercera proteína (P3), proteína auxiliar (ALT-PIPO), proteína auxiliar (PN3-PIPO), proteína 6k1, proteína cilíndrica de inclusión (CI), proteína 6k2, proteína de la unión al genoma viral (NIaVPg), proteína pequeña de inclusión (NIaPro), proteína grande de inclusión nuclear (NIb), proteína de la cubierta (CP), 3'UTR (PolyA).

**Tabla 1.** Lista de las proteínas de TuMV y sus principales funciones.

Proteína	Función
<b>P1</b>	Serín-proteasa, replicación del virus
<b>HC-Pro</b>	Cisteín-proteasa, transmisión por pulgón, movimiento sistémico, replicación del genoma, supresión del silenciamiento por RNA
<b>P3</b>	Replicación del virus, patogenicidad
<b>P3N-PIPO</b>	Transmisión por pulgón, supresión del silenciamiento por RNA
<b>ALT-PIPO</b>	Transmisión por pulgón, supresión del silenciamiento por RNA
<b>6k1</b>	Replicación del virus
<b>CI</b>	Replicación del virus, movimiento célula a célula
<b>6k2</b>	Replicación del virus
<b>NIaVPg</b>	Replicación del virus, movimiento a larga distancia del virus, proceso de translación
<b>NIaPro</b>	Serín-proteasa
<b>NIb</b>	RNA polimerasa dependiente de RNA
<b>CP</b>	Ensamblado del virión, transmisión por pulgón, movimiento célula a célula

TuMV es el principal patógeno de las especies pertenecientes al género *Brassica*, siendo capaz de transmitirse a través de 89 especies de pulgones y de infectar más de 300 especies de plantas diferentes, entre las cuales hay importantes cultivos del sector de la agricultura<sup>22,26</sup>. De entre los múltiples aislados de TuMV que han sido caracterizados genéticamente y biológicamente, los más utilizados para el estudio de las respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana* han sido JPN 1 y UK 1<sup>27</sup>. Estos dos aislados tienen un origen diferente (JPN 1: Rábano en Japón y UK 1: Colza en Reino Unido). Para el propósito de este trabajo, es importante destacar que también varían en su virulencia en *A. thaliana*, que es mayor en UK 1.

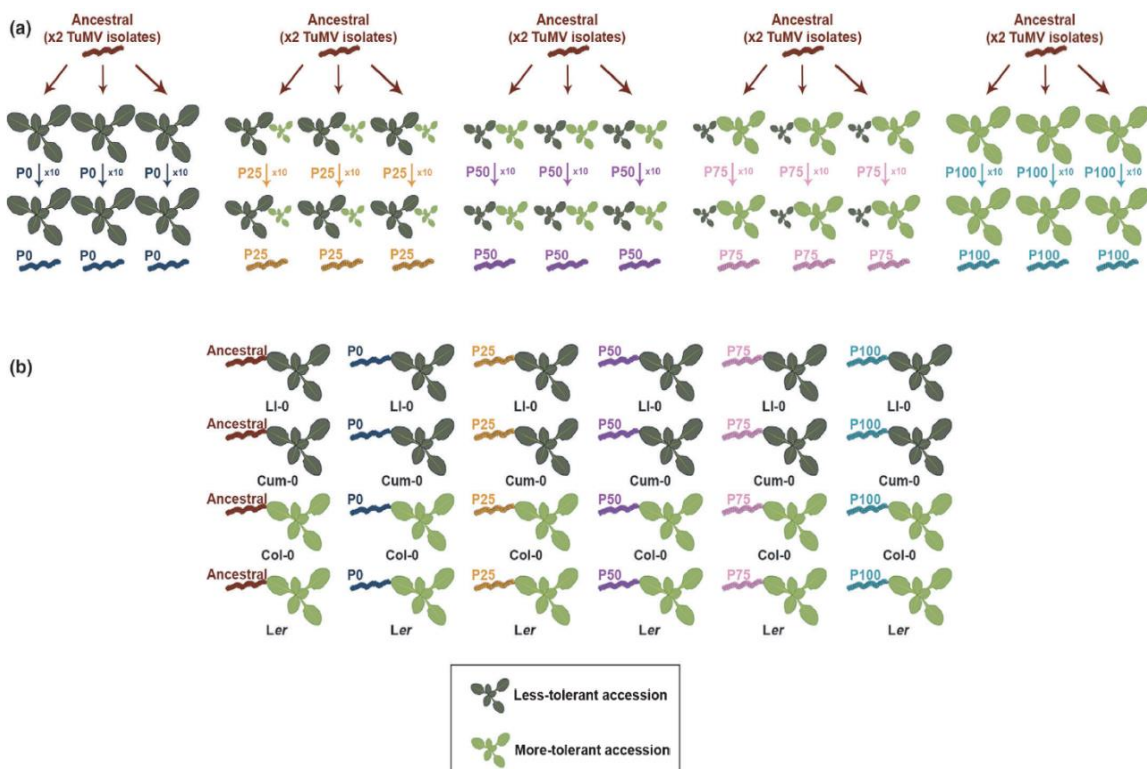
#### 1.4.2 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (de ahora en adelante *Arabidopsis*) es una planta anual, angiosperma, dicotiledónea, con cinco cromosomas, diploide, perteneciente a la familia *Brassicaceae* y cuyo ciclo vital, aunque varía según el genotipo, suele encontrarse entre los 30 y los 120 días<sup>28,29</sup>. En los últimos 20 años *Arabidopsis* se ha utilizado como el organismo modelo por excelencia para el estudio molecular y genético de la biología de plantas, incluyendo las interacciones planta-patógeno<sup>28</sup>. Esto es gracias a que en el año 2000 se convirtió en la primera planta cuyo genoma completo fue secuenciado<sup>30</sup> y su gran cantidad de ventajas para ser una planta objeto de estudio (tamaño pequeño, ciclo corto, genoma relativamente sencillo). Para el propósito de este Trabajo Fin de Grado, hay que destacar también que TuMV es un patógeno natural de *Arabidopsis* y que el gran número de semillas que produce la planta facilita la cuantificación de la transmisión por semilla incluso cuando la eficacia es baja. Además, sus respuestas de resistencia y tolerancia ante tal infección han sido bien caracterizadas<sup>22</sup>.

*Arabidopsis* es originaria de Eurasia y el norte de África<sup>31</sup>, sin embargo, gracias a su gran capacidad de adaptación, hoy en día se encuentra en climas templados por todo el globo y tiene una amplia diversidad genética con hasta 6 000 genotipos diferentes<sup>32</sup>. Esta diversidad genética facilita el análisis y estudio de los procesos evolutivos y adaptativos tanto de la propia *Arabidopsis* como de sus posibles parásitos. Este trabajo se ha beneficiado de esa diversidad genética utilizando genotipos que presentan diferentes respuestas frente a la infección por TuMV. De esta forma *Arabidopsis* es un magnífico sistema modelo para este Trabajo de Fin de Grado.

## 1.5 Antecedentes de este Trabajo de Fin de Grado

Las semillas de *Arabidopsis* infectadas con 40 linajes de TuMV empleadas para llevar a cabo este TFG se tomaron de un experimento previo llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Pagán<sup>33</sup>, en el que se emplearon poblaciones de *Arabidopsis* construidas a partir de genotipos con diferentes niveles de tolerancia. Se utilizaron los genotipos LI-0 (Llagostera, España) y Col-0 (Columbia, desconocido) que son no tolerantes y tolerantes, respectivamente, a la infección por TuMV. Usando diferentes proporciones de plantas de LI-0 y Col-0, se construyeron poblaciones con 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de plantas tolerantes. Se realizaron 10 pases seriados de dos aislados diferentes de TuMV (JPN 1 y UK 1) para simular un proceso evolutivo de los virus en diferentes condiciones de tolerancia. De esta forma, se pudieron observar alteraciones en diferentes factores relacionados con la infección, como la FT y la MT, en los linajes de TuMV evolucionados<sup>33</sup>. Sin embargo, este trabajo no analizó si estas alteraciones tenían consecuencias en la eficacia de transmisión por semilla de los virus. Este es el objetivo de este TFG.



**Figura 2. Diseño del experimento previo a este TFG<sup>33</sup>.** (a) Se realizaron 10 pases seriados de dos aislados de TuMV (JPN 1 y UK 1) en poblaciones de *Arabidopsis* con diferentes niveles de tolerancia (P0, P25, P50, P75, P100), representados mediante el tamaño y color de las plantas. Se generaron tres linajes por población. (b) Los linajes virales evolucionados junto con los linajes ancestrales se inocularon en plantas de dos genotipos tolerantes (Col-0 y Ler) y de dos genotipos no tolerantes (Cum-0 y LI-0). Las plantas de las poblaciones Ancestral, P0 y P100 produjeron las semillas empleadas en este TFG. Extraído de <sup>30</sup>.

## **CAPÍTULO 2: OBJETIVOS**

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es emplear el sistema modelo formado por TuMV como patógeno y *Arabidopsis thaliana* como huésped para:

- Estudiar cómo se comportan los niveles de transmisión por semilla de TuMV al verse sometido a evolución en poblaciones tolerantes y no tolerantes de *Arabidopsis*.
- Estudiar cómo se relacionan los niveles de transmisión por semilla y la presencia predominante de tolerancia de fecundidad o tolerancia a la mortalidad como mecanismo de defensa.
- Estudiar cómo se relacionan los niveles de transmisión por semilla y otros caracteres de la infección.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Material biológico

#### 3.1.1 Genotipos virales

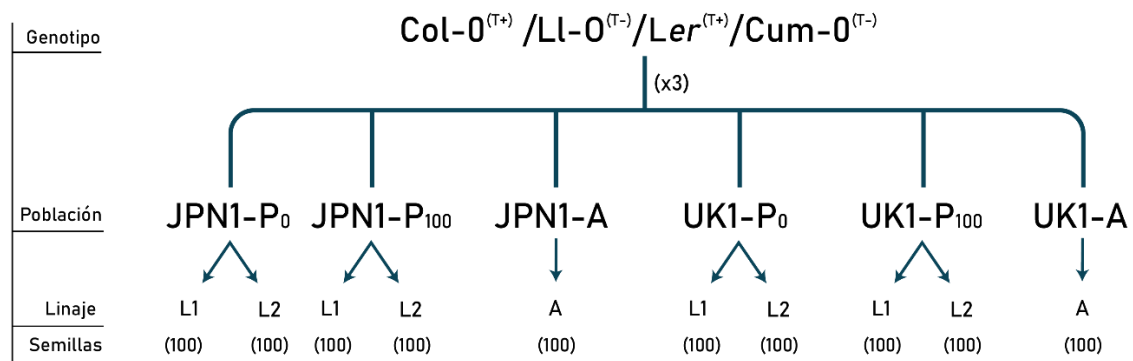
Se emplearon 40 linajes diferentes de TuMV, evolucionados en un experimento previo del Dr. Pagán<sup>33</sup> a partir de los aislados virales: JPN 1-TuMV (acc. no. AB194820) y UK 1-TuMV (acc. no. KM094174). El aislado original de JPN 1-TuMV (JPN1) procede de una planta de nabo (*Raphanus sativus*, Brassicaceae) que se recolectó en Japón, mientras que el aislado original de UK 1-TuMV (UK1) procede de una planta de colza (*Brassica napus*, Brassicaceae) de Reino Unido<sup>34</sup>.

#### 3.1.2 Genotipos del huésped

Se emplearon cuatro genotipos de Arabidopsis: Col-0, Cum-0, Ler y Ll-0. Los genotipos Col-0 (tolerante) y Ll-0 (no tolerante) se eligieron en base a que fueron los que se emplearon para construir las poblaciones en las que se evolucionaron previamente los linajes de TuMV<sup>33</sup>. Por otro lado, Cum-0 y Ler se escogieron porque presentan niveles de tolerancia diferentes (Cum-0: no tolerante; Ler: tolerante) y no se emplearon para generar las poblaciones en las que se realizaron los pases seriados. Esto permitió explorar si los efectos que el proceso evolutivo tuvo en los linajes de TuMV se debían a una adaptación a los genotipos en los que realizaron los pases o a una adaptación más general al tipo de mecanismo de defensa del huésped<sup>33</sup>.

### 3.2 Diseño experimental

En este experimento se buscó analizar la eficacia de transmisión por semilla de TuMV en las plántulas que germinaron a partir de las semillas de cuatro genotipos diferentes de Arabidopsis, procedentes de plantas infectadas con los 40 linajes diferentes de TuMV (5 linajes x 2 aislados de virus x 4 genotipos de huésped) (Figura 3). Por cada uno de los cuatro genotipos de Arabidopsis se analizaron semillas de tres poblaciones de plantas: las infectadas con el virus ancestral, las infectadas con el virus evolucionado en P0 y las infectadas con el virus evolucionado en P100. Para las semillas evolucionadas se analizaron dos linajes diferentes en cada caso, y lógicamente solo uno para las semillas infectadas con el ancestral (total de 5 linajes). Este diseño se repitió para cada uno de los dos virus. En cada caso se sembraron 100 semillas por réplica y tres réplicas por tratamiento. En total, se analizaron 12000 semillas (Figura 3).



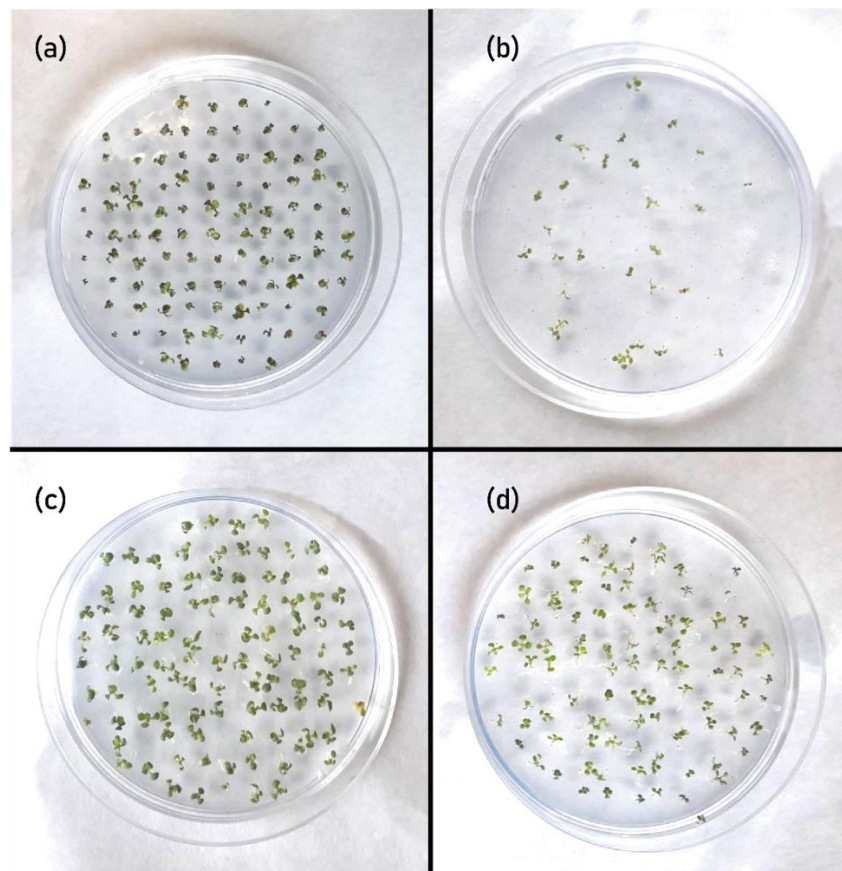
**Figura 3. Diagrama del diseño experimental.** Genotipos de Arabidopsis empleados, poblaciones que se analizaron para cada genotipo, linajes virales (L: linaje evolucionado; A: Ancestral) que infectaban cada población y cuántas semillas se emplearon en cada población (entre paréntesis). En cada caso se realizaron muestras por triplicado.

### 3.2.1 Germinación de las semillas y recolección de plántulas

Las semillas del experimento se prepararon para su germinación con un procedimiento previo de esterilización; en el cual se lavaron con hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, se aclararon tres veces con agua y se secaron en papel de filtro estéril. Tras esto, las semillas se sembraron en placas de Petri (100 semillas en cada una) con medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) y se sometieron a un proceso de estratificación en oscuridad a 4°C durante una semana. Posteriormente, se introdujeron en una cámara de cultivo a 22°C, con humedad relativa de entre 65 y 70% y con 16 horas diarias de iluminación a una intensidad de 220 a 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Una vez concluido este proceso se recogieron todas las plántulas que habían germinado dentro de tubos Eppendorf de 1,5 ml, en grupos de cuatro plántulas por tubo. Cada uno de los tubos Eppendorf se trató como una única muestra. Se sembraron 12000 semillas en total, de las cuales se esperaban recoger 3000 muestras. Sin embargo, al no ser la tasa de germinación del 100% en todos los casos (Tabla 2 y Figura 4) se recogiendo un total de 2511 muestras.

**Tabla 2. Porcentajes de germinación de las semillas (%).**

Genotipo	Aislado viral	Media
<b>Col-0</b>	JPN1	94
	UK1	96
<b>Cum-0</b>	JPN1	34
	UK1	27
<b>Ler</b>	JPN1	82
	UK1	91
<b>LI-0</b>	JPN1	89
	UK1	84



**Figura 4. Placas Petri de los diferentes genotipos.** (a) Placa Petri con 100 semillas germinadas de Col-0 (b) Placa Petri con 29 semillas germinadas de Cum-0. (c) Placa Petri con 99 semillas germinadas de Ler. (d) Placa Petri con 94 semillas germinadas de LI-0.

### 3.2.2 Cuantificación de la transmisión por semilla

Para determinar el porcentaje de transmisión por semilla (ST) del virus se detectó el ARN viral en cada uno de los tubos Eppendorf mediante una retrotranscripción seguida de una PCR cuantitativa (qRT-PCR), determinando así la presencia o ausencia del virus en cada una de las muestras. El primer paso en este proceso fue la obtención de los extractos de ARN total para cada una de las muestras. Para esta extracción se empleó TRIzol<sup>®</sup>, una extracción con fenol-cloroformo, una precipitación con etanol absoluto y una resuspensión final en agua. Tras la extracción, el ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop, midiendo para ello las razones de absorción de luz a 260/280nm y 260/230nm. También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2% para comprobar la integridad del ARN. Una vez conocidas las concentraciones e integridad del ARN en cada una de las muestras, estas se diluyeron para que todas tuviesen una concentración de ARN total de 25ng/μl. Por último, empleando dos microlitros de esas diluciones y ‘One Step TB Green PrimerScript RT-PCR Kti II (Perfect Real Time)’ (Takara Bio, Francia) se llevó a cabo una retrotranscripción (50°C durante 10 min seguido de 95°C durante 5 seg) y una posterior qPCR acoplada (40 ciclos de 10 seg a 95°C y 20 seg a 60°C, seguido de 30 seg a 95°C y 1 min a 60°C). Para la qPCR se emplearon los cebadores 5'-TGTTTCGGCTTGGATGGAA-3'(F) y 5'-TTAACGTCCTCGGTCGTATGC-3'(R), que permiten amplificar un fragmento de 70 nucleótidos perteneciente al gen de la cápsida (CP) de TuMV<sup>35</sup>. Estos cebadores están diseñados sobre la secuencia de UK1, pero permiten amplificar el mismo fragmento de JPN1 con igual eficacia<sup>30</sup>. Como controles positivos se emplearon extractos de ARN total de plantas para las que ya se había verificado la infección por UK1, y como controles negativos extractos de plantas no infectadas.

### 3.3 Análisis estadístico

Para el manejo de los datos de transmisión viral por semilla se empleó Excel (Microsoft, Versión 2013) y para su posterior análisis estadístico se empleó R (2021, R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. Versión 4.0.5) y SPSS (IBM SPSS Statistics, Versión 21).

#### 3.3.1 Estimación de la transmisión por semilla

ST se calculó para cada uno de los linajes virales, teniendo en cuenta que en cada

muestra que se analizó había cuatro plántulas y podría haber más de una infectada. Para estimar la probabilidad de que más de una planta estuviera infectada, se empleó una aproximación a una distribución de Poisson mediante la expresión  $p=1-(1-y/n)^{1/k}$  donde 'p' es la probabilidad de transmisión del virus en una única semilla, 'y' es el número de muestras positivas, 'n' es el número de muestras totales por linaje, y 'k' es el número de plántulas que hay en cada muestra<sup>36</sup>.

### 3.3.2 Análisis multivariantes

Los datos de ST se sometieron a los test de Shapiro-Wilk y Levene, y éstos no indicaron normalidad ni homogeneidad de varianzas de la variable, respectivamente. Por lo tanto, para analizar las diferencias entre linajes virales en su eficacia de transmisión por semilla los datos se analizaron empleando modelos lineales generalizados (GzLM) y una distribución gaussiana inversa, que se determinó como la distribución a la que mejor se ajustaban los datos. Para realizar los GzLM se empleó el paquete de R *lme4*<sup>37</sup>, y para determinar la distribución que mejor se ajustaba a los datos de ST el paquete *rriskDistributions*<sup>38</sup>; con ajustes manuales para comparar los resultados del paquete con los de una distribución gaussiana inversa. Los GzLM Se llevaron a cabo tanto con el conjunto completo de datos, para estudiar el comportamiento global del sistema, como con los ocho subconjuntos resultantes de la combinatoria entre genotipos de huésped y aislados virales, que permitieron analizar cada ambiente evolutivo por separado. El soporte estadístico para todos los GzLM se obtuvo aplicando el estadístico de chi-cuadrado de Wald, que se aplica típicamente en este tipo de análisis<sup>39</sup>.

### 3.3.3 Análisis de la relación entre la eficacia de transmisión por semilla y otros caracteres de la infección

Se analizó la asociación entre los cambios en la eficacia de transmisión por semilla en los linajes evolucionados y alteraciones de otros caracteres de la infección. Concretamente, se consideraron los efectos de la infección en: (i) variables fenológicas tales como el periodo vegetativo (*GP*) definido como el tiempo que va desde el trasplante de la planta hasta la apertura de la primera flor; el periodo reproductivo (*RP*) definido como el tiempo dese la apertura de la primera flor hasta la maduración de la primera silicua y que delimita el periodo de producción de flores; el periodo post-reproductor (*PRP*) definido como el tiempo que transcurre desde la primera silicua madura hasta que

la planta senesce completamente, y el periodo de vida (*LP*) como la suma de los tres periodos anteriores. Todas estas variables se midieron en días. (ii) Variables de crecimiento y reproducción tales como el peso de la roseta (*RW*), el peso de la inflorescencia (*IW*), el peso de las semillas (*SW*) y la acumulación viral (*VA*) mediada como ng de ARN viral por  $\mu\text{g}$  de ARN total. Adicionalmente, se analizó la variación en los niveles de FT (tolerancia de fecundidad) y MT (tolerancia a la mortalidad), los cuales se calcularon como la pendiente resultante de una regresión lineal entre la acumulación viral y *SW* o *LP*, respectivamente<sup>15,40</sup>. El efecto de la infección en todos estos parámetros se cuantificó como la razón entre el valor del parámetro en las plantas infectadas y en las plantas control, de modo que valores cercanos a 1 indicaban un efecto pequeño y valores cercanos a 0 un efecto grande. Los valores de estos parámetros se extrajeron de las plantas de las que derivaban las semillas usadas en este TFG, disponibles en el grupo del Dr. Pagán<sup>33</sup>.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1 Efecto de la evolución de TuMV sobre la transmisión por semilla

Los niveles de ST se calcularon en base a la presencia o ausencia de ARN viral en las muestras, y empleando una distribución de Poisson para tener en cuenta que en cada una de las muestras podría haber más de una única plántula infectada.

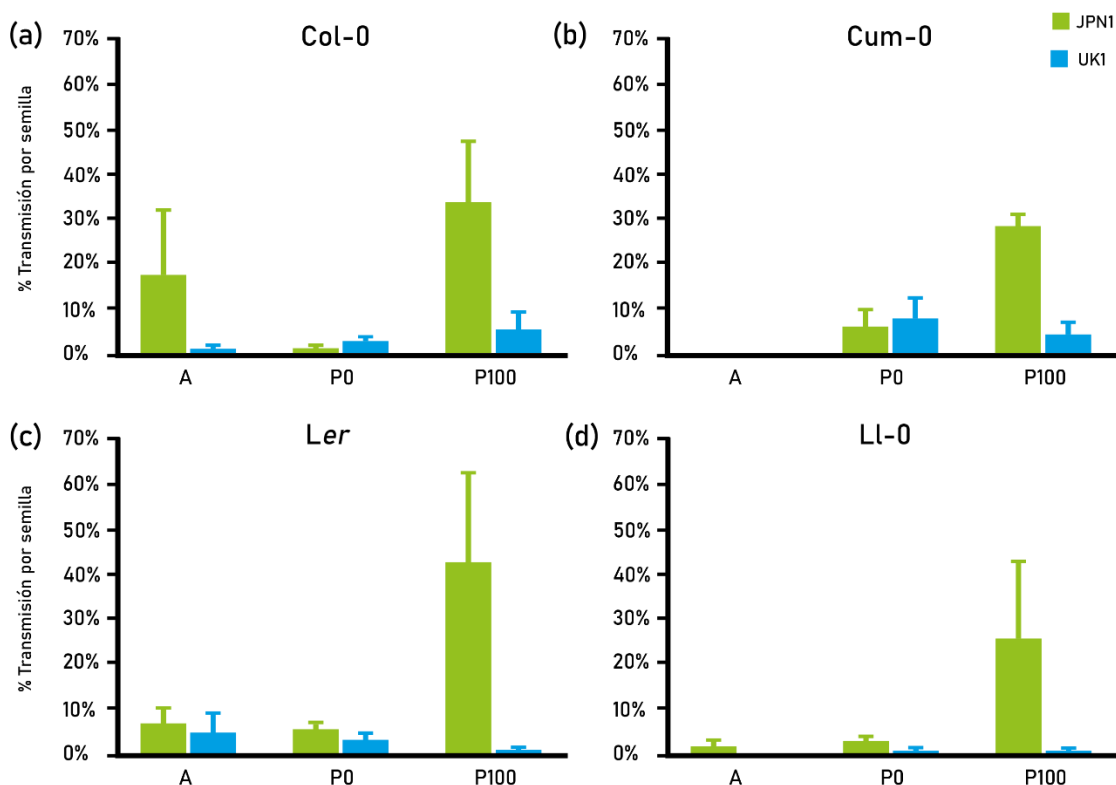
Los análisis GzLM considerando genotipo del huésped, aislado viral y población en la que se evolucionó el virus como factores, se realizaron sobre el conjunto completo de datos, indicando que ST se vio influida por el aislado viral (JPN1 o UK1, Wald  $\chi^2=387.90$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ) y por la población en la que evolucionó el virus (Ancestral, P0 o P100, Wald  $\chi^2=376.63$ ;  $P=0.020$ ). La eficacia de transmisión por semilla fue mayor para JPN1 que para UK1, y también fue mayor en los linajes evolucionados en las poblaciones P100 (todas las plantas tolerantes) que en los evolucionados en poblaciones P0 o que los virus ancestrales (Tabla 3). Además, se observó una interacción significativa entre genotipo de huésped y población (Wald  $\chi^2=323.73$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ), así como entre aislado viral y población en la que éste se evolucionó (Wald  $\chi^2=268.55$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ).

**Tabla 3.** Parámetros estadísticos globales de ST (%).

Factor	Clase	Media	Error estándar
<b>Aislado viral</b>			
	UK1	3.15	0.76
	JPN1	15.01	3.50
<b>Genotipo de planta</b>			
	Col-0	10.85	3.70
	Cum-0	6.08	1.84
	Ler	11.50	4.75
	Ll-0	6.69	3.68
<b>Población de evolución</b>			
	Ancestral	4.98	2.06
	P0	3.64	0.81
	P100	16.72	4.31

Los dos tipos de interacciones significativas observadas indicaron que el efecto de la evolución viral sobre la transmisión por semilla dependía de la combinación entre genotipo de planta, aislado de virus y población en la que éste se evolucionó. Por ello, se

analizaron las diferencias en transmisión por semilla entre linajes derivados de cada población en las que se evolucionó el virus (el factor común a las dos interacciones) para cada combinación de genotipo de planta y aislado viral por separado (Figura 5). Los GzLM correspondientes indicaron la existencia de diferencias significativas entre virus derivados de JPN1 evolucionados en diferentes poblaciones del huésped en los cuatro genotipos de *Arabidopsis* utilizados: Col-0 (Wald  $\chi^2=5 \times 10^9$ ;  $P=0.010$ ), Cum-0 (Wald  $\chi^2=4 \times 10^9$ ;  $P<1 \times 10^{-4}$ ), *Ler* (Wald  $\chi^2=1 \times 10^9$ ;  $P=7 \times 10^{-4}$ ) y Ll-0 (Wald  $\chi^2=4 \times 10^9$ ;  $P<1 \times 10^{-4}$ ). En todos los casos, la eficacia de transmisión por semilla fue mayor en los virus evolucionados en P100 que en P0 o que el ancestral, que no difirieron entre sí (Figura 5). En el caso de los virus derivados de UK1, solo se observaron diferencias significativas en los dos genotipos no tolerantes: Cum-0 (Wald  $\chi^2=5 \times 10^9$ ;  $P<1 \times 10^{-4}$ ) y Ll-0 (Wald  $\chi^2=4 \times 10^9$ ;  $P<1 \times 10^{-4}$ ); mientras que no se encontraron diferencias significativas en los dos genotipos tolerantes: Col-0 (Wald  $\chi^2=5 \times 10^9$ ;  $P=0.260$ ) y *Ler* (Wald  $\chi^2=8 \times 10^9$ ;  $P=0.298$ ). En Cum-0, ST fue mayor en los aislados evolucionados en P0, mientras que en Ll-0 ambos tipos de aislados evolucionados mostraron mayor ST que el ancestral (Figura 5).

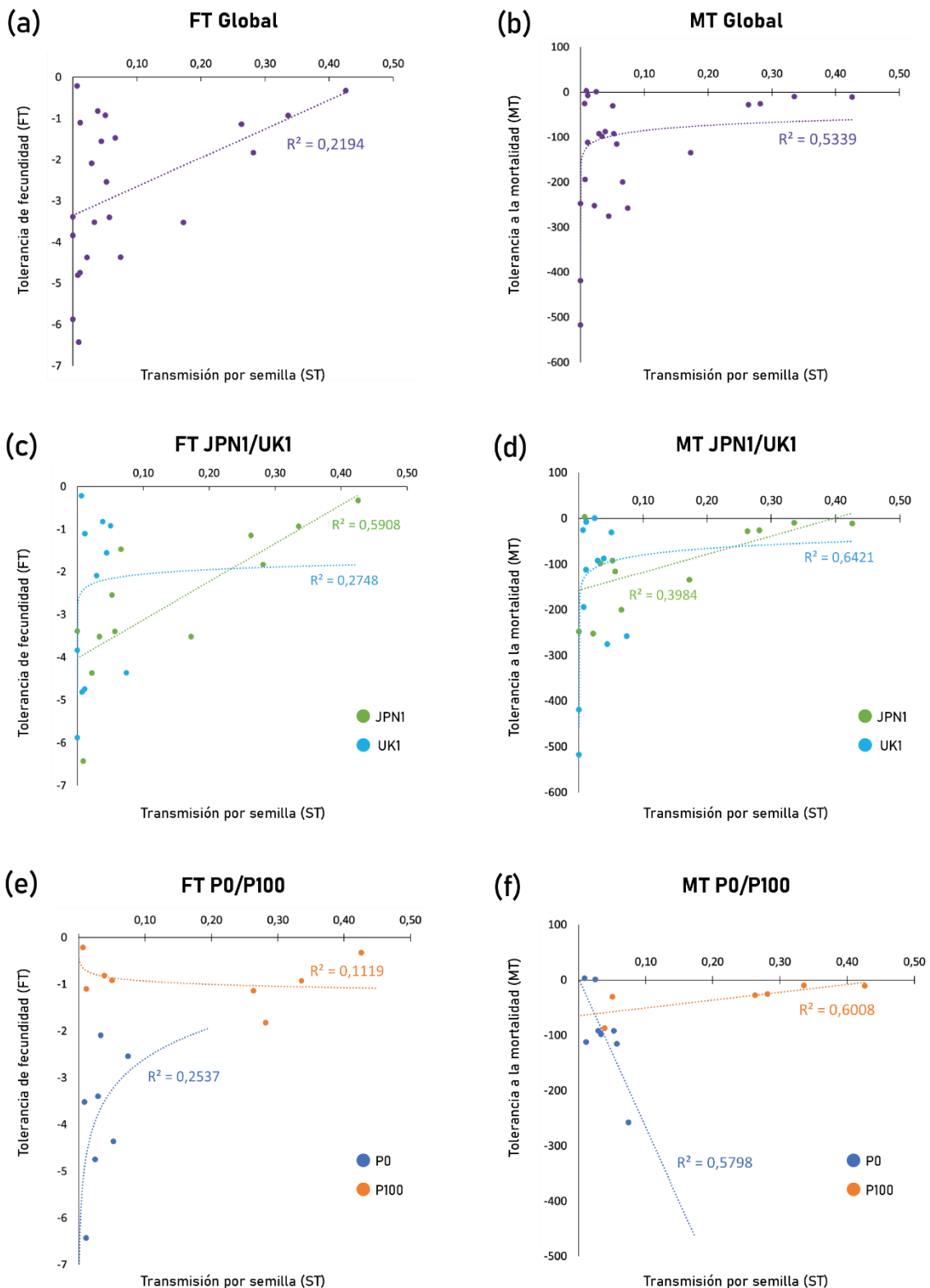


**Figura 5. Niveles de transmisión por semilla según la población en la que se evolucionó el virus.** Las barras de las gráficas muestran la media del porcentaje de transmisión por semilla  $\pm$  error estándar obtenido en Col-0 (a), Cum-0 (b), *Ler* (c) y Ll-0 (d) según la historia evolutiva del aislado viral: A (ancestral), P0 (ambiente con 0% de tolerantes) o P100 (ambiente con 100% de tolerantes); para ambos aislados virales JPN1 (verde) y UK1 (azul). La media se calculó en base a tres réplicas.

## 4.2 Asociación entre la eficacia de transmisión por semilla y la tolerancia a la infección por TuMV

Los resultados obtenidos en el apartado anterior sugieren que el incremento en la transmisión por semilla está asociado a un mayor nivel de tolerancia en la población del huésped. Para analizar si esto era efectivamente así, se realizaron análisis de regresión entre la eficacia de transmisión por semilla de cada linaje (ST) y los correspondientes valores de tolerancia (FT y MT) en las plantas. Para este análisis, se consideraron tanto regresiones lineales, como no lineales (logarítmicas, logísticas y exponenciales). En los resultados que se muestran a continuación solo se hace referencia al tipo de regresión que indicó una asociación más fuerte entre las variables analizadas, de haber alguna asociación significativa.

Cuando se consideraron todos los datos de ST en conjunto, se observó una asociación lineal significativa entre ST y FT ( $R^2=0.21$ ;  $P=0.031$ ) y una de tipo logarítmico entre ST y MT ( $R^2=0.53$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ) (Figura 6a y 6b). De acuerdo con los resultados del apartado 4.1, esta asociación fue positiva en ambos casos, indicando que una mayor tolerancia favorece la transmisión por semilla. Cuando se analizó cada uno de los aislados virales por separado, se observó una asociación lineal significativa entre ST y FT para JPN1 ( $R^2=0.59$ ;  $P=0.003$ ) y una asociación logarítmica entre estas dos variables para UK1 ( $R^2=0.27$ ;  $P=0.18$ ). De igual manera, para JPN1 MT se asoció linealmente con ST ( $R^2=0.39$ ;  $P=0.028$ ) y para UK1 esta asociación fue logarítmica ( $R^2=0.64$ ;  $P=0.001$ ). De nuevo, todas estas asociaciones fueron positivas (Figura 6c y 6d). Por último, cuando se analizaron por separado los linajes evolucionados en cada población huésped, no se observó asociación significativa entre ST y FT ni para los aislados evolucionados en P0 ( $R^2=0.25$ ;  $P=0.250$ ) ni para los evolucionados en P100 ( $R^2=0.11$ ;  $P=0.420$ ). Por otro lado, ST y MT se asociaron linealmente en los linajes derivados de poblaciones P0 ( $R^2=0.58$ ;  $P=0,028$ ) y P100 ( $R^2=0.60$ ;  $P=0.040$ ). En el caso de los linajes P0 la asociación fue negativa, y en el de los linajes P100 positiva (Figura 6e y 6f).

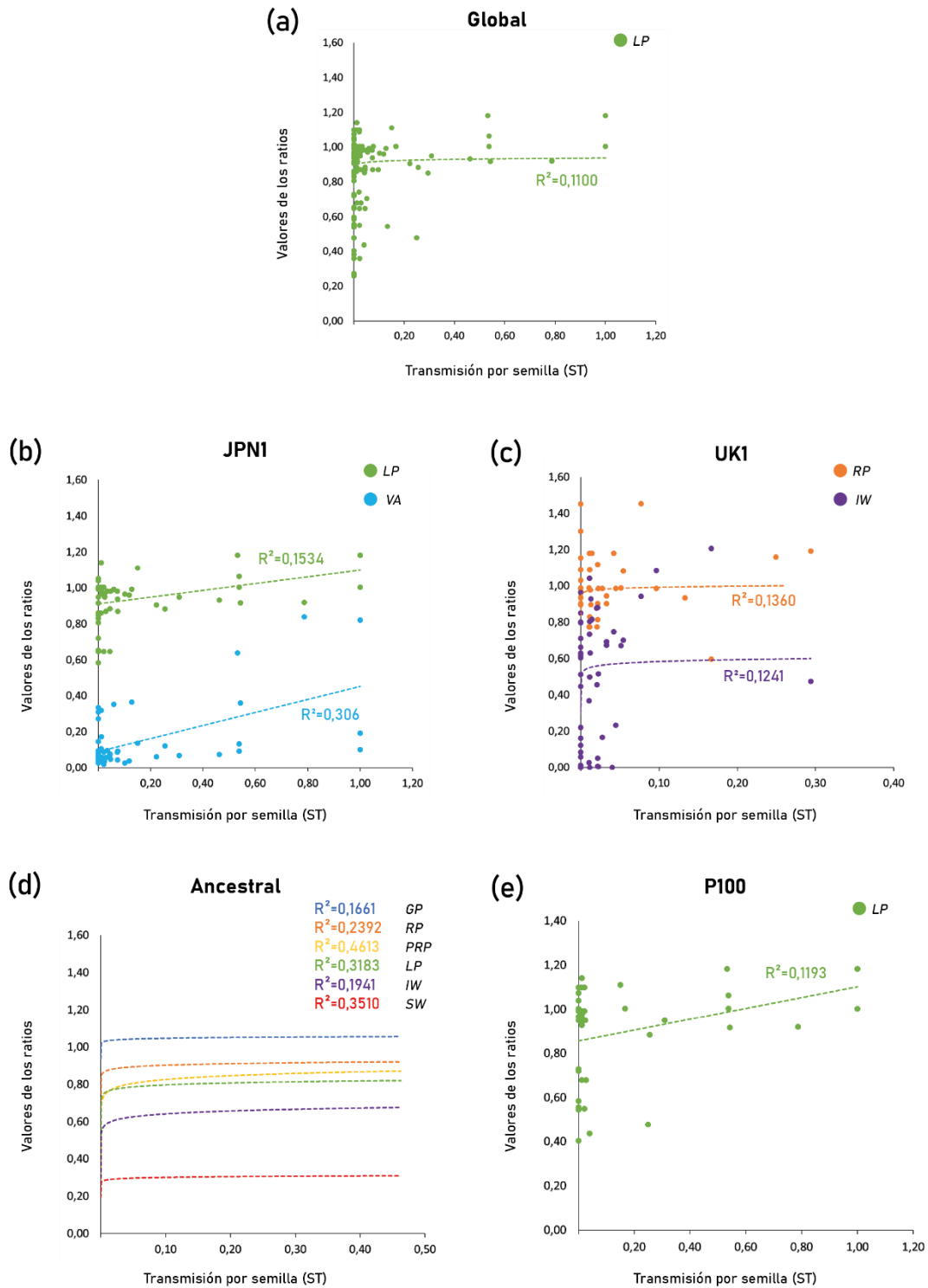


**Figura 6. Graficas de regresión entre la eficacia de transmisión por semilla y los caracteres fenotípicos FT Y MT.** (a) Regresión lineal entre ST y FT para el conjunto global de datos. (b) Regresión logarítmica entre ST y MT para el conjunto global de datos. (c) Regresiones entre ST y FT para cada uno de los aislados virales. (d) Regresiones entre ST y MT para cada uno de los aislados virales. (e) Regresiones entre ST y FT según la población de evolución. (f) Regresiones entre ST y MT según la población de evolución. Cada panel tiene escalas distintas dependiendo de las variables comparadas. Aislados virales: JPN1 (azul) y UK1 (naranja). Tratamientos evolutivos: P0 (azul) y P100 (naranja).

### 4.3 Asociación entre la eficacia de transmisión por semilla y caracteres de la infección

Trabajos previos en el grupo de Dr. Pagán indicaron que la eficacia de transmisión por semilla se relaciona con otros caracteres de la infección (acumulación viral, efecto de la infección sobre el crecimiento de la planta o sobre su capacidad reproductora)<sup>33</sup>. Por ello, se analizó si estas interacciones se mantenían en las condiciones en las que se había evolucionado el virus en el experimento descrito en la Figura 2. Para ello, se realizaron análisis de regresión entre ST de cada linaje y los valores correspondientes de acumulación viral y del efecto de la infección en variables fenológicas (*GP*, *RP*, *PRP*, *LP*) y de crecimiento/reproducción (*RW*, *IW*, *SW*) (ver Material y Métodos). Durante el análisis se consideraron nuevamente regresiones lineales, logarítmicas, logísticas y exponenciales, y aquí solamente se hace referencia al tipo de regresión que mostró una asociación mayor entre las variables, siempre que ésta sea significativa.

Al considerarse el conjunto global de todos los datos de ST, únicamente se observó una asociación logarítmica significativa de carácter positivo entre ST y *LP* ( $R^2=0.11$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ) (Figura 7a). Al analizar los datos de cada uno de los aislados virales por separado, se observó como para JPN1 ST presentaba asociaciones lineales significativas con *LP* ( $R^2=0.15$ ;  $P=0.003$ ) y con la acumulación viral ( $R^2=0.31$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ), mientras que para UK1 ST presentaba asociaciones logarítmicas significativas, aunque débiles, con *RP* ( $R^2=0.14$ ;  $P=0.004$ ) e *IW* ( $R^2=0.12$ ;  $P=0.008$ ). Para ambos aislados virales estas asociaciones fueron positivas (Figura 7b y 7c). Para terminar, se analizaron los datos de ST para los linajes evolucionados en cada población de huésped y para el linaje ancestral. Se observó que para el linaje ancestral ST se asoció logarítmica y positivamente con *GP* ( $R^2=0.17$ ;  $P=0.043$ ), *RP* ( $R^2=0.24$ ;  $P=0.013$ ), *PRP* ( $R^2=0.46$ ;  $P<1\times 10^{-4}$ ), *LP* ( $R^2=0.32$ ;  $P=0.003$ ), *IW* ( $R^2=0.19$ ;  $P=0.038$ ) y *SW* ( $R^2=0.35$ ;  $P=0.002$ ), mientras que en los linajes evolucionados en poblaciones P0 no se encontró ninguna asociación significativa y en los evolucionados en P100 solamente se observó una asociación lineal entre ST y *LP* ( $R^2=0.12$ ;  $P=0.023$ ) de carácter positivo (Figura 7d y 7e).



**Figura 7. Graficas de la regresión entre la eficacia de transmisión por semilla y varios caracteres de la infección.** (a) Regresión logarítmica entre ST y LP para el conjunto global de datos. (b) Regresiones lineales entre ST y los caracteres LP (azul) y VA (naranja) para el aislado viral JPN1. (c) Regresiones logarítmicas entre ST y los caracteres RP (azul) e IW (naranja) para el aislado viral UK1. (d) Regresiones logarítmicas entre ST y los caracteres GP (azul), RP (naranja), PRP (verde), LP (amarillo), IW (morado) y SW (rojo) para el virus ancestral. (e) Regresión lineal entre ST y LP (azul) para los linajes evolucionados en población P100. Los paneles tienen escales distintas dependiendo de los caracteres comparados. En el panel (d) únicamente se representan las líneas de tendencia de la regresión, ya que la gran cantidad de puntos (valores) impedía apreciar la comparativa entre las diferentes tendencias.

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

La resistencia y la tolerancia son los principales mecanismos de defensa de las plantas frente a los patógenos. Sus implicaciones y consecuencias sobre la evolución y la epidemiología de los patógenos han sido ampliamente estudiadas para la resistencia. Estos aspectos han sido menos estudiados en el caso de la tolerancia, a pesar del número creciente de evidencias que indican que la tolerancia es tan importante como la resistencia como defensa de las plantas<sup>14,15</sup>. Este Trabajo Fin de Grado explora cómo la adaptación de los virus de plantas a la tolerancia de sus huéspedes afecta a uno de los modos principales de dispersión de estos patógenos como es la transmisión por semilla.

El primer resultado relevante de este trabajo es que los dos aislados utilizados presentan una eficacia de transmisión por semilla diferente, tanto si los datos se analizan en su conjunto (Tabla 3) o separándolos en función del genotipo de huésped (Figura 5). En *Arabidopsis*, la virulencia de UK1 es mucho mayor que la de JPN1. De hecho, en muchos genotipos la infección por UK1 causa malformaciones graves de flores y silicuas lo que hace que las plantas infectadas produzcan un número muy bajo de semillas y que parte de éstas sean inviables (ausencia de germinación)<sup>12,27</sup>. Por el contrario, JPN1 tiene un efecto moderado sobre la producción de progenie de *Arabidopsis* y en general casi todas las plantas infectadas producen semillas viables<sup>12,27</sup>. Como consecuencia, se ha propuesto que UK1 actúa como un parásito castrante. Los parásitos castrantes se definen como aquellos que evitan que su huésped dedique recursos a reproducirse forzándole a dedicarlos a crecer y sobrevivir<sup>41</sup>. La consecuencia directa de este proceso de castración es por tanto que aumentan los recursos disponibles para que el parásito se multiplique y aumenta la duración del periodo infeccioso a costa de no producir progenie. Por tanto, la castración parasítica se considera una adaptación extrema para optimizar la eficacia de transmisión horizontal<sup>42</sup>. Nuestros resultados son coherentes con esta visión ya que: (i) UK1 tiene una eficiencia baja de transmisión por semilla, mientras que JPN1 la tiene mayor; y (ii) como se mencionaba anteriormente, UK1 reduce mucho más la producción de semillas que JPN1. Por tanto, la componente de la eficacia biológica de JPN1 que se debe a la transmisión vertical (medida por el número de semillas infectadas, es decir, la combinación de eficacia de transmisión y virulencia) es mayor que en UK1.

El segundo resultado relevante es que el tipo de defensas presentes en la población del huésped afecta a la evolución de la eficacia de transmisión por semilla de los virus.

En concreto, los linajes virales evolucionados en poblaciones formadas por 100% de individuos tolerantes a la infección presentaron una mayor eficacia de transmisión por semilla que los virus ancestrales y que los linajes evolucionados en poblaciones 100% no tolerantes. Datos previos obtenidos en el grupo del Dr. Pagán indicaron que la evolución de los dos aislados de TuMV en poblaciones 100% tolerantes aumenta todavía más el nivel de tolerancia de la planta (MT y FT) y también el de multiplicación viral. Por el contrario, la evolución del virus en poblaciones no tolerantes resulta en incrementos modestos de la tolerancia y reduce significativamente la acumulación viral<sup>33</sup>. Estos resultados previos, unidos a los obtenidos en este TFG sugieren que la tolerancia y la transmisión por semilla se relacionan positivamente, posibilidad que los análisis de regresión realizados en este TFG corroboran (Figura 6). Por tanto, los datos de este trabajo apoyan la hipótesis de que una mayor tolerancia del huésped favorece un aumento en la eficacia de transmisión por semilla.

Esta relación se observó tanto para MT como para FT, por lo que ambos tipos de tolerancia podrían influir sobre la eficacia de transmisión por semilla. Los análisis de regresión mostrados en la Figura 6 podrían aportar algo de información a este respecto. En JPN1, el virus en el que se observa un aumento en la eficacia de transmisión por semilla a mayores niveles de tolerancia, esta relación parece ser más fuerte con FT que con MT, lo que sugiere que la influencia de FT es mayor. Esto parece lógico ya que FT está relacionado con un aumento en la producción de semillas. Por otro lado, la influencia de MT podría explicarse por la observación previa de que un factor relevante para la eficacia de transmisión por semilla es la velocidad de movimiento del virus en la planta, es decir, el tiempo que tarda en alcanzar las estructuras reproductoras<sup>21</sup>. Así, cuanto mayor sea la esperanza de vida de los individuos infectados, más tiempo tendrá el virus para moverse y alcanzar los tejidos reproductores e infectar las semillas. Tampoco hay que descartar que exista, al menos en parte, un efecto combinado de ambas tolerancias, ya que se ha visto que FT y MT también pueden estar correlacionadas<sup>12</sup>. Hay que destacar que en poblaciones formadas por individuos 100% tolerantes el aumento de la tolerancia va acompañado de un incremento en la acumulación viral. Este aumento se ha visto que favorece una mejora de la eficacia de transmisión por semilla<sup>21</sup>. Por tanto, nuestros datos indican que la eficacia de transmisión por semilla no solo se ve influenciada por cómo el huésped controla el efecto de la infección en la producción de semillas (tolerancia), sino también por el nivel de multiplicación del virus en el huésped.

Al igual que con la acumulación viral, en este trabajo también se analizó la relación entre la eficacia de transmisión por semilla del virus y diferentes caracteres de la infección. Es interesante destacar que los factores relacionados con ST son diferentes para cada virus. En el caso de JPN1, los dos factores principales son el efecto de la infección en *LP* y la acumulación viral. Ambos parámetros están relacionados con la tolerancia (particularmente *MT*), como se ha indicado anteriormente. Por tanto, estos análisis apoyan el efecto de la tolerancia sobre la transmisión por semilla. Por otro lado, la eficacia de transmisión por semilla de UK1 se asoció con el efecto de la infección en *RP* y *IW*, ambos caracteres relacionados con la reproducción de la planta, lo que podría estar relacionado con el carácter castrante de UK1: sólo si el efecto de la infección se reduce de modo que se evita la castración se puede producir la transmisión por semilla. Aunque esta reducción del efecto sobre la reproducción de la planta alcanza un máximo que no permite un gran desarrollo de las estructuras reproductoras, es suficiente para que se alcancen valores de transmisión por semilla superiores al 10%, como indica la relación logarítmica entre las variables (Figura 7c).

Por último, el análisis de correlación entre la eficacia de transmisión por semilla del virus y diferentes caracteres de la infección para los linajes evolucionados en cada tipo de población también aporta observaciones de interés. En las plantas infectadas por los genotipos de virus ancestrales se observó una correlación logarítmica positiva entre la eficacia de transmisión por semilla y la mayoría de los caracteres de la infección considerados, mientras que estas relaciones prácticamente desaparecieron en los linajes evolucionados en las poblaciones P100, y la que permaneció, pasó de logarítmica a lineal. Las relaciones logarítmicas en las plantas infectadas por los genotipos ancestrales indican que el efecto de la infección en cada uno de los parámetros puede reducirse hasta un umbral máximo, lo que determinaría también un máximo en su capacidad de transmisión por semilla. La desaparición, o flexibilización, de estas limitaciones en los linajes evolucionados en P100, podría explicar el aumento observado en la transmisión por semilla de estos virus. De hecho, la comparación de los paneles (d) y (e) de la Figura 7 indica que en presencia de las correlaciones observadas en los genotipos ancestrales, el máximo de ST se establece en torno al 40-50%, mientras que en el caso de los linajes evolucionados en P100 no es raro que este máximo se supere.

En resumen, este trabajo aporta información novedosa sobre cómo los virus evolucionan para adaptarse a las respuestas de defensa de las plantas y optimizar sus mecanismos de transmisión. También propone hipótesis sobre los mecanismos que subyacen estos procesos de adaptación y que pueden ser el objeto de futuras investigaciones.

## **CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES**

1. La evolución de los virus en una población de huéspedes tolerantes incrementa la eficacia de transmisión por semilla de éstos.
2. Este incremento en la eficacia de transmisión por semilla se relaciona con un aumento de la tolerancia de las plantas y de los niveles de acumulación viral en éstas.
3. Para que se produzca el incremento de la eficacia de transmisión por semilla parece necesario que se desacople este parámetro de otros caracteres de la infección relacionados con el crecimiento y la reproducción de la planta.
4. Una mejora de los mecanismos de defensa de las plantas puede llevar a la evolución del virus hacia mayores valores de eficacia biológica.

## CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

1. L. Bos, “Crop losses caused by viruses”, *Crop Protection*, vol. 1, n.º 3, pp. 263-282, (1982).
2. E. C. Oerke, “Crop losses to pests”, *Journal of Agricultural Science*, vol. 144, pp. 31-43, (2006).
3. G. N. Agrios, “Fitopatología de G. N. Agrios”, Elsevier, pp. 856, (2005).
4. H. C. J. Godfray *et al*, “Food security: The challenge of feeding 9 billion people”, *Science*, vol. 327, n.º 5967, pp. 812-818, (2010).
5. D. Janssen, L. Ruiz, C. Garcia & R. J. M. Meijer, “Viruses transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci* in organic greenhouse crops”, *Plant Health*, vol. 15, pp. 1-2, (2016).
6. I. Pagán, “CHAPTER 16: Movement Between Plants: Vertical Transmission”, “*Cucumber Mosaic Virus*”, pp. 185–198, (2019) doi:10.1094/9780890546109.020.
7. D. D. Clarke, “Tolerance of parasites and disease in plants and its significance in host-parasite interactions”, *Advances in plant pathology*, vol. 5, pp. 161-198, (1986).
8. M. Weiss *et al*, “Genomic basis of white pine blister rust quantitative disease resistance and its relationship with qualitative resistance”, *Plant Journal*, vol. 104, pp. 365-376, (2020).
9. N. Sanabria, D. Goring, T. Nürnberger & I. Dubery, “Self/nonsel perception and recognition mechanisms in plants: A comparison of self-incompatibility and innate immunity” *New Phytologist*, vol. 178, pp. 503-514, (2008).
10. E. French, B. S. Kim, & A. S. Iyer-Pascuzzi, “Mechanisms of quantitative disease resistance in plants”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 56, pp. 201-208, (2016).
11. J. A. Poland, P. J. Balint-Kurti, R. J. Wisser, R. C. Pratt & R. J. Nelson, “Shades of gray: the world of quantitative disease resistance” *Trends in Plant Science*, vol. 14, pp. 21-29, (2009).
12. N. Montes, V. Vijayan & I. Pagan, “Trade-offs between host tolerances to different pathogens in plant-virus interactions” *Virus Evolution*, vol. 6, n.º 1, veaa019, (2020).
13. N. Montes, C. Alonso-Blanco & F. García-Arenal, “Cucumber mosaic virus infection as a potential selective pressure on *Arabidopsis thaliana* populations” *PLoS Pathogens*, vol. 15, n.º 5, e1007810, (2019).
14. I. Pagan & F. Garcia-Arenal, “Tolerance of Plants to Pathogens: A Unifying View” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 58, pp. 77-96, (2020).
15. T. J. Little, D. M. Shuker, N. Colegrave, T. Day & A. L. Graham, “The coevolution of virulence: Tolerance in perspective” *PLoS Pathogens*, vol. 6, n.º 9, e1001006, (2010).
16. A. Best, A. White & M. Boots, “Maintenance of host variation in tolerance to pathogens and parasites” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America*, vol. 105, n.º 52, pp. 20786-20791, (2008).
17. C. Bragard *et al*, “Status and prospects of plant virus control through interference with vector transmission” *Annual Review of Phytopathology*, vol. 51, n.º1, pp. 177-201, (2013).
  18. A. Fereres & A. Moreno, “Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects” *Virus Research*, vol 141, n.º 2, pp. 158-168, (2009).
  19. I. Pagán, “CHAPTER 16: Movement Between Plants: Vertical Transmission” in *Cucumber Mosaic Virus*, (The American Phytopathological Society, 2019), pp. 185–198. doi:10.1094/9780890546109.020.
  20. N. M. Salem, J. D. Ehlers, P. A. Roberts & J. C. K. Ng, “Biological and molecular diagnosis of seedborne viruses in cowpea germplasm of geographically diverse sub-Saharan origins” *Plant Pathology*, vol. 59, n.º 4, pp. 773-784, (2010).
  21. A. Cobos, N. Montes, M. López-Herranz, M. Gil-Valle & I. Pagán, “Within-Host Multiplication and Speed of Colonization as Infection Traits Associated with Plant Virus Vertical Transmission” *Journal of Virology*, vol. 93, n.º23, e01078-19, (2019).
  22. F. Sánchez, X. Wang, C. E. Jenner, J. A. Walsh & F. Ponz, “Strains of Turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus” *Virus Research*, vol. 94, n.º1, pp. 33-43, (2003).
  23. K. Ohshima, M. Tanaka & N. Sako, “The complete nucleotide sequence of turnip mosaic virus RNA Japanese strain” *Archives of Virology*, vol.141, n.º 10, pp. 1991-1997, (1996).
  24. B. Y. W. Chung, W. A. Miller, J. F. Atkins & A. E. Firth, “An overlapping essential gene in the Potyviridae” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 105, n.º 15, pp. 5897-5902, (2008).
  25. V. Vijayan, S. López-González, F. Sánchez, F. Ponz & I. Pagán, “Virulence evolution of a sterilizing plant virus: Tuning multiplication and resource exploitation” *Virus Evolution*, vol.3, n.º 2, vex033, (2017).
  26. J. A. Walsh & C. E. Jenner, “Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance” *Molecular Plant Pathology*, vol.3, n.º 5, pp. 289-300, (2002).
  27. F. Sanchez *et al*, “Viral strain-specific differential alterations in arabidopsis developmental patterns” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 28, n.º 12, pp. 1304–1315, (2015).
  28. I. Pagán, C. Alonso-Blanco & F. García-Arenal, “Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*” *PLoS Pathogens*, vol. 4, n.º 8, e1000124, (2008).
  29. F. X. Picó, B. Méndez-Vigo, J. M. Martínez-Zapater & C. Alonso-Blanco, “Natural genetic variation of *Arabidopsis thaliana* is geographically structured in the Iberian Peninsula” *Genetics*, vol. 180, n.º 2, pp. 1009-1021, (2008).
  30. S. Kaul *et al*, “Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*” *Nature*, vol. 408, n.º 6814, pp. 796-815, (2000).
  31. M. Koornneef, C. Alonso-Blanco & D. Vreugdenhil, “Naturally occurring genetic

- variation in *Arabidopsis thaliana*” *Annual Review of Plant Biology*, vol. 55, n.º 1, 141-172, (2004).
32. A. C. Brennan *et al.*, “The genetic structure of *Arabidopsis thaliana* in the southwestern Mediterranean range reveals a shared history between North Africa and southern Europe” *BMC Plant Biology*, vol. 14, n.º 1, (2014).
  33. N. Montes, V. Vijayan & I. Pagán, “Host population structure for tolerance determines the evolution of plant–virus interactions” *New Phytologist*, (2021). doi:10.1111/nph.17466.
  34. J. A. Tomlinson, “Epidemiology and control of virus diseases of vegetables” *Annals of Applied Biology*, vol. 110, n.º 3, pp. 661-681, (1987).
  35. P. Lunello, C. Mansilla, F. Sánchez & F. Ponz, “A developmentally linked, dramatic, and transient loss of virus from roots of *Arabidopsis thaliana* plants infected by either of two RNA viruses” *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 20, n.º 12, pp. 1589-1595, (2007).
  36. A. J. Gibbs & J. C. Gower, “The use of a multiple-transfer method in plant virus transmission studies—some statistical points arising in the analysis of results” *Annals of Applied Biology*, vol. 48, n.º 1, pp. 75-83, (1960).
  37. D. Bates, M. Mächler, B. M. Bolker & S. C. Walker, “Fitting linear mixed-effects models using lme4” *Journal of Statistical Software*, vol. 67, n.º 1, pp. 1-48, (2015).
  38. N. Belgorodski, K. Schueller, Kristin & Tolksdorf, “Fitting Distributions to Given Data or Known Quantiles, Package ‘riskDistributions.’” *Package ‘riskDistributions’* (2017).
  39. R. R. Sokal & F. J. Rohlf, “Biometry”, 3<sup>rd</sup> edition, New York: W. H. Freeman and Company, pp. 880, (1995).
  40. L. Råberg, “How to Live with the Enemy: Understanding Tolerance to Parasites” *PLoS Biology*, vol. 12, n.º 11, e1001989, (2014).
  41. K. D. Lafferty & A. M. Kuris, “Parasitic castration: the evolution and ecology of body snatchers” *Trends in Parasitology*, vol. 25, n.º 12, pp. 564-572, (2009).
  42. D. Ebert, H. J. Carius, T. Little & E. Decaestecker, “The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism” *American Naturalist*, vol. 164, n.º 5, pp. 19-32, (2004).