



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOCÍENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
VEGETAL

**EFFECTOS BIOLÓGICOS EN INFECCIONES MIXTAS DE  
CRINIVIRUS Y VIRUS DE LA FAMILIA *POTYVIRIDAE***

María Luisa Domingo Calap  
Barcelona, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOCIÉNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA ANIMAL, BIOLOGÍA VEGETAL Y  
ECOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
VEGETAL

**EFFECTOS BIOLÓGICOS EN INFECCIONES MIXTAS DE  
CRINIVIRUS Y VIRUS DE LA FAMILIA *POTYVIRIDAE***

Memoria presentada por María Luisa Domingo Calap para optar al título de  
doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Director

Doctoranda

Dr. Juan José López-Moya Gómez

María Luisa Domingo Calap

Barcelona, 2018



Este trabajo se ha llevado a cabo en el laboratorio de Virología del Centro de Investigación en Agrigenómica CRAG (CSIC-IRTA-UAB-UB) de Barcelona, bajo la supervisión del Dr. Juan José López-Moya Gómez. Parte del trabajo se desarrolló durante estancias breves realizadas en el laboratorio de Patología Vegetal del centro Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA-INRA) de Aviñón (Francia), en el laboratorio de Interacciones Planta-Patógeno del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM-UMA-CSIC) de Málaga y en el laboratorio de Insectos Vectores de Patógenos de Plantas del Instituto de Ciencias Agrarias (ICA-CSIC) de Madrid.



## **AGRADECIMIENTOS**



No puedo terminar esta etapa, sin dar las gracias a todas las personas que han estado a mi lado durante estos tres intensos años, de uno u otro modo. A los que estaban y siguen estando; a los que estaban y siguen en mi corazón; y a los que han llegado para quedarse.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mi director: Juanjo, gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis. Te agradezco de todo corazón tu dedicación y tu tiempo, he aprendido y disfrutado muchísimo.

En segundo lugar, a nuestros colaboradores de Madrid, Avignon y Málaga: Alberto, Arantxa, Cécile y Juan, gracias por acogerme en vuestros respectivos laboratorios con los brazos abiertos. Ha sido todo un placer haber podido aprender tanto de vosotros.

No puedo olvidarme del colaborador honorífico del VirLab, Adrián, gracias por tus sabios consejos y por todas tus aportaciones.

Como no, agradecer a todas las personas que han estado ayudándome en el día a día en el laboratorio: a los que están (Bia, Tarik, Inma, Ornela) y a los que han pasado y han dejado huella (Ares, Mariona, Maria, Jhony); y a toda la gente de los servicios de invernaderos, secuenciación, microscopía, bioinformática, administración y gestión, compras, etc., que hacen que nuestro trabajo sea mucho más fácil.

A todos mis compañeros y amigos del CRAG, gracias por todos los buenos momentos vividos juntos durante estos importantes años de nuestras vidas.

A mis amigos de Valencia, gracias por escucharme y darme fuerzas siempre que lo he necesitado.

Y por último, y más importante, a mi familia: mami, papi, tita y tito, gracias por estar ahí siempre, incondicionales, para todo. Porque nuestra unión no entiende de distancias y aun estando lejos, os he sentido a mi lado en cada momento. Y como no, a la luz de mis días, David, gracias por estar en cada momento a mi lado, apoyándome en todo.



**RESUMEN / SUMMARY**



## RESUMEN

Las infecciones mixtas de virus en plantas, muy comunes en la naturaleza, ocurren cuando dos o más virus son capaces de infectar un mismo huésped. Las interacciones entre los distintos virus en infecciones mixtas pueden ser sinérgicas o antagónicas, según se vean favorecidos o perjudicados. Excepto en algunos casos de enfermedades complejas causadas por interacciones sinérgicas graves, en muchos otros las infecciones mixtas permanecen desapercibidas y se desconoce en gran medida su impacto en la transmisión de virus por insectos.

Este trabajo tiene como objetivo principal evaluar los efectos biológicos en infecciones mixtas de virus en plantas. Por una parte, se ha estudiado la infección mixta causada por el crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) y el potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV), prestando especial atención a la interacción entre ellos, su efecto sobre la planta huésped, y el posible impacto en la transmisión por vectores. Por otra parte, se ha evaluado la posible influencia de las infecciones mixtas en aspectos biológicos intrínsecos del virus, como es el caso del mecanismo de deslizamiento de la polimerasa que permite la expresión de productos génicos en virus de la familia *Potyviridae*, estudiando el ipomovirus *Coccinia mottle virus* (CocMoV), el cual además del motivo habitual susceptible de generar P3N-PIPO, contiene un motivo similar en P1a, a partir del cual se podrían originar nuevos productos que hemos denominado P1aN-SOG (de "Short Out-of-frame Gene-product") y P1aN-ALT.

Nuestro trabajo ha mostrado la dinámica de acumulación a lo largo del tiempo de WMV y CYSDV en infecciones mixtas en plantas de melón susceptibles, observándose mayor acumulación del segundo, mientras que la carga viral del primero se reduce. Se han llevado a cabo transmisiones por insectos vectores, y se analizó el comportamiento alimenticio de pulgones,

encontrando en el caso de infecciones mixtas una mayor duración de una fase asociada a la adquisición de WMV, lo que podría favorecer su diseminación natural. En experimentos realizados con moscas blancas en condiciones de semicampo se observó una mayor transmisión de CYSDV hacia plantas previamente infectadas con WMV, lo que sugiere que la prevalencia de infecciones mixtas podría verse favorecida.

El análisis de supresores de silenciamiento virales nos permitió identificar un efecto modulador de la proteína P1 de WMV sobre la actividad de la proteína P25 de CYSDV. Se confirmó además que ambas proteínas interactúan, y por tanto podrían contribuir a causar respuestas específicas durante las infecciones mixtas.

Por último, la secuenciación masiva de la progenie viral en CocMoV mostró la existencia de inserciones y deleciones en los motivos de deslizamiento de la polimerasa en P1a y P3, que podrían conducir a la expresión de nuevos productos génicos como P1aN-SOG y P1aN-ALT. En el caso de infecciones mixtas de CYSDV y CocMOV, las proporciones relativas de P3N-PIPO y P3N-ALT se pueden ver modificadas respecto a las mismas en infecciones simples o mixtas con WMV.

## SUMMARY

Mixed viral infections in plants are very common in nature, and occur when two or more viruses are able to infect the same host. The interactions between the different viruses in mixed infections can be synergistic or antagonistic, depending on whether the outcome is positive or negative. Except in some complex diseases caused by severe synergistic interactions, often mixed infections remain unnoticed and their impact on vector transmission of viruses by insects is largely unknown.

The main objective of this work was to evaluate the biological effects of mixed virus infections in plants. Mixed infections caused by *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) and *Watermelon mosaic virus* (WMV) has been studied, paying special attention to the interaction between them, how it affects the host plant, and the possible impact on vector transmission.

Also, the possible influence of mixed infections on intrinsic biological aspects of the viruses has been evaluated, as in the case of the polymerase slippage mechanism that allows the expression of additional gene products in viruses of the family *Potyviridae*, such as the ipomovirus *Coccinia mottle virus* (CocMoV), which in addition to the usual motive resulting in expression of P3N-PIPO, it contains a similar motif in P1a, from which new products named P1aN-SOG (from "Short Out-of-frame Gene-product ") and P1aN-ALT could originate.

Our work shows the accumulation dynamics over time of WMV and CYSDV in mixed infections in susceptible melon plants, observing greater accumulation of the second, while the viral load of the first is reduced. Transmission by insect vectors was carried out, and the feeding behavior of aphids was analyzed, finding in the case of mixed infections a longer phase associated with WMV acquisition, which could favor its natural dissemination. In experiments with whiteflies in semi-field conditions, better CYSDV

## Summary

---

transmission was observed towards plants previously infected with WMV, which might favor the prevalence of mixed infections.

The analysis of viral suppressors of RNA silencing allowed us to identify an effect caused by the P1 protein of WMV on the activity of P25 of CYSDV. We also confirmed that both proteins can interact, and therefore contribute to specific responses during mixed infections.

Finally, NGS of the progeny of CocMoV found insertions and deletions in the polymerase slippage motifs in both P1a and P3, which could lead to the expression of new gene products such as P1aN-SOG and P1aN-ALT . In the case of mixed infections with CYSDV and CocMOV, the relative proportions of P3N-PIPO and P3N-ALT changed compared to simple or mixed infections with WMV.

## **ABREVIATURAS**



**Virus a los que se hace referencia en este trabajo**

<b>BPMV</b>	<i>Bean pod mottle virus</i>
<b>BYDV</b>	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
<b>CABYV</b>	<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>
<b>CaMV</b>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
<b>CBSV</b>	<i>Cassava brown streak virus</i>
<b>CCYV</b>	<i>Cucurbit chlorotic yellows virus</i>
<b>CMV</b>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
<b>CocMoV</b>	<i>Coccinia mottle virus</i>
<b>CPMV</b>	<i>Cowpea mosaic virus</i>
<b>CYSDV</b>	<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i>
<b>LIYV</b>	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>
<b>PapMV</b>	<i>Papaya mosaic virus</i>
<b>PepGMV</b>	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
<b>PepMoV</b>	<i>Pepper mottle virus</i>
<b>PHV</b>	<i>Pepper huasteco virus</i>
<b>PLRV</b>	<i>Potato leafroll virus</i>
<b>PPV</b>	<i>Plum pox virus</i>
<b>PRSV</b>	<i>Papaya ringspot virus</i>
<b>PVA</b>	<i>Potato virus A</i>
<b>PVX</b>	<i>Potato virus X</i>
<b>PVY</b>	<i>Potato virus Y</i>
<b>RRSV</b>	<i>Rice ragged stunt virus</i>
<b>RSV</b>	<i>Rice stripe virus</i>
<b>SMV</b>	<i>Soybean mosaic virus</i>
<b>SPCSV</b>	<i>Sweet potato chlorotic stunt virus</i>
<b>SPMMV</b>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>
<b>SPFMV</b>	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>
<b>SRBSDV</b>	<i>Southern rice black-streaked dwarf virus</i>

## Abreviaturas

---

<b>TBSV</b>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
<b>TEV</b>	<i>Tobacco etch virus</i>
<b>TICV</b>	<i>Tomato infectious chlorosis virus</i>
<b>TMV</b>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
<b>ToCV</b>	<i>Tomato chlorosis virus</i>
<b>TSWV</b>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
<b>TuMV</b>	<i>Turnip mosaic virus</i>
<b>TVMV</b>	<i>Tobacco vein mottling virus</i>
<b>TYLCCNV</b>	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
<b>TYLCV</b>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
<b>WMV</b>	<i>Watermelon mosaic virus</i>
<b>ZYMV</b>	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>

**Otras abreviaturas**

AC	Corriente alterna
AGO	Proteína Argonauta
ALT	Pauta de lectura interrumpida
BIFC	Complementación bimolecular de la fluorescencia
CFP	Proteína cian fluorescente
CI	Proteína de las inclusiones cilíndricas
CP	Proteína de la cápsida
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DC	Corriente continua
DICER	Ribonucleasa miembro de la familia de las RNAsa III
Dpi	Días post inoculación
Dpai	Días post agroinfiltración
dsRNA	RNA de doble cadena
EPG	Gráficos de penetración eléctrica
EtBr	Bromuro de Etidio
g	Gramo
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Hora
HC-Pro	Factor de transmisión o componente auxiliar de transmisión
ICTV	Siglas del comité de taxonomía “International Committee on Taxonomy of Viruses”
IPGRI	Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
l	Litro
LB	Medio Luria Bertani
M	Molar

## Abreviaturas

---

min	Minuto
mM	Milimolar
MAPAMA	Ministerio de Agricultura Pesca y Medio Ambiente
MEAM1	Biotipo de <i>B. tabaci</i> "Middle East-Minor Asia 1"
MED	Biotipo de <i>B. tabaci</i> "Mediterranean"
Nla	Proteína (a) de las inclusiones nucleares
Nlb	Proteína (b) de las inclusiones nucleares
NGS	Secuenciación masiva "Next generation sequencing"
ORF	Pauta abierta de lectura
P1	Proteína 1
P3	Proteína 3
P22	Proteína de 22 KDa
P25	Proteína de 25 KDa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PIPO	Pauta de lectura "Pretty Interesting Potyviral ORF"
PISPO	Pauta de lectura "Pretty Interesting Seet potato Potyviral ORF"
PTGS	Silenciamiento post-transcripcional
qRT-PCR	PCR cuantitativa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
<i>RpRd</i>	Polimerasa de RNA dependiente de RNA
RSS	Supresor de silenciamiento de RNA
RT	Transcripción inversa
s	Segundo
siRNA	RNA pequeño de interferencia
sRNA	RNA de pequeño tamaño
SOG	Pauta de lectura "Short Out-of-frame Gene-product ORF"

TGS	Silenciamiento transcripcional
U	Unidades
UTR	Regiones no traducidas
uv	Ultravioleta
var.	Variedad
VPg	Proteína unida al genoma viral
vsRNA	RNA de pequeño tamaño derivado de virus
YEB	Medio de crecimiento para <i>Agrobacterium</i>
YFP	Proteína amarilla fluorescente
μl	Microlitro



## **ÍNDICE**



## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1 El melón.....	3
1.2 Los virus de plantas.....	6
1.2.1 La familia <i>Potyviridae</i> .....	7
1.2.1.1 El género <i>Potyvirus</i> .....	8
<i>Watermelon mosaic virus</i> .....	9
1.2.1.2 El género <i>Ipomovirus</i> .....	11
<i>Coccinia mottle virus</i> .....	11
1.2.2 La familia <i>Closteroviridae</i> .....	13
1.2.2.1 El género <i>Crinivirus</i> .....	14
<i>Cucurbit yellow stunting disorder virus</i> .....	14
1.3 Transmisión de virus de plantas.....	16
1.3.1 Tipos de transmisión de virus de plantas por insectos....	17
1.3.1.1 Transmisión no persistente .....	18
1.3.1.2 Transmisión semipersistente.....	18
1.3.1.3 Transmisión persistente. ....	19
1.3.2 Vectores de transmisión de virus de plantas.....	20
1.3.2.1 Moscas blancas.....	21
1.3.2.2 Pulgones.....	23
1.3.3 Monitorización del comportamiento alimenticio de los insectos.....	24
1.4 Interacción planta-patógeno vector .....	27
1.4.1 Infecciones mixtas de virus en plantas.....	31
1.5 Infección viral.....	35
1.5.1 Clones infectivos de virus.....	36
1.5.2 Deslizamiento de la polimerasa.....	37
1.6 Mecanismos de defensa en plantas .....	39

1.6.1 Silenciamiento génico.....	40
1.6.1.1 Supresores de silenciamiento .....	42
<b>2. Ojetivos .....</b>	<b>47</b>
<b>3. Materiales y métodos .....</b>	<b>51</b>
3.1 Material biológico.....	51
3.1.1 Plantas.....	51
3.1.2 Bacterias y levaduras .....	52
<i>Echerichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	52
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	52
3.1.3 Virus .....	53
3.1.4 Vectores virales .....	54
3.1.5 Plásmidos y vectores de clonación .....	54
3.2 Manipulación de virus.....	55
3.2.1 Inoculación mecánica .....	55
3.2.2 Inoculación por vectores y obtención de plantas doblemente infectadas.....	56
3.2.3 Inoculación biolística .....	57
3.3 Manipulación de ácidos nucleicos .....	57
3.3.1 Extracción de RNA de tejido de plantas .....	57
3.3.2 Transcripción inversa .....	58
3.3.3 Amplificación mediante PCR .....	58
3.3.4 Electroforesis en geles de agarosa .....	59
3.3.5 Detección de plantas infectadas: hibridación molecular..	59
Obtención de la sonda.....	59
"Tissue print" .....	60
3.4 Análisis de la carga viral.....	61
3.4.1 Transcritos para determinar la recta patrón .....	61
3.4.2 Análisis de títulos virales: qRT-PCR absoluta .....	63

3.5 Manipulación de vectores virales .....	65
3.5.1 Transmisión primaria .....	65
3.5.2 Transmisión secundaria .....	65
3.5.3 Monitorización del comportamiento alimenticio de los vectores: EPGs .....	67
3.6 Expresión transitoria en planta .....	68
3.6.1 Obtención de construcciones .....	68
3.6.2 Ensayos de actividad supresora de silenciamiento .....	70
3.6.3 Análisis de expresión transitoria en planta: qRT-PCR .....	72
3.6.4 Localización y co-localización subcelular .....	73
3.6.5 Interacción proteína-proteína: BiFC .....	73
3.7 Microscopía confocal .....	75
3.8 Obtención de clones infectivos .....	76
3.9 Análisis de frecuencia de deslizamiento de la polimerasa .....	78
<b>4. Resultados .....</b>	<b>83</b>
4.1 Dinámica de la carga viral .....	83
4.1.1 Análisis de la carga viral de CYSDV y WMV en infecciones sencillas y mixtas .....	83
4.2 Diseminación por insectos vectores .....	88
4.2.1 Transmisión primaria de CYSDV y WMV a partir de plantas en infección sencilla y mixta .....	88
4.2.2 Ensayos de preferencia con <i>Myzus persicae</i> .....	90
4.2.3 EPGs de pulgones alimentándose sobre diferentes tipos de plantas .....	91
4.2.4 Transmisión secundaria de CYSDV .....	96
4.3 Interacción entre distintos productos génicos virales .....	99
4.3.1 Supresores de silenciamiento .....	99
4.3.2 Efecto de P1 de WMV sobre la actividad de P25 de CYSDV .....	102

Efecto dependiente de dosis .....	103
4.3.3 Localización y co-localización subcelular de P1 de WMV y P25 de CYSVDV4 .....	104
4.3.4 Interacción entre P1 de WMV y P25 de CYSVDV: BiFC .....	105
4.3.5 Efecto de P1 de WMV sobre distintos supresores de silenciamiento y de distintas proteínas P1 sobre P25 de CYSVDV.....	106
4.4 Alteración de la frecuencia de deslizamiento de la polimerasa en infecciones mixtas de virus.....	107
4.4.1 Análisis de deslizamiento de la polimerasa en los motivos G <sub>1-2</sub> A <sub>6-7</sub> de CocMoV .....	108
4.5 Obtención de clones virales .....	113
4.5.1 Obtención de un clon infectivo de CocMoV.....	113
4.5.2 Obtención de un mutante de CocMoV modificado para impedir la producción de P1aN-SOG y P1aN-ALT .....	116
4.6 Identificación del supresor de silenciamiento de CocMoV .....	118
<b>5. Discusión .....</b>	<b>123</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>143</b>
<b>7. Conclusions .....</b>	<b>149</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>155</b>

# **INTRODUCCIÓN**

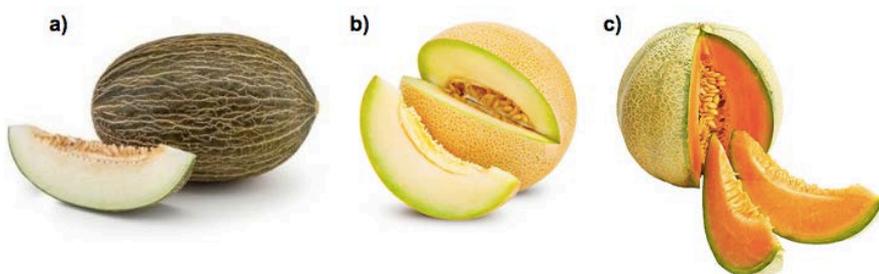


## 1. Introducción

### 1.1 El melón

El melón es una especie vegetal cultivada desde la antigüedad, clasificada taxonómicamente como *Cucumis melo* L. por Linneo en 1753 en su obra "Species Plantarum". Es una planta angiosperma dicotiledónea que pertenece a la División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Dilleniidae*, Superorden *Violanae*, Orden *Violales*, Familia *Cucurbitaceae*, Subfamilia *Cucurbitoideae*, Tribu *Melothrieae*, Subtribu *Cucumerinae*, Género *Cucumis*, Subgénero *Melo*, Sección *Melo*, Serie *Melo*, Especie *Cucumis melo* L. (USDA-ARS, 2010). La familia *Cucurbitaceae* está constituida por aproximadamente 118 géneros y 825 especies (Bates et al. 1990; Esquinas-Alcázar y Gulick 1983; Jeffrey 1990) distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios del planeta. De ellas, unas 30 especies se cultivan, y pertenecen a nueve géneros distintos, entre las que se encuentran, además del melón, las calabazas, los calabacines, los pepinos y las sandías (Esquinas-Alcázar y Gulick, 1983). El melón es una planta herbácea anual de la que se aprovechan sus frutos. Como en todas las cucurbitáceas, en el melón tiene gran desarrollo la raíz principal que se encuentra muy ramificada. Sus raíces pueden variar desde los 30-40cm hasta alcanzar el metro veinte de profundidad y el tallo principal puede sobrepasar los tres metros de longitud. Presenta ramificaciones primarias, secundarias y terciarias, creciendo, tanto las secundarias como las terciarias, a partir de las axilas de las hojas. Presenta el tallo recubierto de formaciones pilosas y puede tener zarcillos sencillos frente a cada hoja. La presencia o ausencia de éstos hace que su porte sea rastrero o trepador. Se trata de una planta extremadamente polimorfa (Zapata et al. 1989).

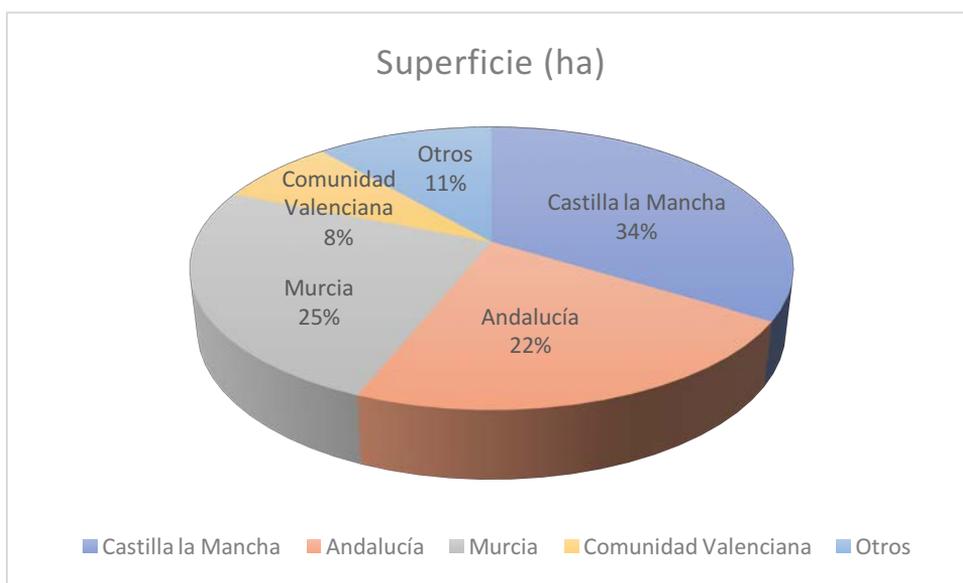
El fruto recibe la denominación botánica de pepónide y es, sin duda, de todos los caracteres evaluables en la planta del melón, el que presenta una mayor variabilidad. Su peso puede oscilar, según la clasificación del IPGRI (Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos) de menos de cien gramos hasta más de tres mil; su forma varía desde esférica hasta fusiforme; el color de la corteza puede ser negro, verde, amarillo, naranja o gris y puede presentar o no manchas, las cuales pueden ser variables en color y distribución. La piel del fruto puede ser rugosa o lisa, con presencia o no de reticulado y su carne, de distinto grosor, firmeza, textura, contenido en sólidos solubles y color (blanquecina, verdosa, anaranjada) (Figura 1). Su cavidad central, de tamaño también variable, puede ser seca, gelatinosa o acuosa en función de su consistencia, y las semillas, que se encuentran insertas sobre el tejido placentario, son fusiformes, aplastadas y de color blanco o amarillento.



**Figura 1.** Ejemplos de distintos tipos de melón. a) Melón tipo piel de sapo. b) Melón tipo galia. c) Melón tipo cantalupo. (Imágenes obtenidas en [www.daifreshh.com](http://www.daifreshh.com))

Actualmente el melón es una de las hortalizas más producida en el mundo después del tomate. El máximo productor de melón mundial con diferencia es China. España es el principal productor de la Unión Europea. En 2015 su producción fue de 692.056 T con un área dedicada a su cultivo de 22.144 ha (MAPAMA, Anuario de estadística 2016). La

tendencia, a partir de los datos observados de los últimos años, es de cierta disminución tanto de la producción como del área de cultivo, aunque se mantiene entre las principales especies hortícolas (MAPAMA, Anuario de estadística 2016). Las zonas productoras más importantes de España son Andalucía, Murcia, Castilla la Mancha y Comunidad Valenciana (Figura 2). La producción española está mayoritariamente destinada al mercado europeo, que prefiere los melones de menor calibre. Francia se decanta más por el tipo Charentais, Inglaterra por los tipos Galia y Amarillo, y Alemania por el tipo Cantalupo. El mercado nacional, por el contrario, prefiere variedades de tamaño medio, como Piel de Sapo. Debido a su interés agronómico y a la disponibilidad de su genoma recientemente secuenciado (Garcia-Mas et al. 2012), el melón se emplea en la actualidad como organismo modelo para la investigación en cucurbitáceas.



**Figura 2.** Superficie cultivada con melón en España, 2015 (MAPAMA, Anuario de estadística 2016).

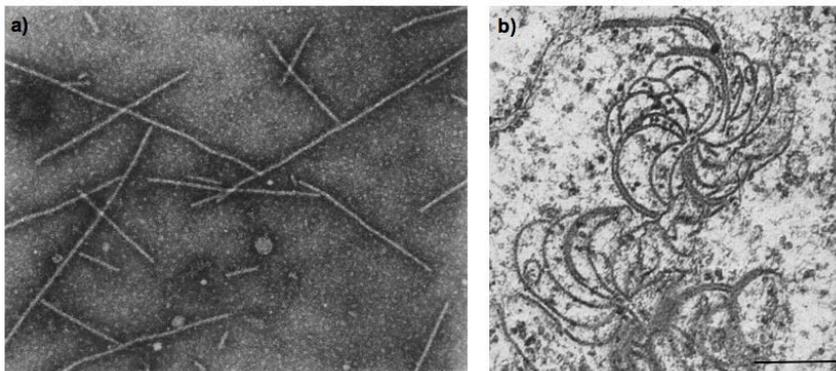
### 1.2 Los virus de plantas

Las plantas están continuamente expuestas a factores externos, tanto abióticos (factores físico-químicos del ambiente, como pueden ser el clima, el suelo o la geografía) como bióticos (aquellos relacionados con organismos que tienen vida, como otras plantas, animales o microorganismos). Dentro del extenso grupo de microorganismos, podemos incluir a los virus, las bacterias y los hongos. Aquellos que provocan consecuencias negativas sobre las plantas, son conocidos como microorganismos patógenos, los cuales actúan produciendo enfermedades. Los virus de plantas representan uno de los grupos de patógenos más importantes en la naturaleza, causando graves pérdidas económicas en muchas especies de interés agronómico en todo el mundo (Hull 2013).

Dada la enorme diversidad que existe entre los distintos virus de plantas, los criterios para su clasificación son muy variados, teniendo en cuenta como aspectos principales: el tipo de ácido nucleico; la organización genómica y el mecanismo de replicación que utiliza el patógeno; la forma y tamaño del virión; la presencia o no de cubierta proteica o lipoproteica; las características de algunas proteínas virales; las propiedades antigénicas y las propiedades biológicas; así como la gama de huéspedes, la patogenicidad y el modo de transmisión. El Comité Internacional para la Taxonomía Viral (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) ha establecido un sistema de clasificación de virus con pautas que permiten mantener unidades taxonómicas al menos hasta la categoría de familia. En la actualidad, el ICTV reconoce más de 1000 especies de virus de plantas, agrupadas en 25 familias y 109 géneros (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> ).

### 1.2.1 La familia *Potyviridae*

La familia *Potyviridae* es la más extensa dentro de los virus de genoma de RNA que afectan a las plantas (Scholthof et al. 2011; Valli et al. 2015; Wylie et al. 2017). Esta familia abarca 8 géneros distintos, incluyendo el género *Potyvirus*, siendo este el grupo más numeroso con más de 170 miembros descritos hasta el momento. Todos los miembros de la familia *Potyviridae* se caracterizan por presentar partículas virales flexuosas y filamentosas, de entre 680 y 900 nm de longitud y entre 11 y 14 nm de diámetro (Kendall et al. 2008) (Figura 3a). Forman además inclusiones cilíndricas de naturaleza cristalina en el citoplasma de las células infectadas. Estas inclusiones de naturaleza proteica, presentan una estructura tridimensional con aspecto de aspas de molino llamadas “pinwheels” (Rubio Huertos y López-Abella, 1966; Hollings y Brunt, 1981) (Figura 3b). En todos los miembros de la familia *Potyviridae*, un cambio en la pauta de lectura en la proteína P3, da lugar a la proteína con cambio de fase P3N-PIPO a partir del motivo conservado G<sub>1-2</sub>A<sub>6-7</sub> (Chung et al. 2008)

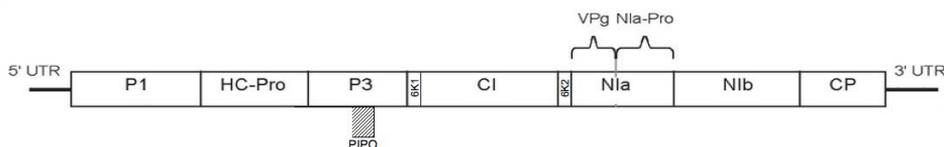


**Figura 3.** a) Partículas virales características de la familia *Potyviridae* (imagen extraída de wordpress.com). B) Pinwheels del potyvirus *Potato virus Y* (imagen extraída de dpvweb.net). La barra representa 200nm.

### 1.2.1.1 El género *Potyvirus*

Desde el punto de vista histórico, los potyvirus fueron uno de los seis grupos de virus de plantas inicialmente reconocidos por Brandes y Wetter, en el año 1959, basándose en las propiedades morfológicas de las partículas virales. Desde entonces, tanto el número de sus miembros como el conocimiento de sus características no ha dejado de aumentar, siendo en la actualidad el grupo de virus de plantas con genoma de RNA más numeroso. Todos sus miembros comparten una peculiar organización genómica, la cual consiste en una cadena sencilla y positiva de RNA de unas 10 Kb y sentido mensajero, rodeada de aproximadamente dos mil copias de la proteína de la cápsida (CP) viral (Valli et al. 2015; Wylie et al. 2017). El RNA genómico de los potyvirus lleva unida covalentemente una proteína VPg en su extremo 5' (Murphy et al. 1990; Riechmann et al. 1992) y una cola poliadenilada en el extremo 3' (Hari et al. 1979). El ARN viral contiene una única fase de lectura abierta (ORF) flanqueada por regiones no codificantes que se traduce en una única poliproteína de aproximadamente 350KDa, la cual se procesa autocatalíticamente por proteasas virales dando lugar a 10 proteínas maduras (Allison et al. 1985; Dougherty et al. 1988; López-Moya y García 1999; Riechmann et al. 1992; Shukla et al., 1994). Se pensaba que esta ORF era única, pero estudios recientes demuestran la existencia de una proteína viral parcialmente solapante a partir del cambio de fase lectura en un motivo  $G_{1-2}A_{6-7}$  conservado en la región de la proteína P3, común en todos los miembros de la familia *Potyviridae* (Chung et al. 2008). A partir de este motivo conservado, se produce el producto P3N-PIPO en la ORF+2 via "transcriptional slippage" o deslizamiento de la polimerasa (Olsper et al. 2015; Rodamilans et al. 2015). Además, se ha demostrado que estos nuevos productos génicos son necesarios para funciones esenciales de los virus, debido a lo cual,

parece ser que los potyvirus pueden usar esta estrategia peculiar para aumentar su capacidad de codificar información genética en pequeños genomas. En nuestro grupo, recientemente se ha caracterizado la proteína solapante P1N-PISPO por deslizamiento de la polimerasa en la ORF-1, a partir del motivo G<sub>2</sub>A<sub>6</sub> presente en la proteína P1 de *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) (Mingot et al. 2016).



**Figura 4.** Esquema general del genoma de los potyvirus. El RNA se representa como una línea, con las ORFs encima como cajas, flanqueadas por regiones no traducidas (UTR). En el extremo 5' se localiza una proteína covalentemente unida (VPg) y el extremo 3' se encuentra poliadenilado. La región fuera de fase denominada PIPO se indica con una trama. Los nombres de los productos génicos maduros derivados del procesamiento proteolítico se muestran en las diferentes cajas.

Los potyvirus son transmitidos por pulgones en un proceso definido de tipo no circulativo y no persistente (que será explicado más adelante en detalle, en el apartado 1.3.1.1). Dentro de los potyvirus, se encuentran más de 170 especies de virus distintas descritas hasta el momento, siendo *Watermelon mosaic virus* uno de los que ocasiona mayores daños sobre el cultivo de cucurbitáceas en la cuenca mediterránea.

### ***Watermelon mosaic virus***

*Watermelon mosaic virus* (WMV) es un patógeno de importancia mundial, que causa graves pérdidas económicas en cucurbitáceas, leguminosas,

malváceas y chenopodiáceas (Purcifull et al. 1984), especialmente en las regiones mediterráneas (Lecoq et al. 1998). WMV fue uno de los primeros potyvirus descritos como patógeno de cucurbitáceas (Webb y Scott, 1965). Se ha demostrado que WMV infecta más de 170 especies de plantas pertenecientes a 27 familias distintas (Shukla et al. 1994). Además, este virus es capaz de infectar un elevado número de malas hierbas, siendo estas un reservorio ideal para el virus donde esperar su oportunidad para diseminarse (Lecoq 1992). Este virus presenta una gama de huéspedes más amplia que la mayoría de potyvirus, produciendo distintos tipos de síntomas. En melón, se observa una reducción de la superficie de la hoja y aparece un mosaico muy característico sobre ella (Figura 5). Las proteínas virales en el genoma de WMV se expresan como una poliproteína que está flanqueada por UTRs en sus extremos (Desbiez y Lecoq 2004; Ali et al. 2006). Su genoma también incluye la característica región PIPO en una fase de lectura diferente.



**Figura 5.** Síntomas WMV en melón variedad Piel de Sapo T111, fotografiada a 36 dpi. Al centro y a la derecha se muestran detalles de síntomas en hojas (imágenes originales).

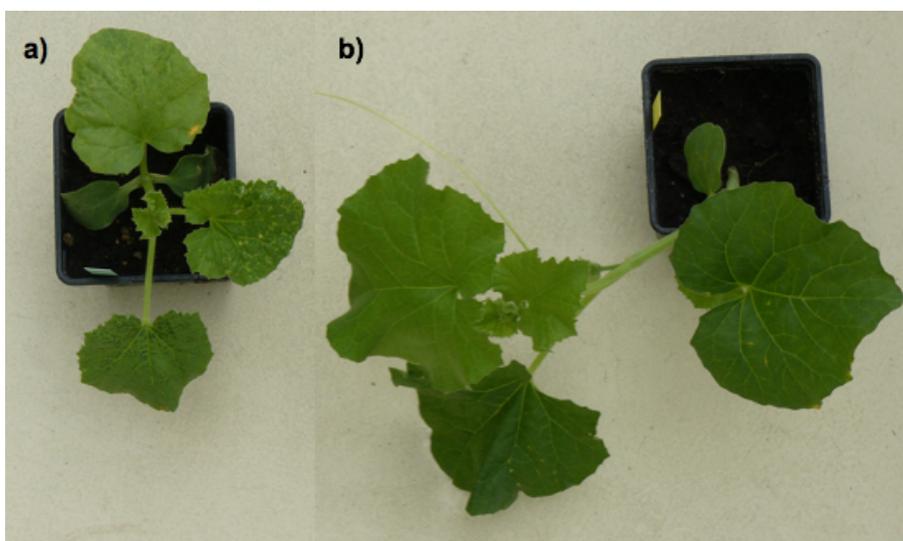
### 1.2.1.2 El género *Ipomovirus*

La organización genómica de los ipomovirus es similar a la de los miembros del género *Potyvirus*. Se trata también de virus compuestos por una cadena sencilla y positiva de RNA, de alrededor de 10 Kb, la cual se traduce en una poliproteína que cubre aproximadamente 3000 aminoácidos, la cual se procesa autocatalíticamente por proteasas virales dando lugar a diferentes productos génicos, la mayoría similares a los propios de potyvirus, aunque con algunas variaciones importantes (Valli et al. 2015). Hay que destacar la ausencia de región HC-Pro y la duplicación de P1 en algunos virus (Janssen et al. 2005; Li et al. 2008; Valli et al. 2006) así como la presencia en *Cassava brown streak virus* (CBSV) de una pirofosfatasa, posiblemente derivada del huésped (Mbanzibwa et al. 2009). Los virus de este género se caracterizan por presentar viriones flexuosos y filamentosos de entre 800 y 950 nm de longitud. A diferencia de los potyvirus, estos son transmitidos por mosca blanca de manera semipersistente (Andret-Link y Fuchs 2005). Además, todos los ipomovirus conocidos hasta el momento pueden ser transmitidos experimentalmente de manera mecánica y por injerto.

### ***Coccinia mottle virus***

*Coccinia mottle virus* (CocMoV), fue detectado por primera vez en Sudán, en 2012 (Desbiez et al. 2016). Este virus se ha descrito como patógeno específico de cucurbitáceas, no siendo capaz de infectar plantas de otras familias como *Nicotiana benthamiana*, *Pisum sativum* o *Chenopodium quinoa*. En condiciones de laboratorio, causa graves síntomas en las plantas huéspedes susceptibles, generando un retraso del crecimiento (Figura 6), además de un acusado marcado de venas y moteado, sobre todo en las primeras etapas de la infección. Este nuevo virus parece que

se mantiene en su hábitat natural a baja incidencia sobre plantas no cultivadas, sin que se sepa hasta el momento que sea capaz generar una epidemia en cultivos susceptibles. Se ignora si la ausencia de datos epidemiológicos podría estar relacionado con una baja transmisibilidad de CocMoV por genotipos locales de *B.tabaci*, o con una baja incidencia de fuentes de virus que todavía no han dado lugar a expansiones detectables.



**Figura 6.** Síntomas de CocMoV en melón variedad Vedrantaïs. a) Planta infectada. b) Planta control no infectada de la misma edad (ambas inoculadas en paralelo y fotografiadas a 21 dpi) (imagen original).

Considerando la importancia de las plantas silvestres como reservorio de virus que podrían surgir en los cultivos si se dan condiciones de diseminación más favorables (en fenómenos conocidos como de emergencia de virus), no podemos descartar que en el futuro CocMoV constituya una amenaza para las especies susceptibles. Por todo ello, se ha considerado interesante un estudio exhaustivo de este nuevo virus.

### 1.2.2 La familia *Closteroviridae*

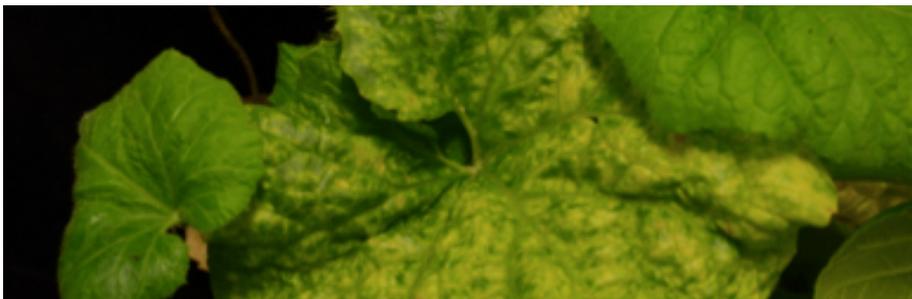
La familia *Closteroviridae* está compuesta por un grupo heterogéneo de virus fitopatógenos con genomas de RNA de cadena sencilla y sentido positivo de tamaño grande (15-30 kb) en comparación con otros virus similares. De hecho, hasta el momento, son los virus de plantas de RNA de cadena sencilla y positiva más grandes que se conocen (Dolja et al. 2006). Presentan largas partículas virales filamentosas y flexuosas de longitud entre 950-2200 nm y de anchura entre 10-13 nm. Los viriones presentan una morfología peculiar descrita como "serpiente de cascabel" o "rattlesnake" con dos sectores, uno mayoritario formado por el producto génico CP, que se continúa en otro sector denominado "cola" y formado por la variante CPm (Agranovsky et al. 1995). Estos virus están restringidos a células del tejido vascular del floema en las que inducen vesículas membranosas citoplasmáticas. Su rango de huéspedes es amplio, afectando a cultivos herbáceos y leñosos, y son transmitidos de manera semipersistente (modalidad explicada más adelante) por insectos pertenecientes a tres familias de homópteros: *Aleyrodidae* (moscas blancas), *Aphididae* (pulgones) y *Coccidae* (cochinillas) (Martelli et al. 2002). Estos virus han presentado problemas de clasificación, fundamentalmente por la aplicación de un criterio basado en caracteres morfológicos que era inadecuado para definirlos (Karasev 2000). En la actualidad, de acuerdo con el ICTV, esta familia se divide en 4 géneros distintos, siendo el más numeroso el género *Crinivirus* el cual incluye 14 especies distintas. Los otros géneros reconocidos son *Ampelovirus* (9 virus), *Closterovirus* (13 virus) y *Velarivirus* (7 virus), existiendo también 6 especies no asignadas a género (ver <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>).

### 1.2.2.1 El género *Crinivirus*

Este género se caracteriza por sus partículas virales flexuosas y filamentosas, de entre 650 y 850 nm de longitud y 12 y 14 nm de diámetro. Su genoma puede ser bipartito o tripartito, constando de dos o tres cadenas sencillas de RNA positivo, de entre 15,3 y 17,7 Kb en total (Kreuze et al. 2002; Liu et al. 2000; Tzanetakis et al. 2013). Cada una de las cadenas codifican diferentes proteínas en distintas ORFs. A diferencia de los potyvirus, no presentan poliA en el extremo 3'. El género *Crinivirus*, incluye a los miembros de la familia *Closteroviridae* transmitidos por mosca blanca de manera no circulativa y semipersistente (ver apartado 1.3.1.2). Los crinivirus son responsables de importantes pérdidas de cosecha en cucurbitáceas, tanto en campo como en invernadero (Navas-Castillo et al. 2011).

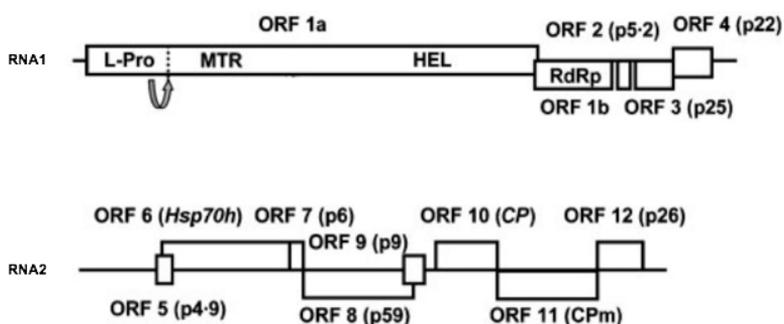
### ***Cucurbit yellow stunting disorder virus***

Desde el punto de vista económico y epidemiológico, a día de hoy, CYSDV es probablemente uno de los virus que mayor amenaza presenta sobre los cultivos de cucurbitáceas en algunas regiones (Abrahamian y Abou-Jawdah 2014). Este virus, también llamado virus del amarilleo enanizante o del enanismo amarillo de las cucurbitáceas (Figura 7), fue descrito por primera vez en los Emiratos Árabes en 1982 (Hassan y Duffus 1991). En 1996, se encontró por primera vez en España sobre melón y pepino siendo transmitido de forma semipersistente y específicamente por *B. tabaci* (Celix et al. 1996). Este virus, como el resto de virus de la familia, se encuentra restringido al floema y no puede transmitirse de manera mecánica. Tampoco existen evidencias de que pueda ser transmitido por semilla (Navas-Castillo et al. 2014).



**Figura 7.** Detalle de síntoma de amarilleo originado por CYSDV en plantas de melón variedad Piel de Sapo T111(imagen original).

La incidencia del ‘amarilleo de las cucurbitáceas’ está aumentando en los cultivos protegidos del sudeste español, probablemente por los problemas de control que presentan las poblaciones de sus vectores, convirtiéndose en una enfermedad que se extiende por gran parte de la cuenca mediterránea (Lecoq y Desbiez 2012). Su genoma está estructuralmente dividido en dos cadenas sencillas y positivas de RNA, denominadas RNA1 y RNA2, la primera de las cuales tiene aproximadamente 9Kb, y la segunda aproximadamente 8Kb. Cada uno de los RNAs codifican distintas proteínas en múltiples ORFs (Figura 8).



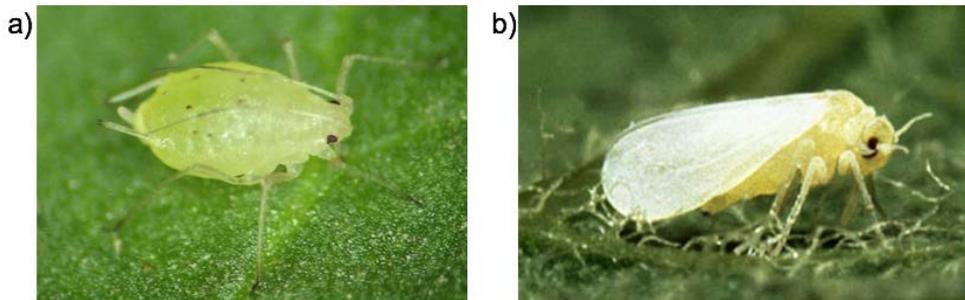
**Figura 8.** Organización genómica del crinivirus CYSDV. El RNA (bipartito) se representa como una línea, con las ORFs encima como cajas, indicando los distintos productos génicos que generan.

### 1.3 Transmisión de virus de plantas

La forma más sencilla, para un virus vegetal, de invadir una nueva planta es aprovechar las vías de propagación de la planta huésped. Muchas plantas cultivadas se propagan vegetativamente mediante tubérculos, rizomas, bulbos, estolones, esquejes o injertos sobre un patrón. Si estos propágulos se toman de una planta infectada, la nueva planta que se desarrollará a partir de ellos estará igualmente infectada ya que los virus presentes invaden fácilmente los nuevos tejidos formados a partir del propágulo, o se diseminan por el portainjerto o la variedad injertada. Esta puede llegar a ser la principal vía de dispersión de virus en algunos cultivos importantes como la patata, la fresa o la mayoría de frutales que tienen una propagación vegetativa. En plantas de propagación por semilla, también algunos virus son capaces de penetrar en los órganos reproductivos del huésped (ovarios y/o polen) permaneciendo en la semilla, y luego invadiendo la nueva planta que se desarrollará a partir de esta (Hull 2009).

Para infectar nuevas plantas separadas del origen del inóculo, los virus tienen que superar el obstáculo que representa la pared celular vegetal, algo que pueden lograr por dos vías: 1) aprovechando heridas no letales para las células, o 2) utilizando la acción de distintos seres vivos (denominados vectores). La primera de estas vías, conocida como transmisión mecánica, es frecuente en virus con altos niveles de acumulación en células epidérmicas de sus huéspedes. Estos virus aprovechan fácilmente las microheridas producidas en las hojas por el viento, el roce de la maquinaria, de animales o heridas causadas por ejemplo por intervención humana durante prácticas culturales (desbrotado, poda) para pasar de unas plantas a otras. Por otro lado, la dispersión por vectores es la vía natural utilizada por los virus para pasar de unas plantas a otras, siendo la mayoría de los virus transmitidos de

esta forma. Los artrópodos herbívoros, nematodos fitófagos, y hongos y organismos similares son los principales tipos de vectores de virus vegetales (Roossinck 2015). Entre ellos, los pulgones y las moscas blancas (Figura 9) tienen la capacidad de transmitir el mayor número de especies de virus conocidos.



**Figura 9.** Vectores transmisores de virus. a) Pulgón *Myzus persicae* (imagen extraída de <https://www.cropscience.bayer.us>). b) Mosca blanca *Bemisia tabaci* (imagen extraída de <https://www.gob.mx/senasica>)

### 1.3.1 Tipos de transmisión de virus de plantas por insectos

La transmisión de los virus a través de un vector, a diferencia de la transmisión mecánica, es un proceso sumamente específico y en ocasiones bastante complejo, que depende de distintas interacciones entre el virus, el vector y la planta. Los distintos modos de transmisión de virus por vectores se clasifican atendiendo principalmente a los tiempos de adquisición-inoculación-retención del virus por parte del insecto vector en transmisión no persistente, semipersistente o persistente.

### **1.3.1.1 Transmisión no persistente**

La transmisión no persistente se caracteriza por tener periodos muy cortos de adquisición y retención del virus. Este tipo de transmisión únicamente sigue un modo no circulativo, es decir el virus adquirido por el vector al alimentarse en células infectadas permanece en el tracto digestivo pero sin necesidad de cruzar barreras celulares del vector (por tanto se localiza en el exterior topológico), no existe un periodo de latencia entre la adquisición del virus y la capacidad del vector para transmitirlo, y esta capacidad se pierde en el proceso de muda. Todos los virus transmitidos de manera no persistente descritos hasta la fecha tienen como vectores exclusivamente pulgones (Ng y Falk 2006). La adquisición y la inoculación se producen durante las breves inserciones de prueba que realiza el pulgón sobre la planta para comprobar si es un huésped apropiado (Powell et al. 1995). El virus es retenido en el aparato bucal del pulgón, en la región del estilete donde se unen el canal alimenticio y el salival (Ammar et al. 1994; Wang y Pirone 1999). La eficiencia del proceso disminuye cuando el tiempo de adquisición aumenta y además el rendimiento es mayor si los pulgones se someten a un ayuno previo (Wang y Pirone 1999). Un aspecto importante en la transmisión no persistente es la dependencia de factores auxiliares en algunos casos, como por ejemplo en potyvirus, donde se precisa la intervención de un producto génico viral, la proteína HC-Pro, para la correcta adquisición y transmisión del virus (Pirone y Blanc 1996).

### **1.3.1.2 Transmisión semipersistente**

La transmisión semipersistente se distingue por tener periodos de adquisición e inoculación algo más largos que la no persistente (Palacios et al. 2002) pudiendo mantenerse la capacidad virulífera del vector

durante horas e incluso días. Sin embargo, el virus sólo es retenido en el aparato digestivo del vector sin atravesar barreras celulares, por lo que al igual que ocurre en la forma no persistente, se trata de una transmisión de modo no circulativo. La adquisición del virus se produce en el floema, y el vector necesita de cierto tiempo para alcanzar este tejido, lo que explica que normalmente a mayores tiempos de adquisición, mayor será la eficacia del proceso. Los virus del género *Crinivirus* son transmitidos de forma semipersistente por mosca blanca. En este caso también la inoculación y la adquisición están asociados con la alimentación por parte del vector en tejido floemático (Johnson et al. 2002) y no parece haber una implicación de proteínas no estructurales de origen viral (Tian et al. 1999).

#### **1.3.1.3 Transmisión persistente.**

El tipo de transmisión persistente requiere tiempos de adquisición y de inoculación largos de horas e incluso días. En este caso, el virus adquirido necesita atravesar barreras celulares del vector para ser translocado dentro del mismo a través de la hemolinfa hasta las glándulas salivares, desde donde el virus es inoculado a la nueva planta al alimentarse, siendo este modo de transmisión conocido como circulativo. Este proceso, requiere un tiempo de latencia tras la adquisición durante el cual el vector no tiene capacidad transmisora. La mayoría de los virus transmitidos de este modo están restringidos al floema en su planta huésped, son transmitidos por artrópodos y el virus atraviesa barreras celulares del insecto. La transmisión persistente circulativa puede ser no propagativa, si el virus no se replica en las células del vector, o propagativa, cuando esta replicación tiene lugar, y por tanto el vector también es huésped del virus. Una minoría de los virus de plantas, son circulativos propagativos. Estos virus pertenecen a familias cuyos

miembros pueden infectar plantas o animales (*Rhaboviridae*, *Reoviridae*, *Bunyaviridae*), y se replican en sus insectos vectores (Blanc y Michalakakis 2016). Se cree que evolutivamente estos virus pueden provenir de virus de insectos que han adquirido secundariamente la capacidad de replicarse e infectar plantas (Gray y Banerjee 1999; Hogenhout et al. 2008; Nault 1997). Algunos virus circulativos y propagativos pueden pasar a la descendencia del vector (Chen y Wei 2016). La transmisión persistente circulativa y no propagativa ha sido bien estudiada en el caso de los Luteovirus, transmitidos por pulgones. En este caso, el virus es ingerido por el vector y transportado hasta las glándulas salivares desde donde es inoculado junto con la saliva en posteriores alimentaciones del vector (Brault et al. 2007; Seddas et al. 2004). Un caso de transmisión persistente circulativa y propagativa es el de los tospovirus transmitidos por trips, como por ejemplo, el virus del marchitamiento moteado del tomate (*Tomato spotted wilt virus*) el cual se multiplica en las células de su vector, y una vez que los trips adquieren el virus lo pueden transmitir mientras vivan (Avila et al. 2006).

### **1.3.2 Vectores de transmisión de virus de plantas**

Como se ha indicado anteriormente, la dispersión natural por vectores es la vía más utilizada por los virus para pasar de unas plantas a otras. De las más de 380 especies de animales citadas como vectores de virosis vegetales, aproximadamente el 95% son artrópodos (Harris 1990). De ellas, más del 75% corresponden a insectos del orden hemíptera (Nault 1997), siendo los pulgones y las moscas blancas los que tienen la capacidad de transmitir el mayor número de especies de virus. La transmisión de los virus a través de un vector es un proceso sumamente específico. En general, cada virus puede transmitirse solamente por un

tipo de vector mientras que cada especie de vector es capaz de transmitir diferentes virus (Gergerich y Dolja 2006).

### **1.3.2.1 Moscas blancas**

La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) es una de las plagas más ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales del mundo donde afecta más de 600 especies de plantas cultivadas y silvestres (Morales y Anderson 2001; Oliveira et al. 2001) *Bemisia tabaci*, también conocida como la mosca blanca del algodón, del tabaco o de la batata, fue originalmente observada sobre plantas de tabaco en Grecia por Gennadius en el año 1889, y en su momento fue descrita como *Aleyrodes tabaci* (Gennadius 1889). Algunas fuentes sugieren que *B. tabaci* puede ser originaria de África tropical, desde donde se dispersó a Europa y Asia, y posteriormente fue introducida al Neotrópico, principalmente debido al transporte de material de plantas (Brown 1992; Campbell et al. 1996). Sin embargo, otras fuentes indican que esta especie puede ser nativa de India o Pakistán, donde se ha encontrado la mayor diversidad de especies de sus enemigos naturales (Brown et al. 1995). Estudios recientes sugieren que *B. tabaci* es realmente un complejo de especies, entre las cuales destacan MEAM1 y MED (De Barro et al. 2011). El adulto, de 1-2 mm de longitud, es de color amarillo con el cuerpo y alas revestidos de una cera pulverulenta y su periodo de vida puede llegar hasta 5 semanas. Una sola hembra puede poner entre 200 y 400 huevos durante toda su vida, los cuales son colocados en el envés de las hojas, mediante un pedúnculo corto. Al eclosionar estos, las ninfas recién emergidas pasan a succionar la savia de las hojas. En la fase inicial, las ninfas N1 son móviles y pueden desplazarse una distancia limitada a unos 1-2 mm en la hoja, mientras que el resto de estadios ninfales, N2, N3 y N4 permanecen inmóviles en

la superficie del envés. En ocasiones, hay un siguiente estadio ninfal que presenta un color amarillo-rojizo denominado pupa, y de él emerge el adulto en una semana aproximadamente (Baig et al. 2015). *B. tabaci* es un fitófago de gran importancia económica por la magnitud de los daños causados y por su difícil control debido a su amplia gama de huéspedes potenciales, así como al breve tiempo que transcurre entre generaciones (Oliveira et al. 2001; Global Invasive Species Database 2016). Un adulto de mosca blanca puede consumir en un día seis veces su peso y un inmaduro ocho veces, debido a su activo metabolismo y a la constante excreción de líquido (Suarez-Gonzalez et al. 2015). En España, la primera cita que se tiene de *B. tabaci* es de Gómez-Menor en una publicación de 1943 “Contribución al conocimiento de los Aleyrodidos de España” (Hem., Homoptera), donde fue descrita como plaga ocasional en algunos cultivos hortícolas (Gómez-Menor 1943). Aunque de años siguientes se encuentran referencias sobre daños en importantes cultivos como patata, judía, berenjena, tabaco y algodón (Alfaro 1953, Domínguez 1961, Izquierdo y Duran 1976), no es hasta el año 1988 cuando este insecto recibe interés como plaga importante debido a los daños directos e indirectos que ocasiona en cultivos de invernadero y al aire libre tanto en la Península como en Canarias y Baleares (Carnero et al. 1990; Guirao et al. 1997; Lacasa et al. 1997).

Las moscas blancas se desarrollan óptimamente en climas cálidos, donde son una grave amenaza para los cultivos. Se alimentan del floema, y pueden transmitir más de 150 virus de manera semipersistente o persistente. Los virus de la familia *Closteroviridae*, donde se enmarca como hemos visto CYSDV dentro del género *Crinivirus*, así como los virus del género *Ipomovirus*, los cuales se enmarcan dentro de la familia *Potyviridae*, son transmitidos de manera semipersistente por moscas blancas (Ng y Falk 2006). Los begomovirus, también son transmitidos por mosca blanca, en este caso de manera persistente (Whitfield y Rotenberg

2015). Es el caso de *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), el cual puede causar pérdidas económicas de hasta 100% en cultivos de solanáceas en muchas regiones tropicales y subtropicales (Picó et al. 1996; Shadmany et al., 2013). Otros virus importantes en nuestro país, como torradovirus, también son transmitidos por mosca blanca (Gómez et al. 2012).

### 1.3.2.2 Pulgones

Los pulgones son insectos hemípteros que se encuadran dentro de la familia *Aphididae*. Constituyen un grupo muy extenso de insectos y están distribuidos por todo el mundo, especialmente en zonas templadas. Se trata del grupo más importante de todos los vectores de virus de plantas (Feres y Moreno 2009) debido a sus especiales características biológicas (altas tasas de crecimiento de la población, ciclo de vida muy corto y alto potencial de dispersión). Son de tamaño pequeño, entre 1 y 4 mm, de colores variados, sobre todo verdes, amarillos o negros. Poseen antenas segmentadas. El cuerpo es ovoidal, sin distinción aparente entre sus tres regiones (cabeza torax y abdomen). Al final del abdomen, presentan dos sifones por los que vierten sustancias que repelen a sus depredadores naturales. También producen una secreción azucarada conocida como melaza, gracias a la cual establecen una relación simbiótica con las hormigas, las cuales se alimentan de la melaza y a cambio protegen a los pulgones de sus depredadores especializados, como las mariquitas. La mayoría de los pulgones vectores de virus reportados pertenecen a los géneros *Acyrtosiphon*, *Aphis*, *Macrosiphum* y *Myzus* (Kennedy et al. 1962). Los pulgones *Aphis gossypii* (Glover) y *Myzus persicae* (Sulzer) se encuentran entre las especies de pulgones de mayor importancia agrícola a nivel mundial (Blackman y Eastop 2007). Existen distintas especies de pulgones que actúan como vectores de distintos virus, de manera no persistente (*Potyvirus*, *Cucumovirus*,

*Caulimovirus*) o persistente (*Luteovirus*) (Whitfield et al. 2015). Muchas especies solo afectan a una especie de cultivo (monófagas) y otras lo hacen a un gran número de ellos (polífagas). Dentro de una misma especie, los individuos de la población pueden tener diferencias morfológicas importantes y ser ápteros (sin alas) o alados. En este caso, tienen dos pares de alas membranosas, relativamente pequeñas y transparentes. Para algunas combinaciones de virus-vector, la interacción entre el virus y su vector es de tipo no persistente como ya hemos mencionado, y es el resultado de la fijación del virus a las superficies externas de las partes bucales del vector, o directamente por interacción de las partículas virales o bien a través de factores ayudantes, como por ejemplo en los virus del género *Potyvirus* (Pirone y Blanc 1996). Contrariamente, en otros casos como los virus de la familia *Luteoviridae* se precisa una circulación en sus vectores a través de la pared intestinal hacia la cavidad corporal, pasando de ahí a la saliva del áfido (Gray y Gildow 2003).

### **1.3.3 Monitorización del comportamiento alimenticio de los insectos**

El uso de un sistema de monitorización electrónica o técnica de gráficos de penetración eléctrica (conocido por las siglas EPG, del inglés "Electrical Penetration Graph") hace posible el estudio del comportamiento de prueba y alimentación de los insectos, proceso que incluye una serie de actividades que no pueden ser observadas directamente. El primer dispositivo electrónico desarrollado en los años 60 por McLean y Kinsey (1964) permitía estudiar el comportamiento alimenticio del pulgón por medio del registro de ondas de origen electrónico aplicando un voltaje de corriente alterna (sistema AC). Posteriormente, el dispositivo fue modificado sustituyéndose la AC por corriente continua (DC) (Tjallingii 1978; 1985). Este sistema además de

los cambios en la resistencia eléctrica en la planta y el insecto, mide también los cambios en las fuerzas electromotrices originados por el comportamiento de alimentación del insecto en los distintos tejidos vegetales. Con la utilización de la técnica de EPG se ha conseguido caracterizar el comportamiento de numerosas especies de hemípteros (Lei et al. 2016). Los estudios realizados empleando la técnica EPG han sido aplicados en el avance del conocimiento de los procesos de transmisión viral (Collar et al. 1997; Collar y Fereres 1998; Fernández-Calvino et al. 2006; Martin et al. 1997; Moreno et al. 2005; Palacios et al. 2002; Powell et al. 1995; Powell 1991; Prado y Tjallingii 1994), en el comportamiento frente a plantas infectadas (Carmo-Sousa et al. 2014; Moreno-Delafuente et al. 2013), en resistencias a variedades vegetales (Alvarez et al. 2006; Garzo et al. 2002), en estudios con plantas transgénicas (Liu et al. 2000; Xiang et al. 2005) así como en la acción de los insecticidas (Kaufmann et al. 2004; Nisbet et al. 1993) entre otras. Los distintos patrones de onda EPG (Figura 10), originados principalmente por los cambios de voltaje debido a las variaciones en la resistencia eléctrica del circuito según la posición de los estiletes en los distintos tejidos de la planta y las variaciones en las fuerzas electromotrices durante la alimentación del pulgón, permiten conocer el desarrollo del proceso, así como su correlación con las actividades o pautas concretas de comportamiento de los insectos vectores. A continuación se describen brevemente los principales patrones de ondas EPG:

- **Onda A:** Es una onda irregular y de corta duración (<10 s) que tiene lugar al comienzo de la prueba, y que se asocia al contacto eléctrico del estile con la epidermis de la planta.

- **Onda B:** Este tipo de onda se relaciona con la formación de la saliva gelificante requerida para la formación de la vaina salival (Tjallingii 1978),

y se trata de una interfase entre las ondas A y C que consiste en una serie de pulsos regulares de baja frecuencia (0,2-0,3 Hz).

- **Onda C:** Es el patrón de onda más complejo. Probablemente está originada por la suma de un conjunto de actividades desarrolladas por los estiletes. Al igual que las ondas A y B, se trata de una onda con potencial extracelular (entre la epidermis y el floema) en busca de los tejidos vasculares (Tjallingii, 1988).

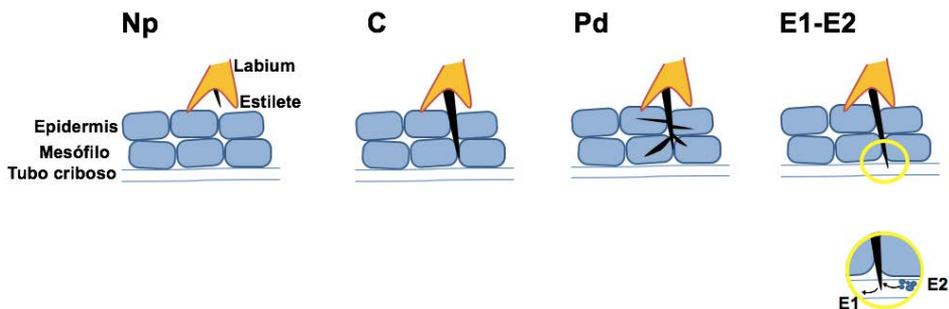
- **Onda *pd*** (“*potencial drop*”): Incluida dentro del patrón de onda C, la *pd* se asocia a la penetración de los estiletes maxilares en el interior celular. La identificación de las *pds* se facilita por sus tres fases consecutivas (Tjallingii 1985): fase I, donde se produce una brusca caída del potencial consecuencia de la perforación de la membrana celular por el estilete; fase II, o fase intracelular de la *pd*, con potencial negativo y que a su vez se divide en tres subfases: II-1 (asociada a inoculación de los virus de transmisión no persistente, Martin et al. 1997), II-2 (asociada a inoculación de los virus de transmisión semipersistente, Moreno et al. 2012) y II-3 (asociada con la adquisición de los virus de transmisión no persistente, Collar y Fereres 1998; Martin et al. 1997; Powell et al. 1995) y fase III en la que se recupera de nuevo el potencial extracelular debido al abandono de los estiles del citoplasma celular.

- **Onda E:** Se asocia generalmente a un potencial intracelular y ha sido correlacionado con la acción de la bomba salival, con la penetración en los tejidos floemáticos (Kimmins y Tjallingii 1985) y con la ingestión (Tjallingii, 1987). En la onda E podemos distinguir dos tipos de ondas: **E1** que está asociada con salivación en el floema y con la inoculación de virus persistentes (Prado y Tjallingii 1994) y la **E2** se ha relacionado con la ingestión floemática y con la adquisición de virus persistentes

acompañada de secreción periódica de saliva acuosa, reingerida por el pulgón (Prado y Tjallingii 1994).

- **Onda G:** Onda de potencial extracelular que se correlaciona con la penetración de los estiletes en los vasos de xilema y con un proceso de ingestión activa para vencer la presión negativa a la que está sometida la savia que circula por el xilema de la planta (Spiller et al. 1990).

- **Onda F:** Parece estar asociada al trabajo mecánico realizado por el estilete como resultado de las dificultades que encuentra en su penetración en el tejido vegetal. Su potencial es extracelular.



**Figura10.** Ejemplos de relación entre penetración del estilete del pulgón y las ondas obtenidas. Np: no penetración del estilete; C: onda producida debido al avance extracelular del estilete; Pd: "potencial drop" se asocia a la penetración de los estiletes maxilares en el interior celular; E1-E2: asociadas con salivación en el floema e ingestión floemática respectivamente.

#### 1.4 Interacción planta-patógeno vector

Para cumplir los procesos necesarios durante su ciclo como parásitos moleculares, los virus utilizan energía y factores como determinadas proteínas funcionales de la célula huésped. Durante cada etapa del ciclo

viral se generan distintas interacciones entre la planta huésped y el virus. Si la planta no es capaz de reconocer al virus y desencadenar una respuesta de exclusión, se establece una interacción compatible entre la planta huésped y el virus, siendo esta interacción favorable para el virus (Hammond-Kosack y Jones 1997). Por el contrario, si la planta reconoce y reacciona ante el patógeno, se puede establecer una interacción incompatible, desfavorable para el virus, ya que en estas condiciones, la planta desencadena respuestas de defensa que pueden limitar la replicación y el movimiento del virus. Se pueden distinguir tres tipos de interacción planta-patógeno: 1) la susceptibilidad, donde el patógeno coloniza al huésped ocasionándole graves daños incluso la muerte; 2) la resistencia, donde el huésped se impone al patógeno dando lugar a la reducción o desaparición del mismo (Eenink 1977) y por último, 3) la tolerancia, donde aun habiéndose establecido una relación parasítica, los daños producidos por el patógeno se traducen en una mínima reducción de la calidad o cantidad de la cosecha (Robinson, 1969). La tolerancia, a pesar de limitar el daño, no suele considerarse en muchos casos un carácter totalmente deseable ya que la planta se comporta como reservorio del patógeno (Russell 1978).

Los patosistemas planta-patógeno-vector, son muy complejos ya que la planta, el patógeno y el vector pueden interactuar entre sí de manera tanto directa como indirecta. En primer lugar, el patógeno depende del vector para su transmisión y dispersión. Además, el patógeno puede afectar directamente al vector debido a su presencia y posible replicación dentro del vector. Por otra parte, el patógeno y el vector pueden competir directamente por la misma planta huésped, y además ambos pueden inducir mecanismos de defensa en la planta, afectándose así indirectamente a través de la respuesta de la planta (Belluire et al. 2005). Existe mucha controversia entre estas complejas interacciones, debido a que cada patosistema se puede comportar de una manera específica y

no generalizable, ya que por ejemplo la distribución final de los virus en los tejidos u órganos de una planta puede no ser uniforme y es influenciada por el tipo de virus, el huésped y la interacción entre ambos (Agrios 1988; Hull 2013; Matthews 1992; Scholthof 2005). Por ejemplo, en el caso del patosistema tabaco-*Bemisia tabaci*-TYLCCNV la fecundidad y puesta de huevos por parte del insecto vector, es mucho mayor en presencia del virus (Guo et al. 2010), mientras que en el patosistema arroz-*Sogatella furcifera*-SRBSDV la fecundidad y puesta de huevos disminuye considerablemente en presencia del virus (Xu et al. 2014). Así pues, los virus pueden llegar hasta a modular la fecundidad y puesta de huevos por parte de su vector, y con ello condicionar su propia dispersión. Además, los patógenos y sus vectores pueden interactuar directa o indirectamente a través de sus huéspedes compartidos, con implicaciones para la persistencia y propagación del patógeno en numerosos sistemas biológicos (Hurd 2003; Lefèvre y Thomas 2008). Por ejemplo, algunos virus de plantas inducen cambios en las plantas huésped que hacen que los áfidos que pueden portar estos virus se establezcan preferentemente en plantas infectadas, con implicaciones para la propagación del virus (Castle y Mowry 1998; Eigenbrode et al. 2002; Jiménez-Martínez et al. 2004; Mauck et al. 2010; McMenemy et al. 2012; Srinivasan et al. 2013). Es conocido que la superpoblación de pulgones y otros insectos hemípteros en la planta huésped, aumenta la producción de individuos alados. En las plantas infectadas por virus transmitidos por pulgones, a menudo se observa un mayor número de áfidos alados, y esto podría ser debido al aumento de la población gracias a la presencia del virus (Müller et al. 2001). Así pues, estas observaciones pueden interpretarse como una manipulación por parte del virus encaminada a aumentar la emigración de los pulgones a partir de las plantas infectadas, generando una mayor dispersión viral a larga distancia (Higashi y Bressan 2013). Además, recientemente se ha

demostrado que las preferencias alimentarias o el comportamiento alimentario de los insectos vectores de virus de plantas pueden ser alterados después de la exposición a plantas infectadas y la adquisición de virus (Moreno-Delafuente et al. 2013; Stafford et al. 2011). En lo que se ha denominado recientemente una estrategia de atracción-repulsión o "pull-push" (Carmo-Sousa et al. 2014), las plantas de calabaza infectadas por CMV "atraen" a los vectores de áfidos a través de emisiones volátiles mejoradas y los "repelen" o disuaden de establecerse, y por tanto obligan a alejarse de la planta infectada tan pronto como han adquirido el virus, gracias a compuestos químicos producidos en las plantas infectadas (Mauck et al. 2014). Cuando esto ocurre y la preferencia del vector cambia después de la adquisición del virus, aumenta la tasa de propagación del patógeno (Ingwell et al. 2012). Este tipo de fenómeno ha sido especialmente bien documentado para dos patosistemas: el patosistema de trigo-*Rhopalosiphum padi* (L.)-*Barley yellow dwarf virus* (BYDV, *Luteoviridae*, luteovirus) y el patosistema patata-*M.persicae* (Sulzer)-*Potato leafroll virus* (PLRV, *Luteoviridae*, polerovirus) (Bosque-Pérez y Eigenbrode 2011). En el primer caso, el vector, *R. padi*, se instala preferentemente en plantas de trigo infectadas con BYDV frente a controles no inoculados, mientras que tras la inoculación artificial, preferentemente se asienta en plantas no infectadas después de haber adquirido el virus. Este efecto se observó en áfidos que adquirieron el virus sin contacto con plantas infectadas, ingiriendo los virus a partir de una dieta líquida que contenía partículas virales, demostrando un efecto directo de BYDV sobre su vector natural (Ingwell et al. 2012). Respecto al segundo caso, *M. persicae* es el vector principal de PLRV (Peters 1987; Raman y Radcliffe 1992), transmitiendo el virus de una manera persistente y circulativa. El crecimiento, la fecundidad y la longevidad de *M. persicae* son mayores cuando se alimentan en plantas de patata infectadas con PLRV que en plantas no infectadas (Castle y Berger

1993). Por otro lado, las formas no aladas de este áfido se asientan preferentemente en plantas infectadas con PLRV en comparación con controles sin infectar (Castle y Mowry 1998; Eigenbrode et al. 2002). El establecimiento preferente de *M. persicae* en plantas infectadas con PLRV está mediado por señales olfativas, al menos dentro de las primeras 12-24 h de exposición (Eigenbrode et al. 2002; Ngumbi et al. 2007). Las mezclas de compuestos orgánicos volátiles y las respuestas de áfidos son dinámicas, y van cambiando con la progresión de la enfermedad y la edad a la que se inoculan las plantas (Rajabaskar et al. 2013). La evaluación de las preferencias de los áfidos virulíferos es crítica para comprender las interacciones planta-vector-virus y sus implicaciones para la propagación de la enfermedad.

#### **1.4.1 Infecciones mixtas de virus en plantas.**

Las infecciones mixtas de virus en plantas son muy comunes en la naturaleza (Malpica et al. 2006; Pruss et al. 1997; Syller 2012). Estas ocurren cuando dos o más virus invaden a un mismo huésped y son capaces de establecer infecciones. Cuando la infección por estos virus tiene lugar al mismo tiempo o simultáneamente, se conoce como co-infección; de lo contrario, si la llegada tiene lugar en tiempos distintos, se denomina super-infección del segundo virus sobre una planta previamente infectada por el primero (Miralles et al. 2001; Saldaña et al. 2003). Las interacciones entre los distintos virus en infecciones mixtas pueden ser sinérgicas, cuando un virus aumenta la virulencia o complementa los defectos del otro, ayudándolo a replicarse, a moverse sistémicamente o a ser transmitido por organismos vectores (Hisa et al. 2014), viéndose el huésped perjudicado de uno u otro modo. O antagónicas, cuando la aptitud de un virus se ve disminuida por la presencia de otro (Syller 2012). En este caso, desde un punto de vista

práctico, el uso de co-infecciones puede ser empleado para la protección cruzada, cuando el virus 1 afecta negativamente sobre el virus 2 (siendo el virus 1 leve y el 2 grave) protegiendo así al huésped del virus más agresivo (Elena et al. 2014). En ocasiones se producen interacciones complejas virus-virus que pueden ser sinérgicas y antagónicas, según sean los efectos para cada uno de los participantes, por ejemplo cuando uno de los virus es beneficiado, y su presencia y actividad disminuyen la aptitud del segundo virus (Mascia y Gallitelli 2016). En muchos casos, las infecciones mixtas de virus en plantas dan lugar a enfermedades definidas, consecuencia de las interacciones complejas que tienen lugar, lo cual se refleja en una grave pérdida de cosecha, conllevando asociadas pérdidas económicas. Un ejemplo bien estudiado de ello, es la enfermedad causada por el virus Y de la patata (PVY, potyvirus), que favorece la replicación del virus X de la patata (PVX, potexvirus) (Barker y Dale 2006; Hameed et al. 2014; Pruss et al. 1997; Vance et al. 1995). El PVX puede interactuar sinérgicamente con otros potyvirus, tales como *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) y *Tobacco etch virus* (TEV) (Vance et al. 1995). Otros casos descritos de efectos sinérgicos causados por un potyvirus sobre otros virus son: PVY con PLRV (Barker, 1987); *Soybean mosaic virus* (SMV), con *Bean pod mottle virus* (BPMV) o con *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (Anjos et al. 1992; Calvert y Ghabrial 1983;); *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) con *Cucumber mosaic virus* (CMV) o con *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) (Bourdin y Lecoq 1994; Poolpol e Inouye 1986); *Turnip mosaic virus* (TuMV) con CMV o con *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) (Sano y Kojima 1989; Takeshita et al. 2012; Wang et al. 2009) y WMV con CMV (Wang et al. 2002). En la mayoría de todos estos casos, los potyvirus generalmente no se vieron afectados o disminuyeron muy ligeramente en carga viral, mientras que la acumulación del otro virus (no potyvirus) aumenta considerablemente. Sin embargo, en otros casos, se

ha observado la relación inversa, en la que la acumulación del potyvirus aumenta, y la del acompañante no potyvirus tiende a permanecer constante. Este es el caso del sinergismo causado en plantas de batata por el potyvirus *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) y el crinivirus *Sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) (Cuellar et al. 2008; Karyeija et al. 2000; Mukasa et al. 2006; Tugume et al. 2013) donde el potyvirus aumenta muy notablemente su carga viral en infección mixta, mientras que el crinivirus no se ve afectado. Esto mismo ocurre en el caso del potyvirus PVY en *Solanum brevidens* co-infectado con *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Valkonen 1992). También se han reportado diferencias en la acumulación de virus y la alteración de los patrones de acumulación en las infecciones mixtas en comparación con una sola infección, en diferentes huéspedes. Es el caso de *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), donde en plantas de *N. benthamiana* doblemente infectadas, los títulos de TICV aumentaron y los de ToCV disminuyeron, en comparación con las concentraciones en plantas infectadas individualmente, mientras que en plantas de *Physalis wrightii* co-infectadas con estos mismos virus, disminuyeron los títulos virales en infecciones mixtas en ambos casos (Wintermantel et al. 2008). Lo mismo ocurre con los virus *Pepper huasteco virus* (PHV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), los cuales causan sinergismo en plantas de tabaco y *N. benthamiana*, mientras que se observa antagonismo en plantas de pimiento (Méndez-Lozano et al. 2003).

En ocasiones, el resultado de las infecciones mixtas se ve reflejado en aspectos relacionados con la transmisión de los virus, como es el caso de los virus *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) y *Rice ragged stunt virus* (RRSV) que causan un sinergismo que conlleva un aumento de la adquisición de RRSV por parte de su vector natural (Li et al. 2014).

Recientemente, se han estudiado interacciones de virus en infecciones mixtas, donde el momento de entrada de cada uno de los virus marca el transcurso de los acontecimientos. Un ejemplo de ello, es el estudio de dos virus no relacionados que infectan *Carica papaya*, *Papaya ringspot virus* (PRSV) de la familia *Potyviridae* y *Papaya mosaic virus* (PapMV), un potexvirus de la familia *Alphaflexiviridae*. PRSV es un patógeno devastador de papaya, y se considera el virus más importante desde el punto de vista económico que afecta a este cultivo debido a su distribución mundial (Tripathi et al. 2008). En este caso, se ha observado antagonismo cuando la infección por PapMV ocurre antes de la infección por PRSV. En cambio, cuando PRSV es inoculado primero o al mismo tiempo que PapMV, se produce sinergismo (Chávez-Calvillo et al. 2016).

En cucurbitáceas, son muy comunes las infecciones mixtas por virus en condiciones naturales, como sugieren los datos de estudios prospectivos en zonas de cultivo (Gil-Salas et al. 2011; Gil-Salas et al. 2012; Salvaudon et al. 2013; Sufrin-Ringwald y Lapidot 2011). Es el caso por ejemplo de los potyvirus WMV y ZYMV, los cuales coexisten frecuentemente en poblaciones de cucurbitáceas y son transmitidos por los mismos vectores naturales : áfidos. En el caso de plantas doblemente infectadas con estos virus, se observa que la carga viral de ZYMV es similar a la que se observa en infecciones sencillas, mientras que WMV se acumula a niveles significativamente más bajos en presencia de ZYMV (Salvaudon et al. 2013). Otro ejemplo, es el caso de los crinivirus *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) y *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) los cuales son transmitidos también por los mismos vectores, en este caso moscas blancas, y que además producen similares síntomas en las plantas huésped de manera individual. Los títulos virales de ambos virus decrecen en infecciones mixtas respecto a infecciones sencillas (Abrahamian et al. 2013). El crinivirus CYSDV, también se encuentra en la naturaleza en infecciones mixtas junto al ipomovirus

*Cucumber vein yellowing virus* (CVYV). En este caso, también los dos virus son transmitidos por mosca blanca de manera semipersistente. En plantas de calabacín, la infección sencilla por CYSDV habitualmente no presenta síntomas claros, y la carga viral disminuye entre 15 y 45 días postinoculación, llegando a ser después prácticamente indetectable; en cambio en infección mixta con CVYV aumenta la carga viral y es detectable hasta 60 días postinoculación (Gil-Salas et al. 2011; Gil-Salas et al. 2012). En contraste con los casos mencionados, en experimentos realizados con el crinivirus CYSDV y el potyvirus ZYMV, no se ha observado sinergismo en ninguno de los casos descritos: CYSDV mantiene sus niveles de carga viral en infección mixta respecto a sencilla, mientras que los niveles de ZYMV se ven reducidos en infecciones mixtas (Gil-Salas et al. 2011; Gil-Salas et al. 2012).

Se puede decir que se ignoran en gran medida los resultados de muchas interacciones posibles entre virus en infecciones mixtas, y es imposible predecir cómo afectarán en cada caso concreto. En la presente tesis nos hemos planteado abordar el estudio sistemático de infecciones mixtas concretas, y valorar sus posibles efectos biológicos.

## **1.5 Infección viral**

La infección viral comienza con la liberación del genoma del virus dentro de una célula del huésped. Inmediatamente después el genoma es traducido, replicado (generando copias de sí mismo) y encapsidado, generando la progenie en la misma célula o en células adyacentes o conectadas indirectamente y que dará lugar a un nuevo ciclo infeccioso. Una vez que el virus ha entrado a la célula vegetal se considera que comienza un proceso complejo y poco caracterizado de desensamblaje. Como resultado, el genoma viral es liberado al citoplasma (en la mayoría

de los casos, aunque en ocasiones se puede también acceder a orgánulos o compartimentos subcelulares) para ser traducido y posteriormente replicado. Entre los productos generados a partir de esta traducción se encuentra en general la RNA polimerasa viral, la cual utiliza el genoma del virus como molde para generar nuevas copias del mismo (Hull 2013). Varios factores de la planta han sido asociados a la replicación a través de su interacción con proteínas virales involucradas en este proceso. El primero de ellos en ser identificado fue el factor de iniciación de la traducción eIF4E (Charron et al. 2008; Leonard et al. 2000; Schaad et al. 2000; Wittmann et al. 1997). Se ha demostrado que la interacción de proteínas virales con eIF4E, o con su isoforma eIF(iso)4E, es necesaria para que progrese la infección (Charron et al. 2008; Leonard et al. 2000). Además, se han identificado varios factores de la planta que interactúan con la RNA polimerasa viral, como por ejemplo: el factor de traducción de unión a poli-A 2 (PABP2), la proteína de choque térmico 70 (Hsc/HSP70-3) y el factor de elongación de traducción eEF1A (Beauchemin y Laliberte 2007; Dufresne et al. 2008; Thivierge et al. 2008). Otros procesos de interacción entre virus y huésped que tienen lugar durante la infección, como las respuestas asociadas al silenciamiento génico, se verán más adelante.

### **1.5.1 Clones infectivos de virus**

La posibilidad de obtener clones de cDNA del genoma completo de virus que permitan infectar plantas, ha resultado muy útil para estudiar aspectos relacionados con la replicación, expresión génica o identificación de los determinantes de patogenicidad de los virus (Bujarski y Miller 1992). En los virus de RNA, la obtención de un clon infectivo implica la síntesis previa de un cDNA complementario del genoma completo del virus que se insertará por ejemplo en un vector adecuado

para su mantenimiento y amplificación en bacterias (Boyer y Haenni 1994). El cDNA obtenido se puede clonar bajo el promotor de una RNA polimerasa DNA dependiente de un fago, como SP6 (Melton et al. 1984), T3 ó T7 (Dunn et al. 1983), lo que permitirá obtener transcritos de RNA *in vitro*, con capacidad de ser infecciosos, o bajo el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) lo que posibilita la inoculación directa del DNA en planta, que sería transcrito *in vivo* para generar un RNA correspondiente al virus. Los transcritos de RNA funcionan como mRNAs y pueden ser traducidos en el citoplasma de las células trasfectadas. Para introducir el RNA del genoma del virus en las células a partir del clon de cDNA, los transcritos de RNA o la construcción de la que pueden derivar se inoculan en células de la planta huésped utilizando distintos métodos como inoculación mecánica, electroporación (en el caso de células en cultivo), bombardeo con partículas de oro o tungsteno recubiertas con los ácidos nucleicos, o mediante agroinoculación (Vaghchhipawala y Mysore 2008). En nuestro trabajo nos hemos planteado la necesidad de crear un clon infectivo de CocMoV para profundizar en su estudio: la utilidad de la herramienta la hemos aplicado inicialmente al análisis del motivo G<sub>2</sub>A<sub>6</sub> presente en P1a, para poder comparar el comportamiento del virus con y sin este motivo mutado. Se espera que la disponibilidad del clon infectivo sea de utilidad en otros futuros trabajos sobre CocMoV.

### **1.5.2 Deslizamiento de la polimerasa**

Los virus RNA de cadena sencilla y positiva, poseen su propia RNA polimerasa RNA dependiente (*RpRd*), sin embargo, requieren de factores del huésped para establecer el complejo de replicación. Este proceso comienza con la copia de la hebra (+) en una hebra (-) y complementaria. La hebra (+) es utilizada para la traducción, replicación y la síntesis de

nuevas hebras (+) que formarán parte de los nuevos viriones. La traducción y replicación del mismo molde (template) es un proceso en el cual los ribosomas y la actividad de la *RpRd* deben ser regulados y controlados (Barry y Miller 2002). El deslizamiento de la polimerasa, en el caso de los virus de RNA, consiste en la alteración del RNA recién sintetizado durante la replicación mediante inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos. Estos cambios pueden dar como resultado la expresión de nuevas proteínas que superponen marcos de lectura abiertos (ORFs). Este mecanismo se ha caracterizado bien en virus RNA de animales, como el Ebola virus (Mehedi et al. 2011) o el virus de la Hepatitis C (Choi et al. 2003; Ratinier et al. 2008). En el caso de virus de plantas, donde el deslizamiento de la polimerasa se ha propuesto como un proceso general de evolución, estudios recientes demuestran la síntesis de una proteína solapante a partir del motivo  $G_{1-2}A_{6-7}$  conservado en la región de la proteína P3 común en todos los miembros de la familia *Potyviridae* llamada PIPO (Pretty Interesting Potyviral ORF). Esta ORF, puede dar lugar a una proteína funcional llamada P3N-PIPO, la cual se compone de la parte N-terminal de P3 seguida de los aminoácidos correspondientes a PIPO los cuales podrían ser teóricamente añadidos en la ORF +2 o -1 por “ribosomal frameshift” o “transcriptional slippage” (Chung et al. 2008). El mecanismo de deslizamiento de la polimerasa fue finalmente dilucidado de forma independiente por dos equipos trabajando con diferentes potyvirus (Olspert et al. 2015; Rodamilans et al. 2015). Estos dos estudios demuestran que esta nueva proteína P3N-PIPO se produce a partir del cambio en la fase de lectura, por la adición/delección de un nucleótido (White et al. 2015) y se ha asociado a funciones esenciales para el virus (Vijayapalani et al. 2012; Wei et al. 2010). Además, en ciertos casos, también se pueden generar variantes con paradas prematuras (ALT) las cuales también están relacionadas con la actividad vital del virus (Hagiwara-Komoda et al. 2016). Recientemente,

en nuestro grupo se ha caracterizado la proteína P1N-PISPO (Pretty Interesting Sweet-potato Potyviral ORF), la cual se produce a partir del motivo  $G_2A_6$  presente en la proteína P1 del potyvirus SPFMV (Mingot et al. 2016) en la ORF-1 por adición de un nucleótido. Esta nueva proteína solapante, también resulta esencial para el virus, actuando como supresor de silenciamiento. El virus emergente CocMoV, el cual fue caracterizado recientemente por nuestros colaboradores (Desbiez et al. 2016), presenta además del motivo  $G_1A_7$  presente en P3, el cual da lugar a la proteína solapante P3N-PIPO común en todos los miembros de la familia *Potyviridae*, un motivo  $G_2A_6$  en la proteína P1a, coincidente con el conservado en P3 en el resto de virus de la familia, por lo cual ha sido motivo de este estudio.

## **1.6 Mecanismos de defensa en plantas**

Las plantas tienen diferentes formas para defenderse del ataque de los patógenos. Aparte de barreras físicas que dificultan o impiden la colonización por parte del patógeno existen mecanismos de defensa que pueden activarse en reacción a un ataque patogénico (Truniger y Aranda 2009). La acción combinada de los diferentes sistemas defensivos (físicos y moleculares) es la que realmente otorga a la planta la capacidad de enfrentarse con éxito a numerosos microorganismos. Existen defensas de naturaleza bioquímica preexistentes como los inhibidores de proteínas (Howe 2004), mientras que otras defensas son inducidas por el ataque de los patógenos. Dentro de estas respuestas, se encuentra la respuesta hipersensible, la cual consiste en la rápida activación de las reacciones de defensa asociadas a la muerte celular en la planta huésped (Hofius et al. 2017) , y la producción de compuestos como proteínas relacionadas con patogénesis (PR) con actividad

antimicrobiana (Van Poecke y Dicke 2004). Algunas de estas respuestas pueden incluir la producción de sustancias volátiles que actúan frente a organismos que pueden ser vectores de patógenos, o sus enemigos como parasitoides y depredadores (Vucetic et al. 2014). Las señales pueden transmitirse internamente por las conexiones vasculares, y externamente mediante sustancias volátiles que permitirían extender la señal a la planta y a plantas circundantes, siguiendo procesos aún no muy caracterizados.

En el caso de los virus las plantas poseen además un mecanismo de defensa adquirido capaz de conferir inmunidad, incluso después de una recuperación que sigue a la infección primaria (Mandadi y Scholthof 2013; Sanjaçon 2015). Esta resistencia está asociada a un mecanismo natural de silenciamiento del RNA viral intrínseco en las plantas, mediante el cual estas son capaces de reconocer RNA viral durante la replicación del virus, lo cual conduce a una degradación específica del RNA genómico (Ratcliff 1997; Csorba et al. 2009).

### **1.6.1 Silenciamiento génico**

El silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs es un mecanismo de regulación génica conservado en organismos eucariotas. La función antiviral del silenciamiento del RNA se ha demostrado en plantas e invertebrados (Bronkhorst y Van Rij 2014; Pumplin y Voinnet 2013) e informes recientes aportan algunas evidencias de que una función similar podría también darse en mamíferos (Cullen et al. 2013; Li et al. 2013; Maillard et al. 2013). En plantas, está implicado en muchos procesos biológicos como el desarrollo de la planta, la adaptación a condiciones de estrés y la defensa frente a diferentes patógenos entre los que se encuentran los virus.

El RNAi puede actuar en transcripción (“Transcriptional Gene Silencing”, TGS) o en niveles post-transcripcionales (“Post-Transcriptional Gene Silencing”, PTGS). Las diferentes rutas de silenciamiento por RNA presentes en plantas se inducen por la presencia de dsRNA que pueden tener varios orígenes. En el caso de los virus, los dsRNAs producidos durante el proceso de replicación viral o formados por plegamientos y apareamientos de bases complementarias en determinadas zonas del genoma viral inducen la generación de moléculas de RNA pequeñas (21-24 nucleótidos) llamadas pequeños RNAs derivados del virus (“virus-derived small RNAs”, vsRNAs) (Ding y Voinnet 2007). Estos vsRNAs pueden actuar tanto sobre el genoma del virus como sobre el de la planta de modo que pueden, por un lado, limitar la infección viral, pero también modular la expresión génica del huésped a través de interacciones con secuencias de RNA y/o DNA de la planta (Dunoyer et al. 2005; Hamilton y Baulcombe 1999; Hammond et al. 2000; Llave 2010; Ruiz-Ferrer y Voinnet 2009;). El proceso de silenciamiento se inicia con el reconocimiento de dsRNA viral por una clase de RNAsa tipo III denominada DICER-LIKE (DCL) que corta el dsRNA dando lugar a lo que se denominan pequeños RNA (smallRNAs, sRNAs) con una longitud final de 20-25 nucleótidos. A continuación, estos sRNAs son incorporados a complejo efector RISC del que forma parte una proteína llamada Argonauta (AGO). De este modo los sRNAs confieren especificidad al complejo RISC por sus moléculas diana (RNA o DNA). Además, se produce la amplificación de siRNAs secundarios procedentes de moléculas de dsRNA sintetizadas por proteínas con actividad RpRd de la planta, los cuales son transportados a través del floema por toda la planta dando lugar a la dispersión sistémica del silenciamiento (Dunoyer et al. 2010; Voinnet 2008).

Para hacer frente a las respuestas antivirales del huésped, los virus han desarrollado mecanismos de contradefensa para evitar o contrarrestar

esto, especialmente a través de la expresión de proteínas que bloquean este mecanismo, denominadas supresores virales de silenciamiento de RNA (viral suppressors of RNA silencing, VSRs) (Lakatos et al. 2006; Li y Ding 2006). Los VSRs pueden actuar de diferentes modos, siendo tres los tipos más comunes. El primero de ellos, uniéndose a los RNAs e impidiendo la generación de siRNAs por DICER; el segundo, secuestrando los siRNAs e impidiendo su unión a AGO; y el tercero, interaccionando de manera directa con DICER y/o RISC e inhibiendo su acción (Incarbone y Dunoyer 2013).

### **1.6.1.1 Supresores de silenciamiento**

Los RSS, bloquean las rutas de silenciamiento en diferentes puntos y permiten la invasión del huésped (Anandalakshmi et al. 1998; Chapman et al. 2004; Díaz-Pendón y Ding 2008; Kasschau y Carrington 1998; Vance y Vaucheret 2001).

Hay distintos trabajos publicados donde se ha caracterizado la actividad supresora de una o más proteínas de distintos virus (ya que un virus puede tener más de un supresor de silenciamiento) (Li y Ding 2006; Díaz-Pendón y Ding 2008; Giner et al. 2010; Martínez-Turiño y Hernández 2009; Pumplin y Voinnet 2013) En infecciones mixtas, la inhibición del mecanismo de silenciamiento génico de la planta por parte de uno de los virus, puede resultar en un aumento de carga viral o virulencia del segundo virus (Hisa et al. 2014).

La proteína HCPro de los potyvirus fue el primer supresor de silenciamiento descrito (Anandalakshmi et al. 1998; Kasschau y Carrington 1998). Desde entonces, diversos estudios han revelado que HCPro puede contrarrestar la barrera defensiva basada en el silenciamiento actuando en múltiples puntos del mecanismo (Jamous et al. 2011; Varallyay y Havelda 2013; Valli et al. 2015; Ivanov et al.

2016). Curiosamente, algunos de estos estudios también han demostrado que solo HCPro de los miembros de los géneros *Potyvirus* y *Rymovirus* parece tener actividad de supresión de silenciamiento de ARN, mientras que esta función depende de otra proteína en el resto (Giner et al. 2010). No obstante, dentro del género potyvirus también hay excepciones, como el caso de SPFMV (Untiveros et al. 2016; Mingot et al. 2016).

CYSDV p25 no comparte homología de aminoácidos con otras proteínas de crinivirus que actúan como RSS. Este, se trata de un supresor de S- y hp-PTGS, que no impide el movimiento de la señal de silenciamiento célula a célula y que no puede restaurar la expresión de GFP en el tejido donde el silenciamiento ya está establecido (Kataya et al. 2009). Los resultados de Kataya et al, 2009 sugieren que p25 muy probablemente ejerce su actividad supresora aguas abajo de la generación de siRNA.

En el presente trabajo hemos planteado analizar la acción combinada de los supresores conocidos de cada virus durante las infecciones mixtas. Este tipo de análisis no es habitual, y nos preguntamos al inicio del trabajo si podría servir para explicar mejor las interacciones entre virus diferentes: los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis, y además hemos confirmado que otras proteínas virales podrían modular de forma cruzada la actividad supresora, un resultado no esperado que puede contribuir a aclarar aspectos complejos de las interacciones entre virus no relacionados durante las infecciones mixtas.



## **OBJETIVOS**



## 2. Ojetivos

Se han estudiado distintos aspectos biológicos relacionados con infecciones mixtas de los virus *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) y *Coccinia mottle virus* (CocMoV) teniendo en cuenta los principales objetivos de este trabajo:

1. Análisis de la dinámica de la carga viral en infecciones sencillas y mixtas de WMV y CYSDV en plantas de melón, prestando especial atención a la acumulación de los distintos virus a lo largo de la infección.
2. Estudio de la diseminación por insectos vectores (pulgones para WMV y mosca blanca para CYSDV) a partir de plantas de melón infectadas con uno o ambos virus.
3. Evaluación de los supresores de silenciamiento de WMV y CYSDV y estudio de la interacción entre estos y otros productos génicos virales.
4. Alteración de la frecuencia de deslizamiento de la polimerasa para expresar productos génicos fuera de fase de lectura el el virus CocMoV.

Para avanzar en el conocimiento de las infecciones mixtas, se han desarrollado y adaptado a los sistemas experimentales metodologías específicas (cuantificación absoluta de títulos virales, evaluación de ratios de transmisión por insectos vectores, monitorización del comportamiento alimenticio de pulgones mediante EPGS, ensayos de actividad supresora, co-localización e interacción entre productos virales) así como herramientas moleculares (obtención de un clon infectivo de CocMoV).



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Material biológico

##### 3.1.1 Plantas

Las semillas de melón de la var. Piel de sapo T111 (PS T111), empleadas en este trabajo, han sido amablemente cedidas por nuestros colaboradores de semillas Fitó (Barcelona, España) así como por la Dra. M. Martín (CRAG, Barcelona, España).

Estas semillas han sido almacenadas a corto plazo a temperatura ambiente, y han sido tratadas con el fungicida captán (3g/l) durante 5 minutos previamente a su uso. Las semillas se han crecido en placa bajo condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 28 °C y 16 h luz/8 h oscuridad. Una vez germinadas las semillas, se pasaron a maceta manteniéndose bajo condiciones de temperatura y luz controladas en otra cámara de crecimiento, en este caso a 22-25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad.

Paralelamente, también se han crecido plantas de calabacín y de melón var. Vedrantaís en invernaderos del centro de investigación PACA-INRA Avignon para los experimentos realizados allí que incorporaban CocMoV. Las semillas se germinaron bajo condiciones de temperatura y luz controladas en invernadero de crecimiento a 26-28 °C y 16 h luz/8 h oscuridad. Una vez germinadas las semillas, se pasaron a maceta manteniéndose bajo condiciones de temperatura y luz controladas en un invernadero P3 de alta seguridad a 22-25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad, para trabajar con patógenos de cuarentena.

Se han empleado plantas de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *Solanum muricatum* y *Solanum lycopersicum* var. Micro tom para mantener las colonias de los vectores virales empleados en este estudio, en

condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 23-25 °C, dependiendo de la especie de insecto, y 16 h luz/8 h oscuridad. Las construcciones virales obtenidas en este trabajo se expresaron transitoriamente en plantas de *N. benthamiana* cuando estas poseían entre 3-4 hojas verdaderas, agroinfiltrándose 3 hojas por planta. Las plantas se han crecido en cámara de crecimiento bajo condiciones de temperatura y luz controladas (22-28 °C y 16 h luz/8 h oscuridad). Una vez agroinfiltradas, se han manteniéndose bajo condiciones de temperatura y luz controladas en las mismas condiciones.

### 3.1.2 Bacterias y levaduras

#### ***Echerichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens***

Para la multiplicación y purificación de las construcciones generadas en este trabajo, se ha usado la cepa TOP10 de *Echerichia coli* y la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se cultivaron respectivamente a 37 °C en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l) y a 28 °C en medio YEB (Extracto cárnico “beef extract” 5 g/l, extracto de levadura 1 g/l, peptona 5 g/l sacarosa 5 g/l y MgSO<sub>4</sub> 0.48 g/l). Los medios fueron suplementados con los respectivos antibióticos de selección, y añadiendo 15 g/l de agar en el caso de cultivos en medio sólido.

Los cultivos bacterianos transformados con los distintos plásmidos se mantuvieron a 4 °C en placas de medio sólido suplementadas con los correspondientes antibióticos, para su uso a corto plazo. A largo plazo, las bacterias se conservan a -80 °C en medio LB o YEB con glicerol al 20%.

#### ***Saccharomyces cerevisiae***

El clon infectivo de CocMoV obtenido en este trabajo se logró por recombinación en *Saccharomyces cerevisiae*, para lo cual se empleó la

cepa diploide YPH501 (YPH500xYPH499) (Sikorski y Hieter 1989). Los cultivos de levaduras se crecieron a 28 °C en medio YPD (conteniendo 1% de extracto de levadura, 2% peptona y 2% d-glucosa) antes de la transformación, y en medio CAU (0.1% casaminoácidos sin triptófano, 0.67% base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos, 0.0025% sulfato de adenina, 0.0025% uracilo y 2% d-glucosa) tras la transformación.

### 3.1.3 Virus

Para el estudio de infecciones mixtas se ha empleado el crinivirus *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) y el potyvirus *Watermelon mosaic virus* (WMV). El clon infectivo de WMV (Desbiez et al. 2012) fue amablemente cedido por la Dra. C. Desbiez (INRA–PACA, Avignon, Francia) y un ejemplar de *Cucumis melo* infectado con el aislado CYSDV-AILM, fue proporcionado por la Dra. ML. Gómez-Guillamón (IHSM “La Mayora”, Málaga, España). Este inóculo ha sido mantenido durante todo este tiempo en plantas de melón var. PS T111, realizando pases mensuales del virus empleando mosca blanca como vector natural. Esto ha sido necesario ya que los crinivirus están restringidos a infectar tejidos vasculares de la planta y no pueden inocularse de manera mecánica, por lo que no se puede conservar el inóculo como material infectivo desecado o congelado.

Además, en este trabajo se ha empleado el virus emergente *Coccinia mottle virus*, aislado SU-12, cedido amablemente por la Dra. C. Desbiez (INRA–PACA, Avignon, Francia) y mantenido sobre plantas de calabacín en uno de los invernaderos de alta seguridad biológica del INRA-PACA Avignon, por tratarse de un virus considerado de cuarentena en Europa.

### 3.1.4 Vectores virales

Las colonias de *Myzus persicae* proceden del clon MP89 proporcionado por los Dres. A. Fereres y A. Moreno (ICA-CISC Madrid) y han sido mantenidas clonalmente en plantas de *N. tabacum* var. Xanthi en condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 23 °C y 16 h luz/8 h oscuridad. Las colonias de *Bemisia tabaci* fueron proporcionadas por la Dra. R. Gabarra (IRTA Cabrils) corresponden al biotipo denominado MEAM1 (antiguo B) y han sido mantenidas en plantas de *Solanum muricatum* y *Solanum lycopersicum* var. Microtom en condiciones de temperatura y luz controladas en fitotron vertical a 25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad.

### 3.1.5 Plásmidos y vectores de clonación

En este trabajo principalmente se ha utilizado la tecnología Gateway (Invitrogen) empleando el pENTR™/D-TOPO® y diferentes pDEST de una colección de uso libre (Tanaka et al. 2011) para generar las diferentes construcciones. Además también se ha utilizado la tecnología *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) para la clonación directa de fragmentos de genomas virales amplificados por RT-PCR.

La construcción de clones completos infectivos de CocMoV se abordó a partir de plásmidos adecuados para la recombinación en levaduras, proporcionados por el laboratorio colaborador (Desbiez et al. 2012).

## **3.2 Manipulación de virus**

### **3.2.1 Inoculación mecánica**

Se han realizado inoculaciones mecánicas en melón y calabacín de WMV a partir tanto de clon infectivo como de material vegetal fresco para emplear como fuente de inóculo para la transmisión mediante vectores naturales. En este caso, se espolvorearon los cotiledones de plantas susceptibles con el abrasivo Carborundum, para producir daño mecánico (heridas) a las células y facilitar la entrada del virus. Se preparó un extracto 1:2 de tejido previamente infectado en tampón fosfato 0,02 M pH 7,2 adicionando una pequeña cantidad de carbono activado. Se homogenizó el extracto de planta con la ayuda de un mortero autoclavado previamente, y se aplicó la mezcla sobre las hojas espolvoreadas con el abrasivo frotando manualmente con cuidado para evitar daños excesivos. Seguidamente se marcaron las hojas inoculadas y se limpiaron los restos con agua utilizando un frasco lavador. En el caso de inocular a partir del clon infectivo de WMV descrito por Desbiez y colaboradores en 2012, la solución conteniendo el DNA plásmidico infectivo fue aplicada directamente sobre los cotiledones de plantas susceptibles (Desbiez et al. 2012). Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 22-25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad. A los 10-12 días se identificaron las plantas en las que observaban síntomas claros de la infección viral.

### 3.2.2 Inoculación por vectores y obtención de plantas doblemente infectadas

Para transmitir CYSDV y WMV, se han utilizado como vectores naturales moscas blancas y pulgones respectivamente, empleando tiempos de adquisición y transmisión acordes al tipo de transmisión (Tabla 1).

**Tabla 1. Transmisión por vectores de WMV y CYSDV.**

Virus	Transmisión	Vector natural	Tiempo ayuno <sup>1</sup>	Tiempo adquisición	Tiempo inoculación	Cantidad (/planta)
WMV	No persistente	Pulgón	3h	10min	30min	10pulgones
CYSDV	Semi-Persistente	Mosca blanca	-	48h	48h	40moscas

<sup>1</sup> El período de ayuno de pulgones se realizó durante 3 horas en viales cerrados, una vez recogidos de la planta en que se mantenía la colonia. En el caso de moscas blancas, se recolectaron por aspiración en tubos de 20 ml, que se acoplaron a cajas pinza mediante conectores dobles, o se liberaron directamente en cajas confinadas para la adquisición del virus.,

En el caso de las co-infecciones, en primer lugar, se llevó a cabo la inoculación de CYSDV, y el mismo día que se retiraron las moscas se inoculó WMV empleando pulgones, siendo este el día 0. Una vez inoculadas, las plantas se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 22-25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad.

### **3.2.3 Inoculación biolística**

Los clones infectivos de CocMoV generados en este trabajo, fueron bombardeados mediante un equipo de biobalística sobre plantas de melón y calabacín, empleando partículas de Tungsteno, y siguiendo los procedimientos descritos por los colaboradores franceses para otros virus (Desbiez et al. 2012). Las plantas inoculadas se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y luz controladas en cámara de crecimiento a 22-25 °C y 16 h luz/8 h oscuridad, siempre dentro de las instalaciones de seguridad biológica del laboratorio INRA-Avignon. Aproximadamente 10 días después de la inoculación, ya podían observarse síntomas claros en las plantas infectadas.

## **3.3 Manipulación de ácidos nucleicos**

### **3.3.1 Extracción de RNA de tejido de plantas**

En todos los casos, el RNA total fue extraído mediante el reactivo comercial TRIzol reagent (Invitrogen). El tejido fresco fue inicialmente congelado en N<sub>2</sub> líquido y se trituró con ayuda del equipo Tissue lyser (QIAGEN), realizándose a continuación la extracción empleando 1 ml de reactivo por cada 100 mg de tejido. Una vez homogenizado el material en tubos individuales con 1 ml de TRIzol, se añadieron 200 µl de cloroformo. Tras agitación y centrifugación de 15 min a 13000 rpm a 4 °C, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo en el cual se añadió 1 volumen de isopropanol. Se dejó precipitando 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó 15 min a 13000rpm a 4 °C. Se lavó el pellet con solución de etanol al 70%, y se llevó a cabo una segunda precipitación añadiendo

0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándolo posteriormente durante 1 h a -80 °C. Transcurrido este tiempo, se lavó el pellet con etanol al 70 %, se secó bien, y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril. Esta segunda precipitación se llevó a cabo para obtener un RNA con mayor grado de pureza. La calidad y limpieza se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop así como por visualización de una alícuota en gel de agarosa al 1% (ver apartado 3.3.4).

### **3.3.2 Transcripción inversa**

A partir de 1 µg de RNA total, se obtuvo el cDNA correspondiente empleando o bien el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) o el kit AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (Promega), siguiendo en cada caso el protocolo descrito por cada fabricante.

### **3.3.3 Amplificación mediante PCR**

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó a partir de 50 ng de DNA plasmídico o cDNA obtenido mediante transcripción inversa. Se llevó a cabo usando el kit comercial TaKaRa Ex Taq®, siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El número y condiciones de cada ciclo de amplificación variaron en cada caso, cambiando la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión en función de los requerimientos de los cebadores y de la longitud del fragmento a amplificar. En el caso de WMV se emplearon los oligos específicos WMV-F (5' CTTATGGTTGT CATTGCTATG 3') y WMV-R (5' CCCACCAACTGTTGGAAG 3')

diseñados previamente en el laboratorio, que amplifican una región de 813 nt de la CP del virus. Para la detección de CYSDV, se emplearon los oligos específicos MA156 (5'-GAAGAATTCCAGGCAAGG-3') y MA129 (5'-TCACATCATCAATCCAA AAG-3') (Marco et al. 2003) que amplifican un fragmento de 563 bp de tamaño.

### **3.3.4 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA o RNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Roche) de concentración entre el 0.8% y el 1.2%, según el tamaño de los fragmentos que se querían visualizar, teñidos con bromuro de etidio. Las muestras fueron diluidas con 0.1 volúmenes de tampón de carga conteniendo azul de bromofenol, en caso de ser necesario, antes de ser cargadas en el gel. Como tampón de electroforesis se empleó TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH7.8). La electroforesis se llevó a cabo entre 40 y 110 V durante el tiempo estimado para la correcta visualización de los fragmentos. La visualización de los ácidos nucleicos se realizó mediante iluminación con luz ultravioleta, y se documentaron las imágenes gráficamente. Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador comercial marker GeneRuler de 1Kb de tamaño.

### **3.3.5 Detección de plantas infectadas: hibridación molecular**

#### **Obtención de la sonda**

Este método ha sido empleado fundamentalmente para la detección de CYSDV. Para ello, se linearizó con la enzima de restricción XbaI el plásmido pLM15/24 (Marco et al. 2013) amablemente cedido por el Dr. M. Aranda (CEBAS-CSIC, Murcia), el cual contiene un fragmento de 5437 pares de bases del RNA1 del virus, situado bajo el control del promotor

SP6, tras lo cual se llevó a cabo la transcripción *in vitro* empleando el kit DIG NORTHERN (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniendo transcritos de RNA de sentido negativo, marcados con digoxigenina. Una vez obtenido el transcrito, debido a su gran tamaño y para favorecer los pasos posteriores, se hidrolizó con tampón carbonato 2x calculando el tiempo acorde a la formula tiempo= (Li (Kb) – Lf (Kb) ) / (0.11 Kb/min x Li (Kb) x Lf (Kb) ) donde Li es la longitud inicial del transcrito, Lf la longitud final de los fragmentos deseados y 0.11 Kb/min una constante. La sonda generada e hidrolizada se precipitó con acetato de sodio y etanol, y se resuspendió en agua + 50% formamida, guardándose a -20 °C hasta su uso.

### **“Tissue print”**

Las secciones transversales de peciolo de las plantas a analizar se imprimieron en membranas de Nylon cargadas positivamente (Nylon Membranes, positively charged, Roche) y se fijaron los ácidos nucleicos mediante entrecruzamiento "crosslink" en un equipo adecuado (UVC500 crosslinker, Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se introdujo a continuación la membrana en un tubo de hibridación junto a 10 ml de solución de prehibridación (20x SSC, 10% N-Lauril sarcosina, 50% Formamida, 10% SDS y 2% agente bloqueante comercial de la casa Roche) incubando en horno giratorio a 65°C durante 3h. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 µl de sonda previamente desnaturalizada (10 minutos a 65 °C) y se dejó incubando durante 14-16h en el horno giratorio a la misma temperatura de 65 °C. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de hibridación, y se procedió a los lavados de la membrana con la solución 1 (2x SSC, 0,1% SDS) en dos tiempos de 10 min, la solución 2 (0.1x SSC, 0,1% SDS) en dos tiempos de 15 min y la solución de lavado (0.1 ácido maleico, 0.15M NaCl pH7.6, 0.3% tween

20) durante 5 min, todo el tiempo en agitación. Tras los lavados, se procedió al bloqueo (0.1 ácido maleico, 0.15 M NaCl pH 7.6, 1% agente bloqueante comercial de Roche) durante 1 h en agitación. Transcurrido el tiempo, se adicionó el anticuerpo anti DIG (Roche) a la concentración de uso recomendada, y se incubó durante 1 h más en agitación. Seguidamente se realizaron dos lavados con solución de lavado de 15 min cada uno, en agitación. La membrana se pasó a una placa petri de tamaño suficiente que contenía buffer de detección (0.1M TrisHCl pH 9.5, 0.1M NaCl) y se reveló empleando como sustrato CDP-Star (Roche), documentando la imagen en un aparato de quimiluminiscencia (ChemiDoc-Bio-Rad).

### **3.4 Análisis de la carga viral**

#### **3.4.1 Transcritos para determinar la recta patrón**

Se decidió generar los transcritos a partir de clones parciales localizados cerca de los extremos 5' de cada virus, para lo cual se diseñaron oligos específicos que amplificasen aproximadamente 1.5 Kb en cada caso (Tabla 2).

En el caso de CYSDV, puesto que el genoma tiene dos moléculas de RNA, se clonaron tanto fragmentos en el extremo 5' del RNA 1 como en el del RNA 2, para poder cuantificar separadamente cada uno de ellos.

**Tabla 2. Oligos empleados en la obtención de los transcritos empleados en la cuantificación de carga viral.**

Nombre	Dir.	Secuencia	Tm	Tamaño <sup>1</sup>
<b>RNA1ORF1a</b>	Fw	5' ATGTCGTCGTCAGTGTGC 3'	57 °C	1466 bp
<b>CYSDV</b>	Rv	5' GTCGAGACCACTCCAGTACA 3'	56 °C	
<b>RNA2Hsp70h</b>	Fw	5' AGGTGGGTAGGTGTTGACAG 3'	59 °C	1222 bp
<b>CYSDV</b>	Rv	5' TGGGAAGTACCGTCTCCTTACC 3'	59 °C	
<b>P1</b>	Fw	5' <b>CACC</b> ATGGCAACAATCATGTTTGGAG 3'	57 °C	1335 bp
<b>WMV</b>	Rv	5' TCAATAATGTTGAATATCTTCTATCTCC 3'	51 °C	

Fragmentos clonados para la obtención de transcritos in vitro y utilizar como molde para obtener las rectas patrón empleadas en análisis de carga viral. <sup>1</sup> Tamaño del amplicón. En negrita, cola CACC necesaria para el clonaje direccional en pENTR™/D-TOPO®.

Se obtuvieron las construcciones RNA1ORF1CYSDV y RNA2Hsp70hCYSDV empleando el vector pGEMT®Easy (Promega), el cual posee un promotor T7 en el extremo 5' del inserto que permite la transcripción de moléculas con la misma orientación del genoma viral.

Para WMV, se decidió clonar la primera proteína del virus completa (P1), ya que iba a ser utilizada posteriormente para su estudio como posible RSS. En este caso, se utilizó el sistema Gateway (Invitrogen) empleando el pENTR™/D-TOPO® y el pDEST 14, el cual también posee un promotor T7 en el extremo 5' del inserto.

Una vez generadas las construcciones, se comprobaron por patrón de digestión, para lo cual se seleccionaron enzimas de restricción con más de un corte en el plásmido (mínimo uno en el inserto y uno en el vector), generando un patrón de restricción que nos permitiese saber si el inserto estaba presente, y si la orientación era la correcta. Una vez comprobado,

se secuenciaron las construcciones en el Servicio de secuenciación del CRAG (mediante un secuenciador de electroforesis capilar ABI 3730) y se analizaron las secuencias empleando los programas SnapGene y SerialCloner.

Tras validar dichas construcciones, se procedió a la obtención de los transcritos, linearizando los plásmidos generados utilizando distintas enzimas de restricción: EcoRV en el caso de P1WMV; PvuII para RNA1ORF1aCYSDV y Sall para RNA2Hsp70hCYSDV. Los productos obtenidos se purificaron con fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1). Puesto que tanto el vector pGEMTeasy como pDEST14 tienen el promotor T7 aguas arriba del extremo N-Terminal del inserto, se llevó a cabo la transcripción *in vitro* de cada fragmento empleando el kit MEGAscript T7 (Ambion), obteniendo transcritos de RNA de sentido positivo para cada caso. Una vez obtenidos los transcritos, se cuantificaron en nanodrop y se comprobó su pureza en gel de agarosa al 1%. Estos transcritos, fueron posteriormente utilizados como moldes para la obtención de las rectas patrón para el análisis de la carga viral por qRT-PCR.

### **3.4.2 Análisis de títulos virales: qRT-PCR absoluta**

A partir de 1 µg de RNAs totales, tratado previamente con DNasa (ThermoScientific) siguiendo las indicaciones del fabricante, se generó cDNA el cual se utilizó como molde para la obtención de las distintas rectas patrón, realizando distintas diluciones conocidas de cada transcrito. Se diseñaron dos pares de oligos específicos para cada transcrito y por tanto también para el RNA genómico del virus del que derivan, que amplificasen fragmentos de pequeño tamaño, entre 80 y 150 bp en cada caso (Tabla 3). Para el diseño de estos oligos, se empleó el programa <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer> y se ensayaron

optimizando así el análisis de la carga viral, seleccionándose en cada caso los pares de oligos que más se ajustaban a una regresión lineal con R=1, obteniendo así una recta patrón de referencia para el análisis de la carga viral en las muestras problema.

**Tabla 3. Oligos diseñados para la optimización de la cuantificación de la carga viral**

Nombre oligo	Dir.	Secuencia	Tm	Tamaño <sup>1</sup>
qPCR RNA1CYSVDV_1	Fw	5'CGTCACTAGTTGCCGCTGAC 3'	61 °C	102 bp
	Rv	5'TTCCGTGTTTGTGGAGGTTG 3'	57 °C	
qPCR RNA1CYSVDV_2	Fw	5'GACTCAAACAAGCGCGATGA 3'	57 °C	123 bp
	Rv	5'GCGTTGCCGTTACTGAGGAT 3'	60 °C	
qPCR RNA2CYSVDV_1	Fw	5'TTTGTCCGCTGACGTA CTGG 3'	59 °C	138 bp
	Rv	5'GGTTCAATGCAACGACTCAGA 3'	57 °C	
qPCR RNA2CYSVDV_2	Fw	5'CGAACCATCTGCAGCAGCTAT 3'	59 °C	87 bp
	Rv	5'AAAGTTCCTCCTCCGAAGTCA 3'	57 °C	
qPCR P1WMV FW_1	Fw	5'TGCAACTATTGTGGCCTTCG 3'	57 °C	149 bp
	Rv	5'CATGGCACCTCCACCTCATA 3'	58 °C	
qPCR P1WMV FW_2	Fw	5'TAGGGTGCACAGCAAAGTGC 3'	58 °C	86 bp
	Rv	5'TGCATTGAGGTCTCCCTCCT 3'	58 °C	

Oligos específicos diseñados para la obtención de rectas patrón empleadas en el análisis cuantitativo de la carga viral. <sup>1</sup> Tamaño del amplicón que generan.

Se utilizó SYBRGreen (Roche) para detectar productos de PCR mediante la inclusión en la reacción de pequeñas moléculas (intercaladores) que se unen a la doble cadena de DNA, las cuales emiten fluorescencia. Al aumentar la cantidad de productos de PCR durante el proceso de amplificación, se observará un aumento proporcional de la intensidad de

la fluorescencia (Saunders 2004). En general se emplearon 50 ng de DNA plasmídico o cDNA como molde en la reacción de PCR, llevándose a cabo en un equipo Lygth Cycler 480 (Roche), y empleándose placas de 96 ó 384 pocillos.

### **3.5 Manipulación de vectores virales**

#### **3.5.1 Transmisión primaria**

Se realizaron ensayos de transmisión primaria de WMV y CYSDV empleando como fuentes de inóculo plantas en infección sencilla y mixta. Plantas sanas fueron inoculadas empleando densidades de vectores de entre 5-10 pulgones/planta como transmisores de WMV, y de 20 moscas blancas/planta como transmisoras de CYSDV. Para analizar las plantas infectadas en este caso, se extrajo RNA de cada planta y se realizó un diagnóstico específico mediante RT-PCR. Los productos obtenidos fueron visualizados bajo luz ultravioleta en gel de agarosa teñido previamente con bromuro de etidio.

#### **3.5.2 Transmisión secundaria**

En el caso del análisis de la transmisión secundaria de CYSDV se emplearon como fuentes de inóculo plantas infectadas solo con CYSDV y plantas co-infectadas con WMV y como receptoras, se utilizaron plantas no infectadas, y también en paralelo plantas previamente infectadas con WMV. En cada umbráculo, se pusieron 3 planta fuentes de inóculo en el centro, y 20 plantas receptoras alrededor, en la disposición que se muestra (Figura 11).



**Figura 11.** Superior: imagen de los umbráculos individuales. Inferior: disposición de plantas en cada umbráculo. Círculo interior con plantas inóculo (3). Círculo exterior con plantas receptoras (20).

Se liberaron un total de 9.600 moscas (24 umbráculos con 20 plantas, para alcanzar una densidad final de 20 moscas por planta) las cuales se habían recogido previamente con la ayuda de un aspirador (Figura 12). 4 días después de la suelta de los vectores, se trataron las plantas con insecticida, y se llevaron a un invernadero con condiciones de luz, temperatura y humedad controladas.



**Figura 12.** Izquierda: aspiración de moscas. Derecha: suelta de moscas en placa Petri.

### 3.5.3 Monitorización del comportamiento de los vectores: EPGs

Para registrar el comportamiento alimenticio de *M. persicae* sobre plantas de melón PST111 (no inoculados, infectados con WM, con CYSDV o con ambos), se realizaron registros de EPG de 1 hora de duración con insectos individuales sobre cada tipo de planta. Para la realización de los registros se seleccionaron pulgones adultos ápteros, y con la ayuda de una bomba de vacío y un microscopio estereoscópico adaptado a una luz fría, se les adhirió al dorso con una gota de pintura de plata (Pelco® Colloidal Silver no. 16034, Ted Pella Inc., Redding, CA, EE. UU.) un filamento de oro de 3 cm de longitud por 20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 13).



**Figura 13.** Imagen cedida por la Dra. E. Garzo. Uno de los pulgones utilizados por el grupo de Insectos Vectores de Patógenos de Plantas del CSIC / IVPP, ICA-CSIC.

El otro extremo del filamento de oro se unió a un electrodo de cobre de 3 cm de longitud por 1 mm de diámetro y se conectó al dispositivo EPG. El insecto se colocó sobre el envés de la hoja y se conectó en el sustrato un segundo electrodo de cobre de 10 cm de longitud por 0,2 cm de diámetro, de forma que cuando el insecto introduce el estilete en el tejido vegetal el circuito eléctrico queda cerrado y es posible la monitorización de las

ondas EPG por parte del equipo. La adquisición y análisis de datos obtenidos se realizó mediante el programa informático Stylet+ (EPG-Systems, Wageningen, The Netherlands) con el que se visualizan en el ordenador las ondas EPG registradas con una alta resolución, permitiéndose la identificación de los tipos de ondas descritas por Tjallingii (1990). La correlación de la actividad de los estiletes en los distintos tejidos de la planta se basó en la forma, amplitud y frecuencias observadas en las ondas registradas. Todas las variables del comportamiento alimenticio del pulgón fueron procesadas y calculadas mediante la hoja de cálculo MS Excel Workbook desarrollada por Sarria et al. 2009. En los registros obtenidos se evaluaron distintos parámetros relacionados con la actividad de prueba del insecto: no prueba (np), penetración intercelular (C), prueba intracelular (*pd*), fase floemática (E1 y E2, relacionadas con la salivación e ingestión floemáticas, respectivamente), ingestión activa del xilema (G) y dificultad mecánica de los estiletes en la penetración en el tejido vegetal (F).

### **3.6 Expresión transitoria en planta**

#### **3.6.1 Obtención de construcciones**

Se diseñaron oligos específicos para generar las construcciones virales P1, HCPro y P1HCPro para WMV, y P22 y P25 para CYSDV (Tabla 4). En todos los casos, el oligonucleótido en posición 5' (denominado FW, de Forward) fue diseñado con una cola CACC en el extremo 5' para la clonación direccional de los productos en el sistema pENTR/D'-TOPO (Invitrogen).

**Tabla 4. Oligos diseñados para la obtención de construcciones virales para testar su posible actividad como supresores de silenciamiento**

Nombre oligo	Dir.	Secuencia	Tamaño
<b>P1WMV</b>	Fw	5' <b>CACCATGGCAACAATCATGTTTGGAG</b> 3'	1332 bp
	Rv	5' <u>TCAATAATGTTGAATATCTTCTATCTCC</u> 3'	
<b>HCPProWMV</b>	Fw	5' <b>CACCATGTCTCACACTCCAGAAG</b> 3'	1371 bp
	Rv	5' <u>TCAACCAACCCTGTAAAACTTC</u> 3'	
<b>P22CYSDV</b>	Fw	5' <b>CACCATGCAGAGTGTGGAGTAG</b> 3'	579 bp
	Rv	5' <u>TCAAGGGATGGTGCCCATG</u> 3'	
<b>P25CYSDV</b>	Fw	5' <b>CACCATGGGAGAAGATTTACAAGAAC</b> 3'	639 bp
	Rv	5' <u>CTACTCCAACACTCTGCATTC</u> 3'	

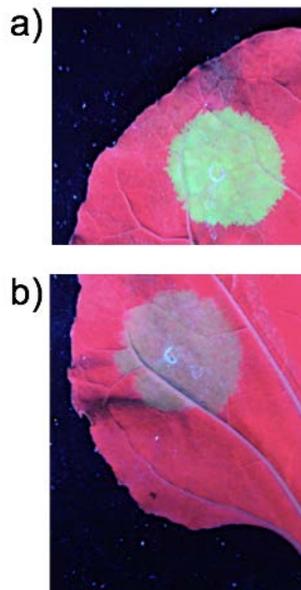
En negrita, cola CACC necesaria para el clonaje direccional en pENTR™/D-TOPO®. Subrayado, codón de stop para la correcta producción y expresión de las proteínas.

Una vez amplificados los productos génicos por RT-PCR, empleando la polimerasa de alta fidelidad “Phusion DNA polymerase” (Thermo scientific), se purificaron empleando el kit comercial QIAquick gel extraction (QIAGEN) y se clonaron direccionalmente en el pENTR/D'-TOPO (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Los diferentes productos obtenidos se multiplicaron empleando *E. coli* de la cepa TOP10, siguiendo protocolos microbiológicos estándar, y se seleccionaron distintas colonias de cada construcción, creciendolas en medio de cultivo LB suplementado con el antibiótico Kanamicina. En cada caso, se extrajo DNA empleando el kit comercial “miniJET plasmid miniprep” (Thermo scientific) siguiendo el protocolo comercial. Se seleccionaron diferentes enzimas de restricción para analizar las distintas colonias seleccionadas mediante digestión del DNA. Aquellas que presentaron el patrón de digestión esperado, fueron secuenciadas por

capilaridad en el servicio correspondiente del CRAG. Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando los programas SnapGene y SerialCloner. Una vez validadas las construcciones generadas, se transfirieron al plásmido pDEST pGWB 702 $\Omega$  (que presenta un promotor duplicado 2x35S derivado de CaMV y la secuencia facilitadora de la traducción de TMV denominada  $\Omega$  sin incorporar etiquetaje molecular) mediante LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen). Tras crecer los vectores obtenidos en *E. coli* TOP10, seleccionar colonias, crecerlas en medio LB suplementado con el antibiótico de selección, extraer DNA y realizar una digestión para validar las construcciones, se transfirieron los clones seleccionados a *A. tumefaciens* cepa EHA105, para realizar los distintos experimentos de expresión transitoria en planta.

### **3.6.2 Ensayos de actividad supresora de silenciamiento**

La expresión de GFP libre a partir de un vector binario de sobreexpresión, es parcialmente silenciada por la planta a lo largo del tiempo, y por ello bajo luz UV se observa, a partir de un sector con expresión de fluorescencia verde, como progresivamente se hace más débil según pasan los días. Lo mismo ocurre al co-agroinfiltrar dicha construcción junto con una construcción que no tenga actividad supresora de silenciamiento, como el vector vacío, denominado delta, que se incluye como control negativo. Sin embargo, si se co-agroinfiltra junto con un vector que exprese una proteína con actividad supresora de silenciamiento, se suprime el silenciamiento del RNA mensajero expresado transitoriamente desde el T-DNA agroinfiltrado y se observa un mantenimiento de la fluorescencia derivada de GFP bajo luz UV, detectable en el sector agroinfiltrado con un verde brillante (Figura 14).



**Figura 14.** a) co-agroinfiltración de GFP junto con un vector que expresa una proteína con actividad supresora de silenciamiento. La señal no es silenciada por la planta y bajo luz UV se observa con un tono verde fuerte. b) co-agroinfiltración de GFP junto con una construcción que no tiene actividad supresora de silenciamiento. La señal es parcialmente silenciada por la planta y bajo luz UV se observa con un tono verde apagado, que va desapareciendo hasta no ser visible en absoluto.

Hojas de plantas de *N. benthamiana* fueron agroinfiltradas siguiendo esencialmente el protocolo descrito en la literatura (Valli et al. 2006), con las construcciones generadas en el citado pDEST pGWB 702 $\Omega$ . Brevemente, el procedimiento comienza con los cultivos de *A. tumefaciens* que se crecieron en medio YEB suplementado con los antibióticos de selección a partir de glicerizados durante 18-22h. Trascurrido este tiempo, las bacterias fueron resuspendidas en buffer de inducción (10mM ácido 2-N- morfolinetanosulfónico [MES]; 10 mM MgCl<sub>2</sub>;

200  $\mu$ M acetosiringona) y se dejaron inducir durante 2-3 horas en oscuridad. Se midió la densidad óptica a 600nm ( $OD_{600}$ ) y se ajustó a 0.3 unidades/construcción. En todos los casos, las construcciones se agroinfiltraron junto a GFP en hojas de *N. benthamiana* completamente expandidas, con la ayuda de una jeringuilla de 1 ml, sin aguja. En el caso de agroinfiltrar una única construcción, se empleó 0.3 unidades de la construcción + 0.3 unidades de GFP + 0.3 unidades de vector vacío. En el caso de co-agroinfiltrar dos construcciones, se emplearon 0.3 unidades de cada construcción + 0.3 unidades de GFP. Así pues, en todos los casos, la densidad optica final fue de 0.9, para poder comparar los resultados entre sí. A los 3, 5, y 7 días postagroinfiltración (dpai), observamos las hojas y fotografiamos la fluorescencia derivada de la expresión transitoria de GFP libre en las hojas, iluminando con lámpara UV. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Nikon 70D.

### **3.6.3 Análisis de expresión transitoria en planta: qRT-PCR**

A partir de 1ug de RNA total, tratado previamente con DNAsa para evitar contaminaciones por DNA genómico, se obtuvo cDNA empleando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). 50 ng de cDNA fueron utilizados como molde para realizar una cuantificación relativa de GFP por qPCR. El gen constitutivo de referencia que utilizamos en este caso fue la ubiquitina. Este gen está implicado en funciones básicas para la supervivencia celular por lo que su expresión constitutiva se considera más o menos constante. Para amplificar la GFP se han utilizado los primers descritos por Leckie y Stewart (2011), los cuales amplifican 102 bp. Los primers que se han empleado para amplificar la ubiquitina (Lacomme et al. 2003) amplifican un fragmento de 88 bp.

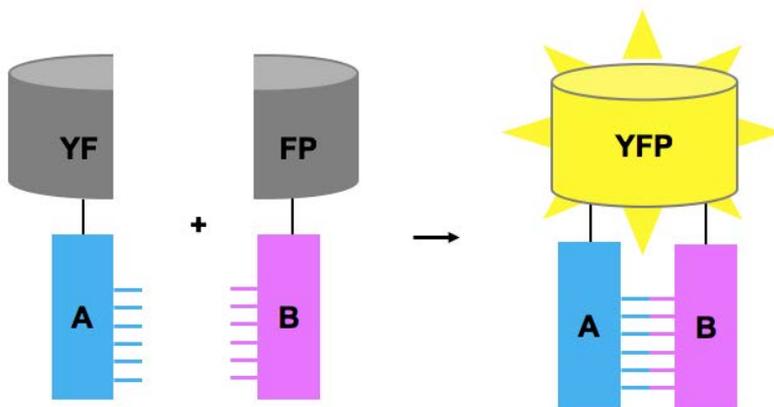
### 3.6.4 Localización y co-localización subcelular

Para esclarecer la localización *in vivo* de proteínas virales, los insertos en los plásmidos pENTRY P1 WMV y P25 CYSDV se llevaron a construcciones en los pDEST pGWB 742 (con el promotor 2x35S y YFP) y pGWB745 (2x35Spro, CFP) respectivamente, mediante reacción con LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen). Tras crecer los vectores obtenidos en *E. coli* TOP10, seleccionar colonias, crecerlas en medio LB suplementado con el antibiótico de selección, extraer DNA y realizar una digestión para validar las construcciones, se transfirieron a *A. tumefaciens* cepa EHA105, para realizar los distintos experimentos en planta. Con estas construcciones, se co-agroinfiltraron de manera tanto separada como conjunta hojas de plantas de *N. benthamiana* junto con el supresor de silenciamiento P19 del virus TBSV, amablemente cedido por la Dra. M. Martín (IRTA-CRAG Barcelona). Los cultivos de *A. tumefaciens* se crecieron en medio YEB suplementado con los antibióticos de selección rifampicina y spectinomocina a partir de glicerizados durante 18-22h. Trascurrido este tiempo, las bacterias fueron resuspendidas en buffer de inducción antes indicado, y se dejaron inducir durante 2-3 horas en oscuridad. Se midió la densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) y se ajustó a 0.3 unidades cada construcción.

### 3.6.5 Interacción proteína-proteína por Complementación bimolecular fluorescente (BiFC)

Para visualizar interacciones en células vivas utilizamos la técnica de la complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Se trata de un método muy sensible (Morell et al. 2008) basado en la interacción entre dos mitades de una proteína fluorescente, en nuestro caso YFP, fusionadas a las proteínas que se pretenden estudiar, que permite visualizar *in vivo*

interacciones potenciales proteína-proteína (Citovsky et al. 2006), bien entre proteínas iguales o diferentes, y establecer su ocurrencia subcelular *in vivo* y en el contexto celular por observación directa sobre tejido fresco, eliminando posibles artefactos causados por rotura celular o fijación del tejido previa a su visualización (Kerppola 2006). La asociación de proteínas produce un complejo fluorescente a partir de constituyentes no fluorescentes, y se ha utilizado en distintos tipos celulares y organismos (Kerppola 2006) (Figura 15).



**Figura 15.** La tecnología BiFC se basa en la expresión de pares de proteínas fusionadas a mitades de una proteína fluorescente, en este caso YFP. En caso de interacción entre las proteínas ensayadas, se puede reconstituir el fluoróforo dividido entre las dos mitades de la proteína fluorescente produciéndose emisión de fluorescencia cuando es excitado a la longitud de onda adecuada.

Para ello, los insertos de los plásmidos pENTRY P1 WMV y P25 CYSDV se movilizaron en este caso a los pDEST pBiFC2 2 (2x35S, N-YF) y pBiFC3 (2x35S, N-FP), mediante LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen). Tras proceder como en los casos anteriores para seleccionar colonias positivas, las construcciones se transfirieron a *A. tumefaciens* cepa

EHA105. De nuevo hojas de plantas de *N. benthamiana* fueron co-agroinfiltradas siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con combinaciones de estas construcciones, junto con controles positivos y negativos cedidos amablemente por el Dr. A. Valli (CNB Madrid), basados en interacciones bien caracterizadas (Valli et al. 2008). En todos los casos, las construcciones se co-agroinfiltraron combinando los vectores pBiFC2 y pBiFC3, junto con el supresor de silenciamiento P19 de TBSV ya mencionado.

### **3.7 Microscopía confocal**

Las preparaciones se montaron en agua unos minutos antes de llevarlas a observación en el Microscopio Confocal, a partir de fragmentos de tejido fresco colocado sobre portaobjetos. Se evitó en la medida de lo posible tomar tejidos con nerviaduras, para facilitar la visualización y evitar una superficie irregular. Se colocó el tejido sobre el portaobjetos, para observar campos de células epidérmicas en la superficie abaxial, desde la que se había infiltrado con la jeringuilla, y se cubrió la muestra con un cubreobjetos. Se observó el tejido con objetivos de inmersión en agua y en aceite a tiempos variables tras la infiltración (entre 2 y 6 dpai, dependiendo del tipo de experimento) y se tomaron imágenes con objetivos 20x, 40x y 63x, en función de si interesaba tomar imágenes de campos de células epidérmicas o centrarnos en compartimentos subcelulares. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal invertido LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania) con los siguientes ajustes de excitación (longitud de onda en la que un fluoróforo absorbe luz) y emisión (rango de longitudes de onda en las que un fluoróforo emite luz): para YFP, excitación a 514 nm y emisión de 525-550 nm y para CFP, excitación de 490 nm y emisión de 465 a 509 nm.

### 3.8 Obtención de clones infectivos

Se diseñaron oligos solapantes que amplificasen distintos fragmentos del genoma del virus escogido, en este caso CocMoV, cubriendo toda la región codificante y los extremos 5' y 3' del mismo (Tabla 5). Además, se diseñaron oligos para introducir dos intrones en el clon infectivo, interrumpiendo la ORF viral para evitar la posible toxicidad de productos virales en bacteria. Los cebadores correspondientes a los extremos del genoma 5' y 3' contienen una cola de 20-30bp correspondientes a las extremidades del vector denominado PRSV-delta-eco, que permite situar las construcciones de secuencias virales bajo el control de un promotor y un terminador funcionales en planta, y en el andamiaje de un plásmido con señales de replicación en bacterias y en levaduras (Desbiez et al. 2012). Las RT fueron realizadas sobre 2 µl de RNA total, utilizando 2.5 U de la enzima AMV RT (Promega) empleando los cebadores reversos para cada uno de los fragmentos. Dos microlitros de cada cDNA fueron usados para la amplificación de los fragmentos por PCR utilizando 2 U de la enzima Pfu DNA polimerasa (Promega). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo siguiendo el siguiente programa: 5 min a 95 °C, 35 ciclos de 45 s a 95 °C, 45 s a 50 °C, 5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. Los fragmentos de PCR del tamaño esperado fueron visualizados bajo luz UV, y purificados siguiendo protocolos estándar. Los intrones A y B también fueron amplificados de plásmidos que los presentaban, y fueron fusionados a los fragmentos 2 y 3 respectivamente, mediante PCR de fusión, y los productos visualizados en gel de agarosa bajo luz UV también fueron purificados como el resto.

**Tabla 5. Oligos empleados en la obtención de un clon infectivo de CocMoV**

Oligo	Secuencia 5'-3'
<b>CocMoV 1-F</b>	5' ATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGAAAATAAAA ATGACATGAAATTTTAC 3'
<b>CocMoV 2727-R</b>	5' AAGGCGCTTGGTGTGCAGC
<b>CocMoV 2727-intronA-F</b>	5' AATCAAAAACATGCTGCACACCAAGCGCCTT <b>GTAAGTTTC</b> <b>TGCTTCTACC</b> 3'
<b>CocMoV 2728-intronA-R</b>	5' CCATACACTTTGGCCTTCCGTGCATAAAGCCAC <b>CCTGCAT</b> <b>ATCAACAAATTTTG</b> 3'
<b>CocMoV 2728-F</b>	5' GTGGCTTTATGCACGGAAGG 3'
<b>CocMoV 3777-R</b>	5' CCACTTGTGGTCCGGCTCTTGAG 3'
<b>CocMoV 3777-IntronB-F</b>	5' TTTGACGACTCAAGAGCCGACCACAAGTGG <b>GTAAGTATG</b> <b>CACTTAAAGA</b> 3'
<b>CocMoV 3778-IntronB-R</b>	5' CGCTTTTCCCCTATGTAGAGTTAGAAGTGGT <b>CTGCATAA</b> <b>TTTCAAAGATTG</b> 3'
<b>CocMoV 3779-F</b>	5' ACCACTTCTAACTCTACATAG 3'
<b>CocMoV 5800-R</b>	5' ATGAAAGACACGCTACTCCTAC 3'
<b>CocMoV 5700-F</b>	5' CCGACTGGAGGGTTCGTGGC 3'
<b>CocMoV 7800-R</b>	5' CATCGATCGTTAAGATTGG 3'
<b>CocMoV 7700-F</b>	5' GATTCCGGTCATTTTCGACTGG 3'
<b>CocMoV 1-R</b>	5' GCGAATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAAATTT ACGCATAAGGGGTTAAT 3'

En amarillo se señalan los nucleótidos que hibridan con los intrones seleccionados para evitar la toxicidad en bacterias *E. coli*.

El vector PRSV-delta-eco procede de un clon completo del virus PRSV (Desbiez et al. 2012), y fue digerido con EcoRI y purificado. Todos los fragmentos obtenidos, se recombinaron en *S. cerevisiae* siguiendo los protocolos descritos anteriormente (Desbiez et al. 2012), y se crecieron en medio CAU a 28 °C. Se extrajo el DNA de levaduras siguiendo asimismo protocolos habituales, y se transformaron y multiplicaron

bacterias empleando *E. coli* cepa TOP10, siguiendo el protocolo estándar. Se seleccionaron distintas colonias del clon infectivo, creciéndolas en medio de cultivo LB suplementado con Ampicilina. Se extrajo DNA empleando el protocolo citado previamente y se seleccionaron diferentes enzimas de restricción para analizar las distintas colonias mediante digestión del DNA. Aquellas que presentaron el patrón de digestión esperado, fueron testadas en inoculación mediante métodos biolísticos (Gal-On et al. 1997) con partículas de Tungsteno aceleradas hacia plantas de melón y calabacín.

Para la obtención de un mutante del clon infectivo, se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos en sentidos opuestos (denominados forward y reverse) con las mutaciones que se deseaban generar, amplificándose dos fragmentos. Estos fragmentos se recombinaron *in vitro*, obteniéndose un fragmento recombinante de aproximadamente 1600 bp el cual contenía la mutación deseada. El clon infectivo FLC CocMoV fue digerido con las enzimas únicas Ball y SpeI, que flanquean la región mutagenizada. El fragmento correspondiente fue purificado a partir de gel de agarosa, y recombinado en levadura junto con el fragmento obtenido previamente por PCR con la mutación, siguiendo el mismo método empleado en la obtención de FLC CocMoV. La presencia de la mutación deseada, así como la ausencia de cualquier otra modificación en el fragmento intercambiado, fue verificada mediante secuenciación.

### **3.9 Análisis de frecuencia de deslizamiento de la polimerasa**

Se diseñaron oligos específicos que amplificasen una región de aproximadamente 250 bp que incluyesen los motivos G<sub>1-2</sub> A<sub>6-7</sub> localizados en las regiones de P1a y de P3 de CocMoV (Tabla 6).

**Tabla 6. Oligos empleados en el análisis de la frecuencia de deslizamiento de la polimerasa por secuenciación masiva.**

Nombre oligo	Secuencia	Tm
<b>P1aN-ALT CocMoV-Fw</b>	5' TTGCGTCAGAAAGGATGTTGTGG 3'	58°C
<b>P1aN-ALT CocMoV-Rv</b>	5' GCGGGGTTGATAATGAAGTCACC 3'	59°C
<b>P3N-PIPO CocMoV-Fw</b>	5' AGAAGATGAACCAGAACTGTCAAG 3'	57°C
<b>P3N-PIPO CocMoV-Rv</b>	5' CGTTTTCTTGCTTTTCCCATAAAC 3'	56°C

Dichas regiones, fueron amplificadas por RT-PCR a partir de RNA extraído de plantas de melón en infección sencilla por CocMoV y también mixta, en este caso junto con virus homólogos (el potyvirus WMV) o heterólogos (el crinivirus CYSDV), empleando para la transcripción inversa AMV (Promega) y Pfu DNA polimerasa (Promega) para la PCR. Los productos obtenidos se purificaron a partir de gel de agarosa, y estos fueron secuenciados por secuenciación masiva (illumina-miSeq) en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid. Los datos obtenidos fueron procesados con la asistencia del Dr. A. Valli (CNB-CSIC, Madrid), usando programas (in house scripts) desarrollados previamente por colaboradores del grupo y ya utilizados con amplicones de otros virus con el mismo propósito (Rodamilans et al. 2015), incluyendo el caso descrito para SPFMV (Mingot et al. 2016). Finalmente, el tratamiento estadístico de los datos se llevó a cabo con la asistencia de personal de la Unidad de Bioinformática del CRAG (<https://www.cragenomica.es/core-facilities/bioinformatics-core-unit>).



## **RESULTADOS**



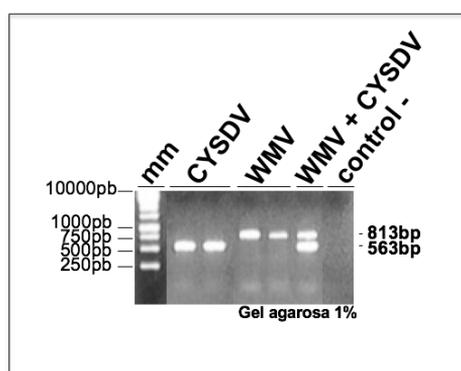
## 4. Resultados

### 4.1 Dinámica de la carga viral

#### 4.1.1 Análisis de la carga viral de CYSDV y WMV en infecciones sencillas y mixtas

Se realizaron análisis para determinar si los títulos virales de CYSDV y WMV varían en infección sencilla frente a mixta. Para ello, 20 plantas de melón PS T111 fueron inoculadas con CYSDV empleando mosca blanca como vector natural, otras 20 plantas con WMV empleando pulgones, y 40 plantas con ambos virus al mismo tiempo (co-infección). Como control negativo, se mantuvo un lote de 5 plantas sin inocular durante todo el experimento.

A los 24 días, se analizaron las plantas por RT-PCR empleando las parejas de cebadores WMV-F / WMV-R para detectar WMV, y MA 129 / MA156 para detectar CYSDV (secuencias en apartado 3.3.3). En el caso de infecciones mixtas, se emplearon ambos pares de oligonucleótidos al mismo tiempo, realizando una reacción multiplex (Figura 16).



**Figura 16.** Ejemplo de gel de agarosa utilizado para analizar los resultados de infecciones virales en plantas de melón, empleando cebadores específicos para CYSDV, para WMV, y la combinación

## Resultados

de ambos en una reacción de tipo multiplex. El primer carril (mm) se cargó con marcador comercial (DNA ladder) de tamaños que se indican a la izquierda. Las muestras analizadas se indican en la parte superior de la imagen. A la derecha se muestran los tamaños esperados de los amplicones correspondientes a la presencia de CYSDV (563 pb) o de WMV (813 pb).

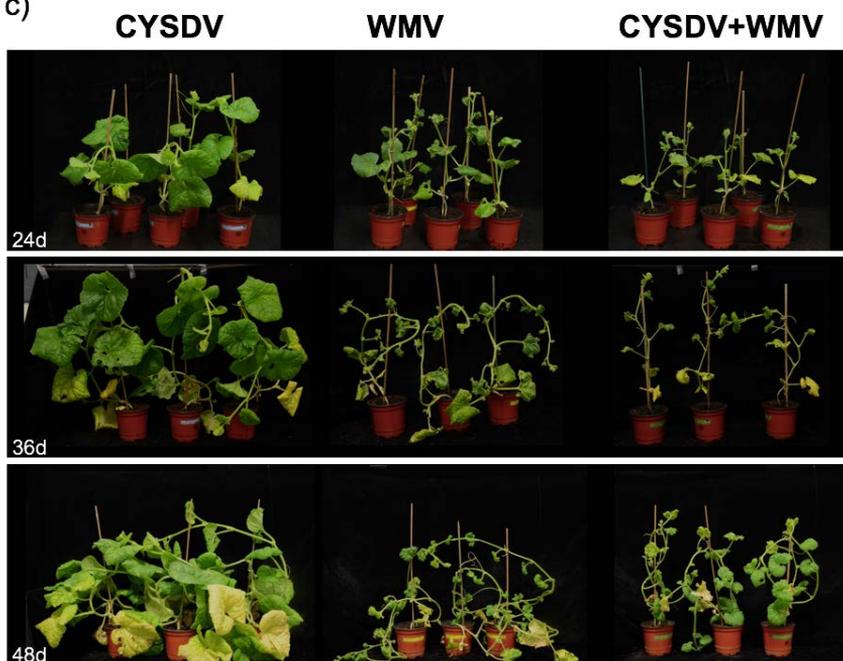
Se realizó el seguimiento de las plantas infectadas a lo largo de 60 días, tomando muestras y fotografías cada 12 días (Figura 17) para estudiar la evolución de cada una de las infecciones a lo largo del tiempo.



b)

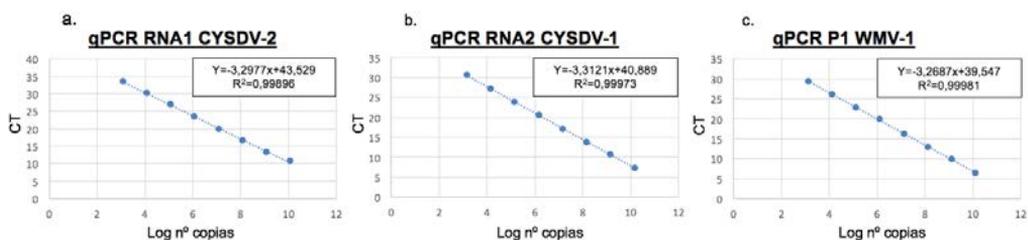


c)



**Figura 17.** Seguimiento de infecciones sencillas y mixtas a distintos tiempos. Las fotografías se tomaron a los tiempos que se muestran en el extremo inferior izquierdo de cada composición. Cada tipo de planta (control no infectado, o infectadas con uno o dos virus) se indica encima de las imágenes. a) Detalles individuales de cada tipo de infecciones virales en cinco tiempos (12, 24, 36, 48 y 60 dpi). b) Comparación de los cuatro tipos a tres tiempos (24,36 y 48 dpi). c) Uniformidad de grupos de plantas (entre 3 y 5) a tres tiempos (24,36 y 48 dpi).

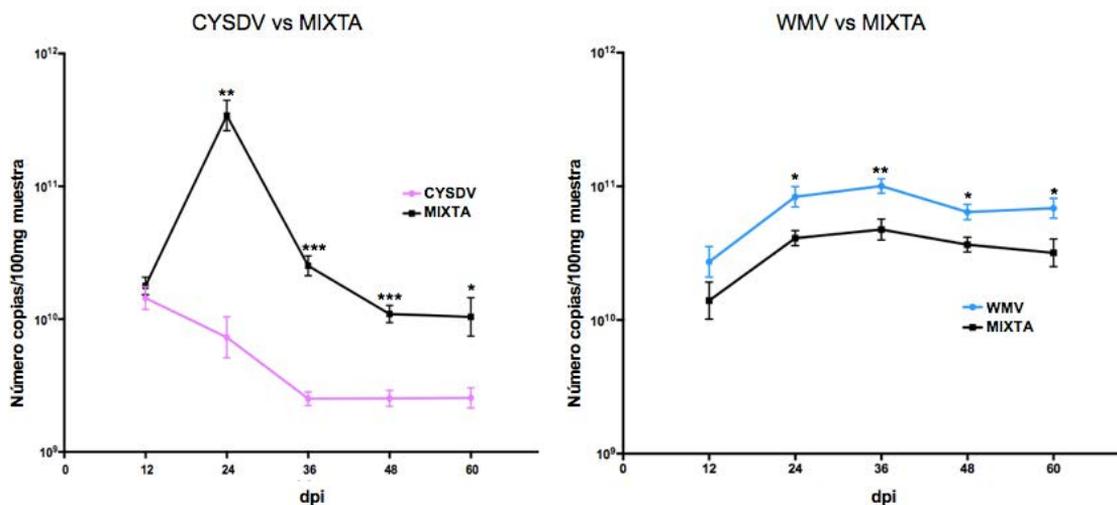
El análisis de carga viral se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta por qRT-PCR empleando como referencia rectas patrón obtenidas comparando las amplificaciones con transcritos correspondientes a fragmentos del genoma localizados cerca de los extremos 5' para cada uno de los virus. En el caso de CYSDV, se diseñó y llevó a cabo la cuantificación tanto para el RNA1 como para el RNA2. Para optimizar el análisis, se diseñaron y ensayaron dos pares de cebadores para cada recta patrón, seleccionándose aquellos que mejor resultado dieron (Figura 18).



**Figura 18.** Rectas patrón obtenidas con los pares de cebadores seleccionados para los RNAs virales que se indican. Los índices de correlación entre las diluciones y las lecturas de CT se muestran con 5 cifras decimales

Se observó que las proporciones relativas entre RNA1 y RNA2 de CYSDV se mantenían tanto a tiempos cortos como al final del experimento (resultados no mostrados), por lo que se decidió usar únicamente una de las medidas para correlacionar la carga viral. De todas las muestras recogidas a lo largo de los 60 días de duración del experimento, se extrajeron RNAs empleando TriZol Reagent (Ambion) y se cuantificaron los niveles de carga viral. Este experimento se repitió de manera independiente más adelante empleando la misma cámara de crecimiento de plantas, bajo las mismas condiciones de luz, humedad y temperatura. Se observó que los análisis de carga viral en cada

experimento generaban datos muy similares en ambos casos, por lo que el análisis estadístico de la carga viral de CYSDV y WMV se realizó en su conjunto, empleando un total de 15 plantas infectadas con WMV, 15 plantas infectadas con CYSDV y 12 plantas infectadas con ambos virus en cada uno de los puntos temporales de muestreo (5 puntos).



**Figura 19.** Representación de la carga viral de CYSDV y WMV en infecciones sencillas y mixtas. Cada punto representa la media y error estándar (SEM) a partir de 15 plantas independientes infectadas con CYSDV, otras 15 infectadas con WMV y 12 infectadas con ambos. Analizados en 5 puntos diferentes, cada 12 días, en 2 replicas biológicas a distintos tiempos. \*P < 0.05; \*\* P < 0.005; \*\*\*P < 0.0005

En el caso de CYSDV, nuestros datos muestran que la carga viral aumenta significativamente en presencia de WMV ocasionando un claro sinergismo, con un pico de acumulación a 24 dpi con la máxima diferencia entre infección individual y mixta, que en sucesivos puntos temporales se reduce algo, aunque siempre los niveles de CYSDV en la infección mixta se mantienen por encima de los de la infección individual. En contraste con lo anterior, en el caso de WMV se observa una

disminución de la carga viral en infecciones mixtas respecto a infecciones sencillas (Figura 19). Los dos efectos fueron reproducibles, y los análisis individuales de cada experimento muestran idénticas tendencias que las del análisis conjunto.

### **4.2 Diseminación por insectos vectores**

#### **4.2.1 Transmisión primaria de CYSDV y WMV a partir de plantas en infección sencilla y mixta.**

Se han realizado experimentos de transmisión primaria de planta a planta, empleando como fuentes de inóculo plantas infectadas con CYSDV, plantas infectadas con WMV y plantas infectadas con ambos virus a 24 dpi. Se escogió este punto ya que es donde hemos observado las mayores diferencias de carga viral entre infecciones simples y dobles, como acabamos de comentar.

Para la transmisión primaria de WMV, se emplearon 40 plantas de melón como receptoras empleando pulgones que habían adquirido el virus en plantas infectadas sólo con WMV y otras 40 plantas se utilizaron como receptoras, usando insectos que habían adquirido el virus en plantas infectadas con WMV+CYSDV. En todos los casos la adquisición se prolongó durante 10', y permitiendo la inoculación durante al menos 1 hora y se usaron entre 5 y 10 pulgones por planta. En el caso de CYSDV, también se inocularon 40 plantas de melón a partir de plantas infectadas solamente con CYSDV, y otras 40 a partir de plantas inoculadas con ambos virus. En este caso, se emplearon 20 moscas blancas como vectores naturales de CYSDV, usando períodos de adquisición e inoculación de 48 h. A los 24 días después de la transmisión, se analizaron las plantas por RT-PCR empleando los primers WMV-F /

WMV-R para detectar WMV y MA 129 / MA156 para detectar CYSDV (secuencias en apartado 3.3.3). Este mismo ensayo, se repitió independientemente dos veces en las mismas condiciones experimentales, observándose la misma tendencia en las dos repeticiones. En la tabla 7 se muestran los distintos porcentajes de transmisión agrupados para CYSDV y WMV.

**Tabla 7. Transmisión primaria de CYSDV y WMV a partir de plantas en infección sencilla y mixta.**

Virus a transmitir	Vector empleado	Fuente de inóculo	Plantas analizadas <sup>1</sup>	Plantas infectadas	
CYSDV		CYSDV	79	42	 53.2%
		CYSDV+WMV	80	33	 41.25%
WMV		WMV	80	38	 47.5%
		CYSDV+WMV	78	51	 65.4%

<sup>1</sup> Los números de plantas analizadas e infectadas (siguiente columna) derivan de dos experimentos independientes, realizados en las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad, con un total de 40 plantas/tratamiento en cada uno. Únicamente se contabilizan las plantas que sobrevivieron hasta el final del ensayo para ser analizadas

El porcentaje de transmisión de CYSDV se observa que es ligeramente menor a partir de plantas mixtas comparadas con la tasa obtenida en plantas infectadas con sólo CYSDV, mientras que en el caso de WMV, el porcentaje de transmisión es mayor a partir de plantas en infección mixta que en infección individual. Estos datos porcentuales contrastan con las medidas de carga viral que hemos mencionado anteriormente, puesto que la mayor acumulación de CYSDV no se corresponde con una mayor transmisión, y en cambio la disminución de WMV observada produce un paradójico aumento de la eficiencia de transmisión.

A partir de esta información, nos planteamos llevar a cabo experimentos adicionales sobre la transmisión de cada virus por sus vectores respectivos. A continuación, se detallan por separado los resultados obtenidos.

#### 4.2.2 Ensayos de preferencia con *Myzus persicae*

Se han realizado distintos ensayos de preferencia empleando *M. persicae* utilizando distintas combinaciones de plantas sin infectar e infectadas para estudiar si la presencia de WMV tiene algún efecto de atracción hacia sus vectores naturales. Para ello, se comparó la preferencia de los pulgones entre hojas infectadas con WMV, con CYSDV y hojas sanas (Tabla 8).

**Tabla 8. Preferencia de *M.persicae* comparando hojas infectadas con WMV, infectadas con CYSDV y sin infectar.**

Planta	Repeticiones <sup>a</sup>					% <sup>b</sup>
	1	2	3	4	5	
<b>WMV</b>	1,1,5,6,3 16 (64%)	10,7,2,7,0 26 (40%)	0,2,0,3,3 8 (28%)	1,2,4,6,1 14 (46%)	0,1,2,5,3 11 (16%)	32.8%
<b>CYSDV</b>	0,1,1,0,0 2 (8%)	3,4,10,3,1 21 (32%)	3,1,1,0,5 10 (35%)	3,0,1,2,0 6 (20%)	2,6,3,17,8 36 (52%)	29.9%
<b>Control</b>	3,4,0,0,0 7 (28%)	5,1,0,3,8 17 (26%)	0,6,3,1,0 10 (35%)	0,0,1,3,6 10 (33%)	2,4,5,0,10 21 (30%)	30.9%

<sup>a</sup> Cada repetición del experimento consistió en 5 placas de Petri con 30 pulgones cada una. Los valores en la línea superior indicaron el número de pulgones encontrados en las hojas en cada una de las 5

placas de Petri. En la línea inferior, el número total de pulgones y entre paréntesis, el porcentaje.

<sup>b</sup> Porcentajes de preferencia con los valores aditivos combinados de las cinco repeticiones del experimento.

En cada experimento se utilizaron 30 pulgones por placa, y a las 24 horas se realizó un conteo del número de insectos en cada hoja. Como se puede ver en la tabla 8, en nuestras condiciones no se observaron diferencias en cuanto a preferencia por parte de *M.persicae*.

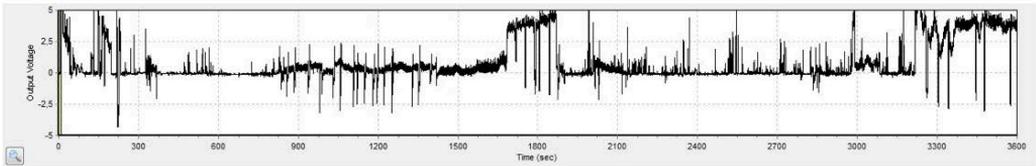
#### **4.2.3 EPGs de pulgones alimentándose sobre diferentes tipos de plantas**

La paradoja que plantea la falta de correlación antes mencionada para WMV entre carga viral y transmisibilidad se abordó considerando posibles efectos sobre el comportamiento de vectores, para lo cual se realizaron experimentos durante una estancia breve en el ICA-CSIC-Madrid, bajo la supervisión de la Dra. A. Moreno y el Dr. A. Fereres para obtener gráficos de penetración eléctrica (EPGs), centrándonos de nuevo en el caso de pulgones y WMV.

El objetivo del estudio era determinar la posible influencia de CYSDV sobre la transmisión de WMV, monitorizando el comportamiento alimenticio de *M. persicae*, sobre plantas infectadas con WMV y plantas infectadas con WMV+CYSDV al mismo tiempo, incluyendo como controles plantas no inoculadas e infectadas únicamente con CYSDV. En cada registro EPG se utilizó una planta de cada tratamiento recogiendo datos durante una hora (Figura 20).

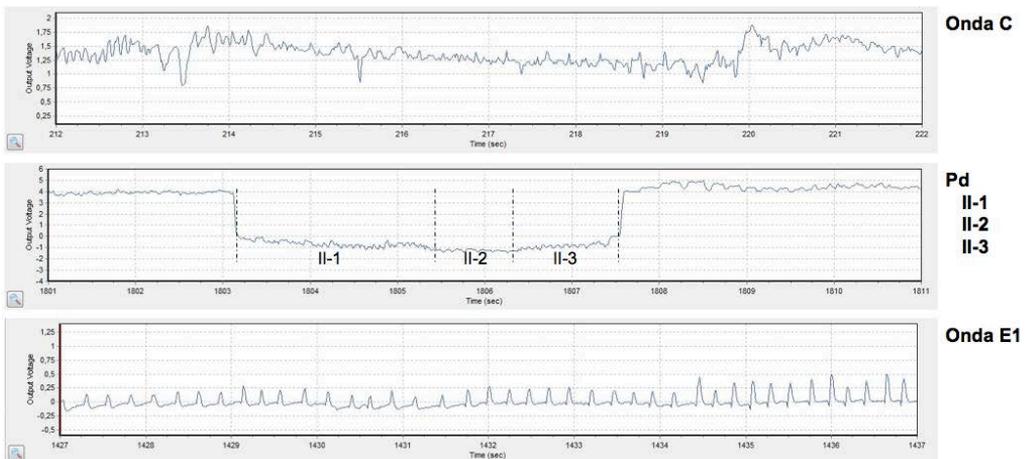
## Resultados

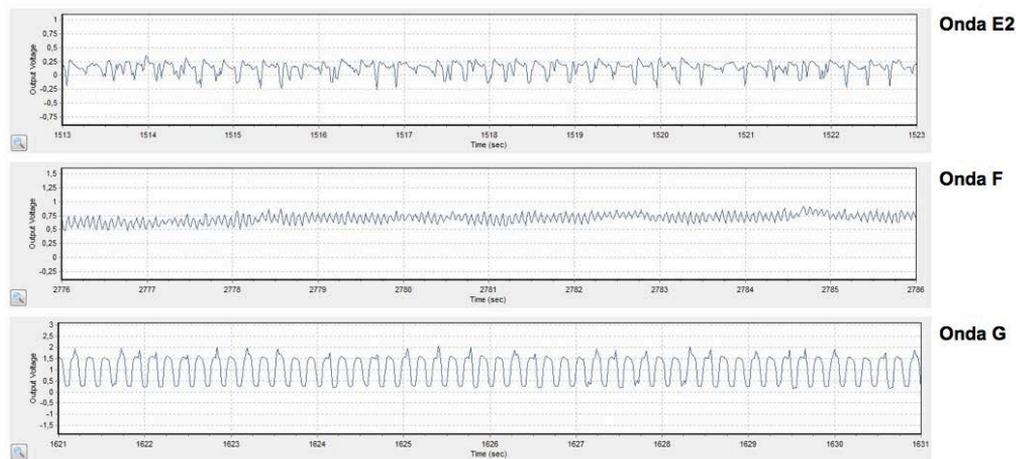
Registro 1 h



**Figura 20:** Ejemplo de registro de EPG de 1h de duración, obtenido con el programa Stylet + que muestra las alteraciones de voltaje (eje de ordenadas) a lo largo del tiempo (eje de abcisas).

Un total de 30 y 28 réplicas de registros individuales para WMV y mixtas fueron llevadas a cabo respectivamente. De cada una de las réplicas, se marcaron las ondas empleando el programa Stylet+ (EPG systems, Wageningen, The Netherlands). En la figura 21 se pueden ver ejemplos de las distintas ondas obtenidas en nuestros experimentos de acuerdo a la clasificación de Tjallingii, 1978.





**Figura 21.** Ejemplos de los distintos tipos de ondas marcadas a partir de los registros obtenidos con el programa Stylet + en intervalos correspondientes a 10s. El significado en comportamiento de cada onda está explicado en el apartado correspondiente a EPG de la introducción.

Todas las variables de comportamiento se procesaron utilizando la plantilla de Excel para el cálculo automático de datos EPG, desarrollada por Sarria et al. (2009). Los datos obtenidos, se transformaron antes del análisis mediante  $\ln(x + 1)$  y se evaluó su normalidad. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney (para variables no gaussianas) empleando el programa GraphPad prism 6.0 (Tabla 9).

**Tabla 9. Parámetros correspondientes a las variables de comportamiento alimenticio de pulgones analizadas para los tratamientos de infecciones por WMV y mixta**

Variables	Tratamiento	PPW	NWEI	P <sup>a</sup>	WDI	P <sup>a</sup>	WDE <sup>b</sup>
<b>NP</b>	WMV	30/30	0,80±0,03 (0,48-1,04)	0,73	3,07±0,05(2,28-3,32)	<b>0,04</b>	2,10±0,04(0,65-3,18)
	mixta	28/28	0,82±0,04 (0,30-1,18)		2,96±0,05(2,19-3,39)		2,00±0,03(0,84-2,98)
<b>P</b>	WMV	30/30	0,77±0,03 (0,30-1,00)	0,55	2,79±0,06(2,08-3,25)	0,10	1,69±0,05(0,94-3,23)
	mixta	28/28	0,80±0,04(0,30-1,15)		2,93±0,05(2,36-3,26)		1,68±0,05(0,92-3,26)
<b>C</b>	WMV	30/30	0,77±0,03 (0,30-1,00)	0,48	2,75±0,06(2,08-3,25)	0,06	1,69±0,04(0,94-3,05)
	mixta	28/28	0,80±0,04(0,30-1,15)		2,91±0,05(2,36-3,26)		1,68±0,05(0,92-3,26)
<b>pd</b>	WMV	30/30	1,14±0,05 (0,60-1,59)	0,12	1,75±0,05(1,11-2,13)	<b>0,02</b>	0,70±0,005(0,52-1,12)
	mixta	28/28	1,24±0,04(0,70-1,62)		1,90±0,04(1,29-2,20)		0,74±0,005(0,54-1,18)

**PPW:** proporción de individuos que producen el tipo de onda; **NWEI:** Número de ondas producidas por insecto; **WDI:** duración de las ondas (min) por insecto; **WDE:** duración de las ondas (min) por evento (Backus et al. 2007). **NP:** No-prueba; **P:** prueba **C:** intercelular; **pd:** intracelular; (Prado and Tjallingii. 1994)

<sup>a</sup> Comparación estadística entre los dos tratamientos: utilizando el test no-paramétrico U-Mann Whitney para variables de distribución no Gaussiana. En negrita se muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> La duración de las caídas de potencial (pd) están expresadas en segundos.

Como se puede observar en la tabla 9, los pulgones se pasan más tiempo sin probar en plantas infectadas con WMV, y además se observa una mayor duración de Pds en plantas infectadas con WMV+CYSDV, tanto por insecto como por evento. Para profundizar en esta observación, se realizó un análisis estadístico de la duración de cada una de las subfases de las PDs (Tabla 10)

**Tabla 10. Análisis de la duración de las subfases dentro de las ondas Pd.**

Subfases Pd	Tratamiento	PPW	WDI	P <sup>a</sup>
II-1	WMV	30/30	1,36±0,05(0,75-1,82)	0,09 <sup>3</sup>
	mixta	28/28	1,49±0,05(0,81-1,90)	
II-2	WMV	30/30	1,03±0,05(0,52-1,46)	0,08 <sup>3</sup>
	mixta	28/28	1,15±0,05(0,53-1,53)	
II-3	WMV	30/30	1,34±0,04(0,77-1,69)	<b>0,002<sup>3</sup></b>
	mixta	28/28	1,53±0,04(0,91-1,84)	

**PPW:** proporción de individuos que producen el tipo de onda; **WDI:** duración de las ondas (min) por insecto.

<sup>a</sup> Comparación estadística entre los dos tratamientos: utilizando el test no-paramétrico U-Mann Whitney para variables de distribución no Gaussiana. En negrita se muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Como se muestra en la tabla, la duración de la subfase 3 de las Pds, relacionada con la adquisición de virus no-persistentes, es mayor en plantas infectadas con WMV+CYSDV. Análisis equivalentes se realizaron para comparar el comportamiento de pulgones sobre plantas no infectadas (control) y sobre plantas únicamente infectadas con CYSDV, donde no se encontraron diferencias relativas a los parámetros evaluados (no mostrado).

### **4.2.4 Transmisión secundaria de CYSDV**

Las diferencias del modo de transmisión, no persistente en el caso de WMV y semipersistente en CYSDV, nos llevaron a plantear experimentos diferentes. La mayor duración de los períodos de adquisición e inoculación en el caso de CYSD, así como la mayor movilidad de las moscas blancas comparadas con los pulgones, desaconsejaban usar análisis mediante EPG, por lo que combinamos los ensayos de preferencia y de transmisión en condiciones que denominamos de semi-campo

Estos experimentos de transmisión secundaria se han llevado a cabo en “La Mayora, IHSM-CSIC-UMA, Málaga”, ya que nuestros colaboradores en este Instituto disponen de las instalaciones necesarias para realizar este tipo de ensayos en umbráculos cubiertos con mallas que impiden la salida de los insectos vectores confinados.

Brevemente, se usó un diseño experimental empleando como fuentes de inóculo plantas infectadas con CYSDV, o plantas infectadas con CYSDV+WMV. También se quiso evaluar la posible influencia de la presencia del virus heterólogo (WMV) en las plantas receptoras infectadas, por lo que se emplearon por una parte como receptoras plantas no infectadas, y por otra, plantas previamente infectadas con WMV. Se recogieron en cada tanda de experimentos un total de 9600 moscas, y se liberaron a razón de 800 por umbráculo (relación de 40 moscas por planta), dejándolas en el centro de las plantas inóculo sobre una placa Petri. De cada combinación, se realizaron tres réplicas paralelamente (en tres umbráculos en posiciones alternadas), para que las condiciones de luz, humedad y temperatura fuesen comparables en cada caso.

A los 21 dpi se muestrearon y analizaron todas las plantas receptoras de cada uno de los umbráculos mediante la técnica de Tissue print. Los

resultados de estos experimentos (Tablas 11 y 12), muestran como tendencia general que la transmisión es algo mayor cuando las plantas receptoras estaban previamente infectadas con WMV; no obstante, los elevados porcentajes de transmisión en la primera reiteración (Tabla 11) parecen indicar que en ese caso el sistema de experimentación estaba cercano a la saturación, por lo que no se observaban diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 11. Transmisión secundaria de CYSDV a partir de plantas en infección sencilla y mixta, comparando plantas receptoras no infectadas e infectadas con WMV.**

<b>Plantas fuente de inóculo</b>	<b>Plantas receptoras</b>	<b>Porcentaje plantas infectadas<sup>1</sup></b>
CYSDV	No infectadas	88.3%
	WMV	93.3%
CYSDV+WMV	No infectadas	86.2%
	WMV	98.3%

<sup>1</sup>Porcentaje de plantas infectadas. Datos obtenidos a partir del análisis conjunto de 3 réplicas por tratamiento.

En el caso de la repetición independiente del mismo experimento, siguiendo el mismo diseño experimental (Tabla 12), se comprobó que la tendencia observada se mantenía, incluso con unas tasas de transmisión más bajas. La elevada variabilidad entre el primer y el segundo experimento sugiere que las condiciones ambientales (y en particular la temperatura) son críticas para los resultados de los ensayos de semi-

campo, por lo que es absolutamente necesario llevar a cabo todos los experimentos en paralelo y en umbráculos contiguos.

**Tabla 12. Transmisión secundaria de CYSDV a partir de plantas en infección sencilla y mixta, comparando plantas receptoras no infectadas e infectadas con WMV (Repetición).**

Plantas fuente de inóculo	Plantas receptoras	Porcentaje plantas infectadas <sup>1</sup>
CYSDV	No infectadas	37.9%
	WMV	55.2%
CYSDV+WMV	No infectadas	40%
	WMV	56.7%

<sup>1</sup>Porcentaje de plantas infectadas. Datos obtenidos a partir del análisis conjunto de 3 réplicas por tratamiento.

No obstante la alta variabilidad observada, con los datos obtenidos en cada una de las réplicas se realizó un análisis estadístico T-test para comparar entre distintas plantas receptoras y distintos tratamientos, empleando el programa GraphPad prism 6.0. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados).

### **4.3 Interacción entre distintos productos génicos virales**

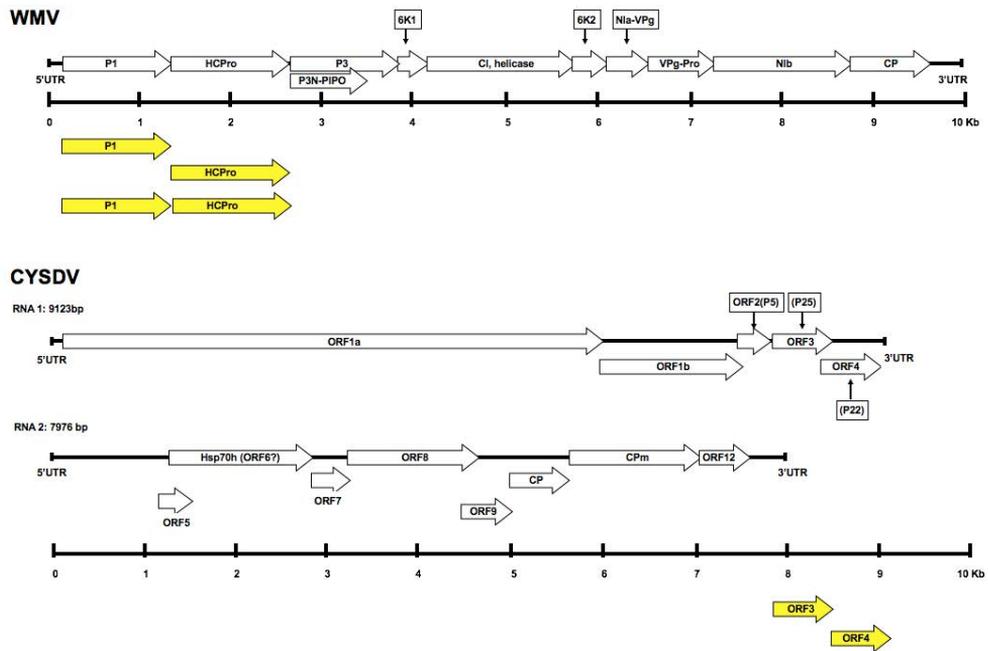
#### **4.3.1 Supresores de silenciamiento**

Puesto que trabajos ya publicados han demostrado la actividad supresora de la proteína p25 de CYSDV (Kataya et al. 2009), decidimos clonar la p25 de nuestro aislado español para corroborar su actividad supresora, así como la proteína p22 del mismo virus. Este último producto génico se localiza en una posición del genoma (parte final del RNA1) cercana a p25, que en ocasiones en otros crinivirus incorporan genes que se han relacionado con fenómenos de modulación de la capacidad de supresión de silenciamiento (Kreuze et al. 2005). Nuestro objetivo era realizar distintas combinaciones entre supresores de silenciamiento ya conocidos y otros productos génicos considerados como no supresores pero que podrían afectar a su función, tanto en CYSDV como en WMV. Para WMV se decidió clonar las proteínas P1 y HCPro localizadas en el extremo 5' de su genoma, así como ambos productos en cis, dado su sistema de expresión como poliproteína formando parte de un único cistron. En muchos otros potyvirus se ha demostrado ampliamente que HCPro es el supresor de silenciamiento y que su actividad puede ser modulada por P1 (Tena Fernandez et al. 2013; Pasin et al. 2014).

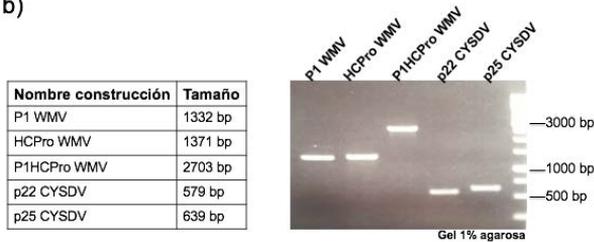
Además de corroborar la actividad supresora de P25 en el aislado español de CYSDV empleado en este trabajo, nuestros experimentos han permitido determinar por primera vez de forma experimental, la esperable actividad supresora de HCPro de WMV (Figura 22). En cuanto a los otros productos génicos, ni p22 de CYSDV ni P1 de WMV presentaron actividad supresora de silenciamiento cuando se expresaban de forma individual, aunque en el caso de la construcción en cis de P1-HCPro se comprobó que la actividad se mantenía, previsiblemente por la co-expresión de HCPro.

# Resultados

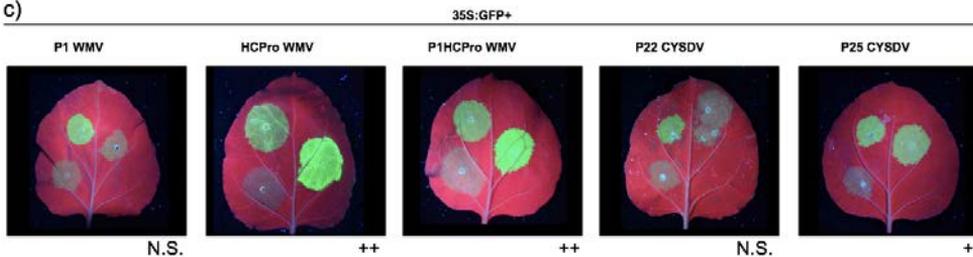
a)



b)



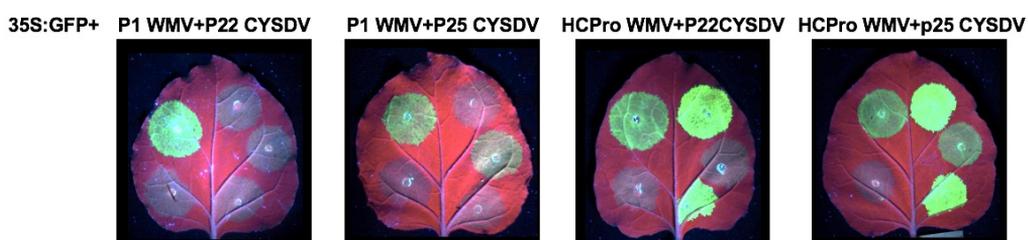
c)



**Figura 22.** a) Representación esquemática a la misma escala de los genomas virales de WMV y CYSDV con los productos génicos representados como flechas en blanco, así como de las construcciones diseñadas que se muestran debajo de las reglas de tamaño como flechas amarillas. b) Tamaños esperados de los

insertos para las diferentes construcciones y sus productos obtenidos por RT-PCR y analizados en gel de agarosa 1%. A la derecha se indican algunos de los tamaños del marcador molecular 1Kb (DNA ladder). c) Imágenes tomadas bajo luz ultravioleta de la co-agroinfiltración de las construcciones obtenidas junto 35S:GFP a 5 dpai. En la parte superior izquierda de la hoja se encuentra el control positivo (pBIN:P1b CVYV) y en la parte inferior izquierda se encuentra el control negativo (vector vacío). En la parte derecha de la hoja se se agroinfiltró la construcción que se indica en cada caso. Debajo de cada figura se indica la valoración visual de la actividad supresora en cada caso, conforme a la siguiente escala: N.S. no supresor; +: supresor débil, ++: supresor fuerte.

Como nuestro objetivo principal se focalizaba en analizar las posibles interacciones funcionales durante las infecciones mixtas, a continuación se llevaron a cabo experimentos de expresión transitoria en planta, realizando co-agroinfiltraciones entre los distintos productos génicos de CYSDV y WMV obtenidos (Figura 23).

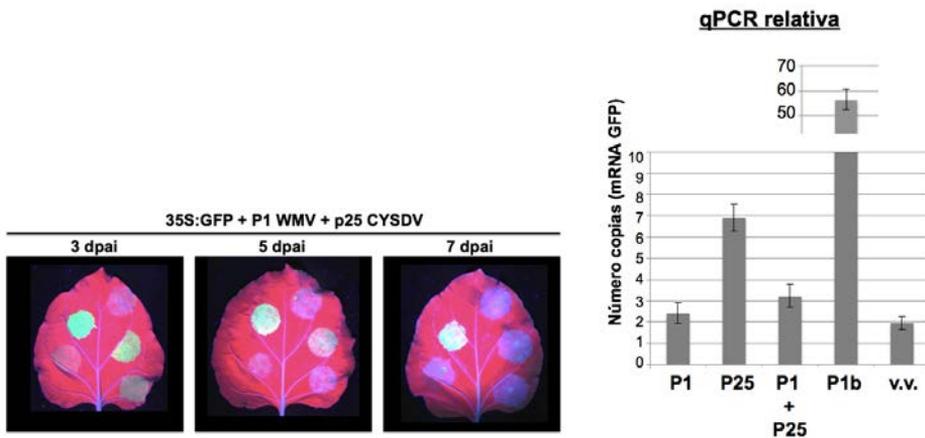


**Figura 23.** Imágenes tomadas bajo luz ultravioleta de Co-agroinfiltraciones de 35S:GFP + distintos supresores y no supresores a 5 dpai. En la parte izquierda se muestran los mismos controles que en la figura anterior. En la parte derecha, y en orden de arriba abajo: construcción 1; construcción 2; construcciones 1+2 (de acuerdo con el encabezado de la foto).

En el caso de P1 de WMV + P25 de CYSDV se observó una inesperada influencia negativa del no supresor (P1) sobre el supresor heterólogo (P25), visible como una atenuación evidente de la intensidad de la señal de GFP respecto a la que se observaba con el supresor expresado individualmente.

#### 4.3.2 Efecto de P1 de WMV sobre la actividad de P25 de CYSDV

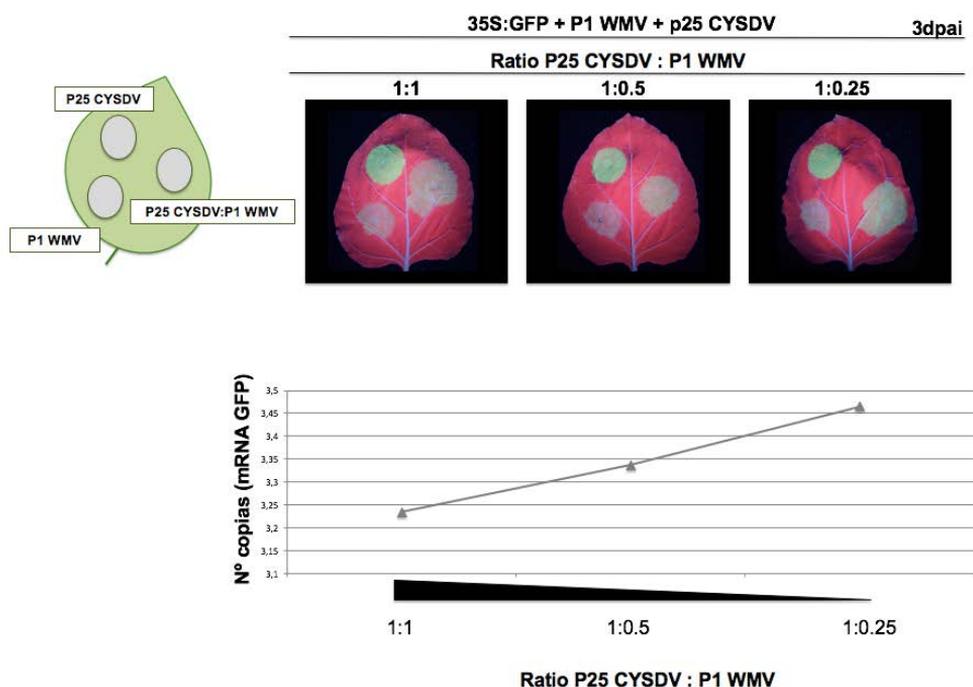
Para profundizar en la observación mencionada al final del apartado anterior, se realizó un nuevo ensayo de expresión transitoria en planta de co-expresiones de las dos proteínas virales, donde se tomaron fotografías bajo luz UV y muestras a 3-5-7 dpai (Figura 24). Como se puede observar, efectivamente se confirma que P1 de WMV hace que la actividad supresora de P25 de CYSDV disminuya de forma clara.



**Figura 24.** Efecto de P1 de WMV sobre P25 de CYSDV a distintos tiempos. Izquierda: imágenes tomadas bajo luz ultravioleta de co-agroinfiltración 35S:GFP + P1WMV + p25CYSDV a 3, 5 y 7 días post-agroinfiltración. La distribución de los sectores de hoja agroinfiltrados es la misma que en la figura anterior, incluyendo los mismos controles. Derecha: análisis de mRNA GFP por qRT-PCR relativa al gen de referencia ubiquitina (3 dpai).

### Efecto dependiente de dosis

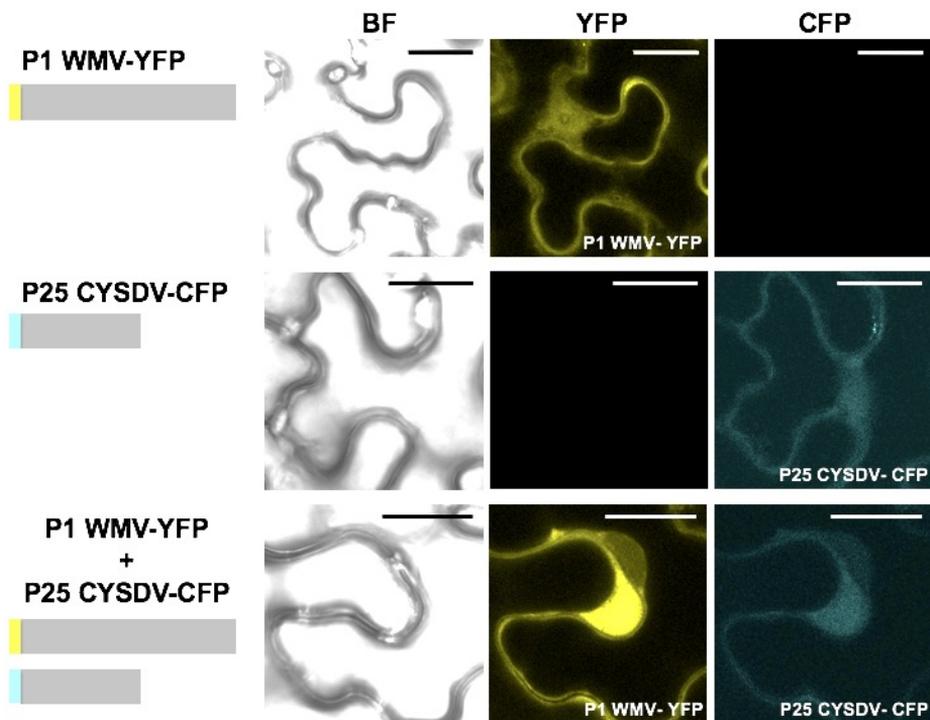
Siguiendo con el estudio del efecto negativo que la P1 de WMV mostraba sobre la actividad de la P25 de CYSDV, se realizó un experimento donde las cantidades de la construcción que permite la expresión transitoria de P25 de CYSDV se mantenían constantes, y las de la correspondiente construcción de P1 de WMV se iban disminuyendo exponencialmente (Figura 25), observando que la actividad supresora de P25 de CYSDV se va recuperando a medida que la cantidad relativa de P1 de WMV disminuye, algo compatible con un efecto directo de la segunda sobre la función de la primera.



**Figura 25.** Dosis-respuesta de la presencia de P1 de WMV sobre la actividad de P25 de CYSDV. Arriba: esquema de la disposición de los sectores agroinfiltrados e imágenes tomadas bajo luz ultravioleta de las correspondientes co-agroinfiltraciones, variando las proporciones de P25CYSDV:P1WMV. Abajo: análisis de mRNA GFP por qRT-PCR relativa al gen de referencia ubiquitina (3 dpai).

### 4.3.3 Localización y co-localización subcelular de P1 de WMV y P25 de CYSDV4

Se obtuvieron las proteínas de fusión YFP-P1 y CFP-P25 y seguidamente, se determinó la localización subcelular de las mismas mediante análisis de expresión transitoria en plantas de *N. benthamiana* y microscopía láser confocal. La señal fluorescente de YFP y CFP se detectó simultáneamente empleando un microscopio confocal Leica SP5.



**Figura 26.** Microscopía láser confocal de hojas de *N. benthamiana* agroinoculadas con P1-YFP, con P25-CFP y con ambas al mismo tiempo. La columna BF muestra el campo claro, la columna YFP el campo amarillo y la columna CFP el campo azul. Barra de tamaño 20 μm.

La emisión de YFP se captó en la ventana ajustada a 525-550 nm y la de CFP a 465-509 nm para evitar el cruce de señales fluorescentes. La fluorescencia derivada de la proteína YFP-P1 se localizó en núcleo,

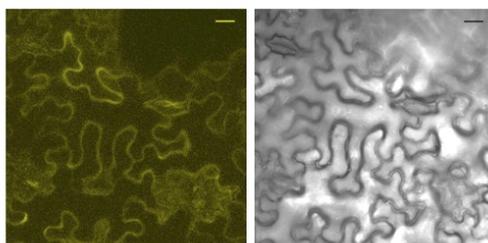
nucleolo y citoplasma de las células epidérmicas, y de la proteína CFP-P25 en núcleo y citoplasma (Figura 26). La co-expresión transitoria en el mismo tejido de las proteínas YFP-P1 y CFP-P25 reveló la co-localización en citoplasma y núcleo (Figura 26).

#### 4.3.4 Interacción entre P1 de WMV y P25 de CYSDV: BiFC

Mediante estudios de complementación bimolecular por fluorescencia, se analizó si estas proteínas pueden interactuar de forma directa en células vivas. Esta aproximación permite la detección de interacciones proteicas directas en un ambiente celular normal. Para ello, se generaron las construcciones pBiFC2-P1WMV, pBiFC3-P1WMV, pBiFC2-P25CYSDV y pBiFC3-P25CYSDV, y se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* combinando los plásmidos pBiFC2 y pBiFC3 de cada construcción.

La interacción física de las proteínas en estudio permite la aproximación de los fragmentos N- y C- terminales de YFP, que se acoplan reconstituyendo la proteína en su conformación nativa, emitiendo fluorescencia. La señal fluorescente se detectó empleando un microscopio confocal Leica SP5, indicando que P1 de WMV y P25 de CYSDV pueden formar heterodímeros *in vivo* (Figura 27).

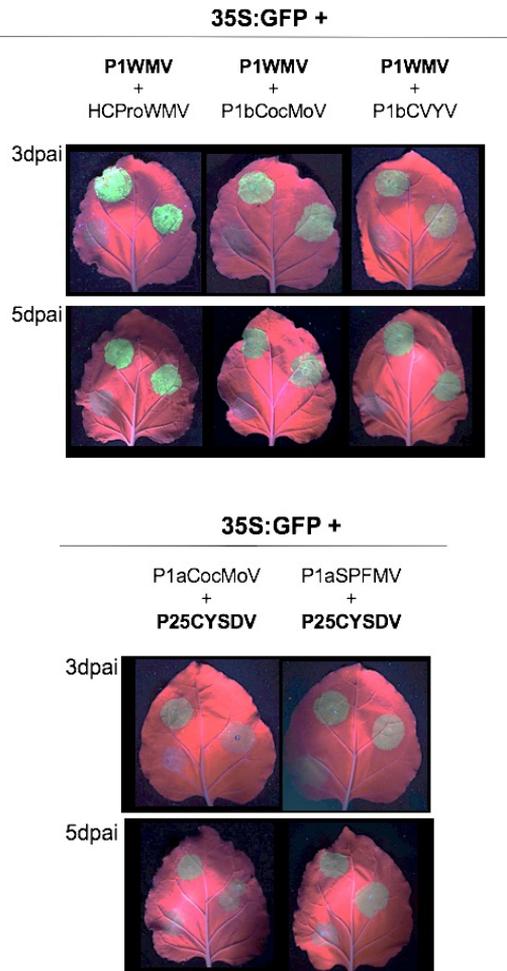
#### BiFC P1 WMV + P25 CYSDV



**Figura 27.** Interacción de las proteínas P1 WMV y P25 CYSDV en experimentos de BiFC. Barra de tamaño 20 µm.

#### 4.3.5 Efecto de P1 de WMV sobre distintos supresores de silenciamiento y de distintas proteínas P1 sobre P25 de CYSDV

Hemos realizado distintos experimentos de expresión transitoria en planta co-agroinfiltrando distintas combinaciones de P1 de WMV con diferentes RSS, así como de P25 de CYSDV junto con distintas proteínas P1 (Figura 28).



**Figura 28.** Imágenes tomadas bajo luz ultravioleta de co-agroinfiltración 35S:GFP + P1 WMV junto con distintos RSS (HCPro de WMV, P1b de CocMoV y P1b de CVYV); y 35S:GFP + P25 de

CYSDV junto con diferentes proteínas P1 (P1a CocMoV y P1a SPFMV) a 3 y 5 dpai. De acuerdo con el título, en la parte inferior izquierda de la hoja se encuentra el no supresor, y en la superior el supresor. En la parte derecha de la hoja se encuentran co-agroinfiltradas ambas construcciones.

De los RSS que hemos evaluado, en ningún caso parece verse afectada la actividad supresora por la presencia de P1 de WMV. En el caso de P25 de CYSDV, tampoco parece observarse que otras proteínas P1 tengan efecto negativo sobre este supresor de silenciamiento.

#### **4.4 Alteración de la frecuencia de deslizamiento de la polimerasa en infecciones mixtas de virus**

Resultados previos obtenidos en nuestro grupo (Mingot et al. 2016) en infecciones mixtas de virus en batata, indicaban que la expresión de productos génicos fuera de fase en potyvirus mediante el recientemente descubierto mecanismo de deslizamiento de la polimerasa (Olsper et al. 2015; Rodamilans et al. 2015) se veía profundamente afectada. Este inesperado efecto era muy notable en el sitio de deslizamiento indentificado en la P1 de SPFMV, mientras que en el sitio en P3 apenas se apreciaban cambios (Mingot et al. 2016), sugiriendo que el papel como supresor de silenciamiento de P1N-PISPO era el que podía verse modulado durante la infección mixta.

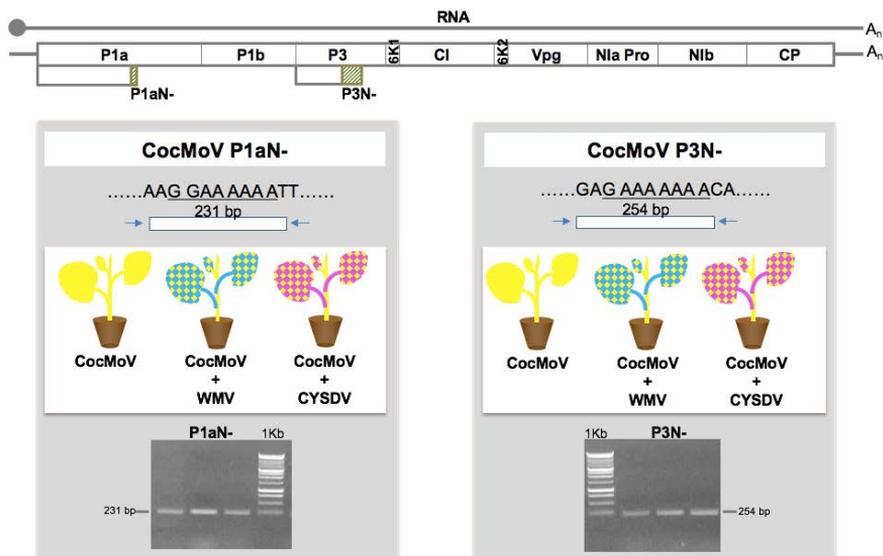
Cuando nos planteábamos analizar si este mismo efecto se daba en otras combinaciones de crinivirus con miembros de la familia *Potyviridae* donde se da el proceso de deslizamiento de la polimerasa para la expresión de productos fuera de fase, un equipo de colaboradores franceses describió un nuevo Ipomovirus, *Coccinia mottle virus* (CocMoV), en muestras de plantas silvestres procedentes de Sudán (Desbiez et al. 2016). En la

secuencia completa publicada de dicho virus es posible identificar un motivo en la región correspondiente al producto P1a, que es compatible con los sitios de deslizamiento de la polimerasa, además del habitual en P3. La existencia de estos dos posibles dominios lo convierten en un modelo muy atractivo para compararlo con los virus de batata, por lo que se decidió abordar su análisis detallado. Este virus es capaz de infectar experimentalmente numerosas cucurbitáceas, causando síntomas de gran severidad, por lo que también se valoró el interés de su estudio ante el riesgo de la futura emergencia de enfermedades causadas por este virus.

### **4.4.1 Análisis de deslizamiento de la polimerasa en los motivos $G_{1-2}A_{6-7}$ de CocMoV**

La secuencia depositada en GeneBank del nuevo virus emergente CocMoV (Desbiez et al. 2016), contiene un motivo  $G_2A_6$  en P1a, susceptible de generar productos fuera de fase. Para estudiar esta posibilidad, se diseñaron oligos que flanqueaban dicho motivo amplificando un fragmento de alrededor de 250 bp. Además, se diseñaron oligos específicos con las mismas características para el motivo  $G_1A_7$  previsiblemente responsable de la producción de P3N-PIPO en P3. Se llevaron a cabo análisis de NGS de amplicones obtenidos a partir de plantas de melón en infección sencilla y mixta. Para ello, se inocularon plantas con CocMov, CocMoV+WMV y CocMoV+CYSDV.

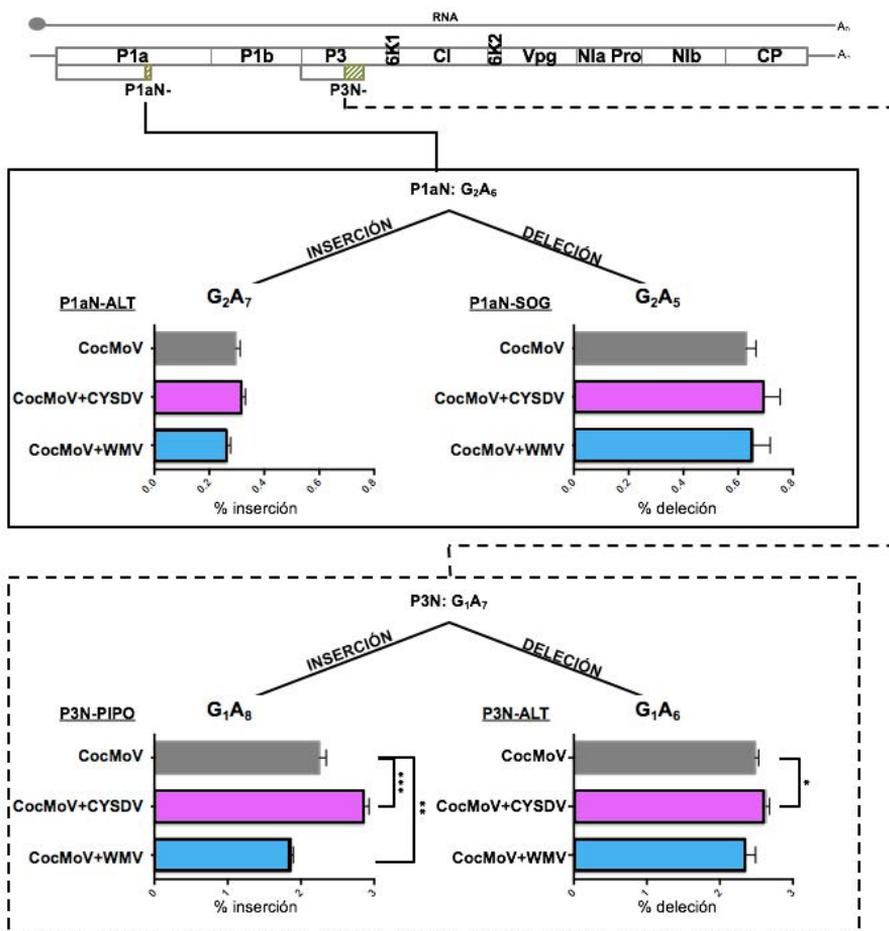
Las plantas positivas para la infección con CocMoV, y en su caso para los virus heterólogos acompañantes, fueron confirmadas por RT-PCR y a partir de estas se amplificaron los fragmentos correspondientes a los motivos  $G_{1-2}A_{6-7}$ . Estos fragmentos fueron purificados y enviados a secuenciar (Figura 29).



**Figura 29.** Obtención de amplicones que incluyen los motivos  $G_2A_6$  de P1a y  $G_1A_7$  de P3 en el genoma de CocMoV, a partir de infecciones sencillas y mixtas. La posición de los motivos se muestra en el mapa del virus en la parte superior. Los paneles de abajo representan el tamaño de cada amplicón y las combinaciones de virus en las plantas ensayadas, además de un gel de agarosa con el análisis de los amplicones correspondientes junto al marcador 1Kb.

Mediante secuenciación masiva a través de la plataforma Illumina-MiSeq, se obtuvieron los datos de las lecturas de cada amplicón generado, los cuales fueron procesados bioinformáticamente con ayuda del Dr. A. Valli (CNB-Madrid). Estos análisis nos permitieron determinar los porcentajes de lecturas individuales con inserciones o deleciones (indels) de nucleótidos en cada posición comparada con la secuencia del genoma de referencia viral. Únicamente las posiciones correspondientes a los dominios  $G_2A_6$  y  $G_1A_7$  en P1a y en P3, respectivamente, mostraron una frecuencia de indels que se apartaba claramente de la esperable al ruido de fondo experimental. Los valores obtenidos se muestran a

continuación. Las comparaciones entre los tratamientos se realizaron mediante la prueba estadística T-test, empleando el programa GraphPad prism 6.0 (Figura 30).



**Figura 30.** Representación de inserciones y deleciones en los motivos G<sub>1-2</sub> A<sub>6-7</sub> presentes en P1a y P3 de CocMoV. Se muestra la comparación entre CocMoV en infección sencilla y mixtas. Cada barra representa la media y desviación estándar (SD) de la frecuencia de inserciones y deleciones a partir de la secuenciación masiva de 3 plantas independientes infectadas con CocMoV, 3 infectadas con CocMoV+WMV y otras 3 infectadas con CocMoV+CYSDV. \*P < 0.05; \*\* P < 0.005; \*\*\*P < 0.001

Como puede observarse, en el caso del motivo en P1a se produce mayoritariamente la deleción de un nucleótido en todas las plantas analizadas, lo cual podría dar lugar a la expresión de un nuevo producto génico parcialmente fuera de fase, el cual hemos nombrado P1aN-SOG (de “Short Out-of-frame Gene-product”). En menor frecuencia, también se podría producir por inserción de un nucleótido un nuevo producto génico de menor tamaño, al cual hemos denominado P1aN-ALT, por analogía con el caso similar de la generación de un producto truncado por terminación cerca del sitio de deslizamiento de la polimerasa descrito para P3 en CIYVV (Hagiwara-Komoda et al. 2016). La predicción de estos productos génicos, podrían dar lugar a las siguientes proteínas (Tabla 13). En la misma tabla se muestra también los productos génicos esperados en el caso del sitio de deslizamiento situado en P3 de CocMoV.

En todos los casos analizados para el sitio en P1a, la frecuencia de deleción es mayor del doble que la de inserción, siguiendo el mismo patrón en todos los tratamientos (infecciones individuales y mixtas), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre infecciones sencillas y mixtas. En el caso del motivo en P3 de CocMoV, en todos los casos se observa la inserción de un nucleótido dando lugar a la expresión de la proteína P3N-PIPO, presentando diferencias estadísticamente significativas entre infecciones sencillas y mixtas tanto con virus homólogos como con virus heterólogos. Además, en todos los casos se podría producir por deleción de un nucleótido el producto génico truncado P3N-ALT, con apenas 2 aminoácidos fuera de fase antes de su terminación prematura. En este último caso solo se observan diferencias estadísticamente significativas entre infecciones sencillas e infecciones mixtas con virus heterólogos.

**Tabla 13: Secuencias de los productos génicos esperados de la expresión de variantes de secuencia de CocMoV**

Producto	T <sup>1</sup>	Secuencia	kDa <sup>2</sup>	pI <sup>2</sup>
<b>P1a</b>	530	MAEVYSFVAKTAYEKRMKRRFGTDKWLQFREQCP LGQVRKCWTHFKISDGACFAYLLVNLTLLEGARAF LKMSAGNKRLVMDRVRKSMCSGLHYNPNMDEFEC ECGFMSEQFSKVCEDCENSYKYTEANLLHNISQL AAILECNISEIPKFSILEIEDEIAFYESTNKTAG PVAVAQVVDGPVSTACGSIPKPGCDEFQVEGKVV GESEIVIKKIADPELSHCVRKDVVEPVQQPKDEE NEVEKKVKSAAKSVQPKEKIQKVRPIHEKPKKI DVALKNELKECLDLAIKIGDFIINPATFEAKLEE KQEKFAVHVKNMTEEEKSEEKVRDFKYNFKKAFW PKEKAVKKGPMERSKMEHFPQRIVDKIESGIVEE IKIKEEVIPGRKMAMSRKKQPVVLKSRVSYVVEK LCNEIGRIMEGKEIEIINKRRMRMKAESGMVVVQ VGHMDGSPNPQDLTIDDYSEDQFNWIMDGFKPKV MFDSDVVPGTSGMVYKNKRNDGRKYTIIRGRLEG SVVDARDVLNESERRRVRNY	60.85	8.53
<b>P1aN-SOG</b>	271	MAEVYSFVAKTAYEKRMKRRFGTDKWLQFREQCP LGQVRKCWTHFKISDGACFAYLLVNLTLLEGARAF LKMSAGNKRLVMDRVRKSMCSGLHYNPNMDEFEC ECGFMSEQFSKVCEDCENSYKYTEANLLHNISQL AAILECNISEIPKFSILEIEDEIAFYESTNKTAG PVAVAQVVDGPVSTACGSIPKPGCDEFQVEGKVV GESEIVIKKIADPELSHCVRKDVVEPVQQPKDEE NEVEKKVKSAAKSVQPKEK <b>FKRFGGQFMRSQRK*</b>	30.70	7.45
<b>P1aN-ALT</b>	266	MAEVYSFVAKTAYEKRMKRRFGTDKWLQFREQCP LGQVRKCWTHFKISDGACFAYLLVNLTLLEGARAF LKMSAGNKRLVMDRVRKSMCSGLHYNPNMDEFEC ECGFMSEQFSKVCEDCENSYKYTEANLLHNISQL AAILECNISEIPKFSILEIEDEIAFYESTNKTAG PVAVAQVVDGPVSTACGSIPKPGCDEFQVEGKVV GESEIVIKKIADPELSHCVRKDVVEPVQQPKDEE NEVEKKVKSAAKSVQPKEK <b>NSKGLEANS*</b>	29.85	5.76
<b>P3</b>	285	SFDLSWAKSKEKFI EHFAEDERRIIKTCCTP SALWLYARKAKVYGYVDYLILKESSIVDLCV KLEYVQGHLSLFENVEDACIEFAHFMDGNIS SRNLEDEPELSRVRLMIKSFFDSVREQNKYE IIDRIIEKKTRLEADEIIMRELIRHQYAELF SWRERILNRWSSKRNTLSSLWEKQENANSNS	34.54	7.52

		CSIISSLLSKPGLHMSNWAYTVCKVQAKHG ISMCDNVIKFLVLSRIVELGKSAFFRWESCF YNVFCILATAFVVTYFLSKFVNFVKKLVMSE KETLELEKGLVEVQ		
<b>P3N-PIPO</b>	214	SFDLSWAKSKEKFIGEHFAEDERRIIKTCCTP SALWLYARKAKVYGYVDYLILKESSIVDLCV KLEYVGQHLSLFENVEDACIEFAHFMDGNIS SRNLEDEPELSRVRLMIKSFFDSVREQNKYE IIDRIIEKK <b>NTIRSRNYARAHSSPIRRIV</b> <b>FMARAYIKSLVFEAEHSIKFMGKARKRQFKF</b> <b>VFDHFIAAIKTGPRTHEQLGLHSV*</b>	24.80	9.28
<b>P3N-ALT</b>	143	SFDLSWAKSKEKFIGEHFAEDERRIIKTCCTP SALWLYARKAKVYGYVDYLILKESSIVDLCV KLEYVGQHLSLFENVEDACIEFAHFMDGNIS SRNLEDEPELSRVRLMIKSFFDSVREQNKYE IIDRIIEKK <b>HD*</b>	15.98	5.42

Secuencia aminoacídica de las proteínas P1a y P3 de CocMoV y predicción de los productos génicos derivados del deslizamiento de la polimerasa en los motivos  $G_{1-2}A_{6-7}$  presentes en dichas proteínas. En negrita se muestran los aminoácidos en fases de lectura distintas a las de la poliproteína viral. <sup>1</sup>Tamaño del producto génico en aminoácidos. <sup>2</sup>Cálculo de masa molecular y punto isoeléctrico mediante [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)

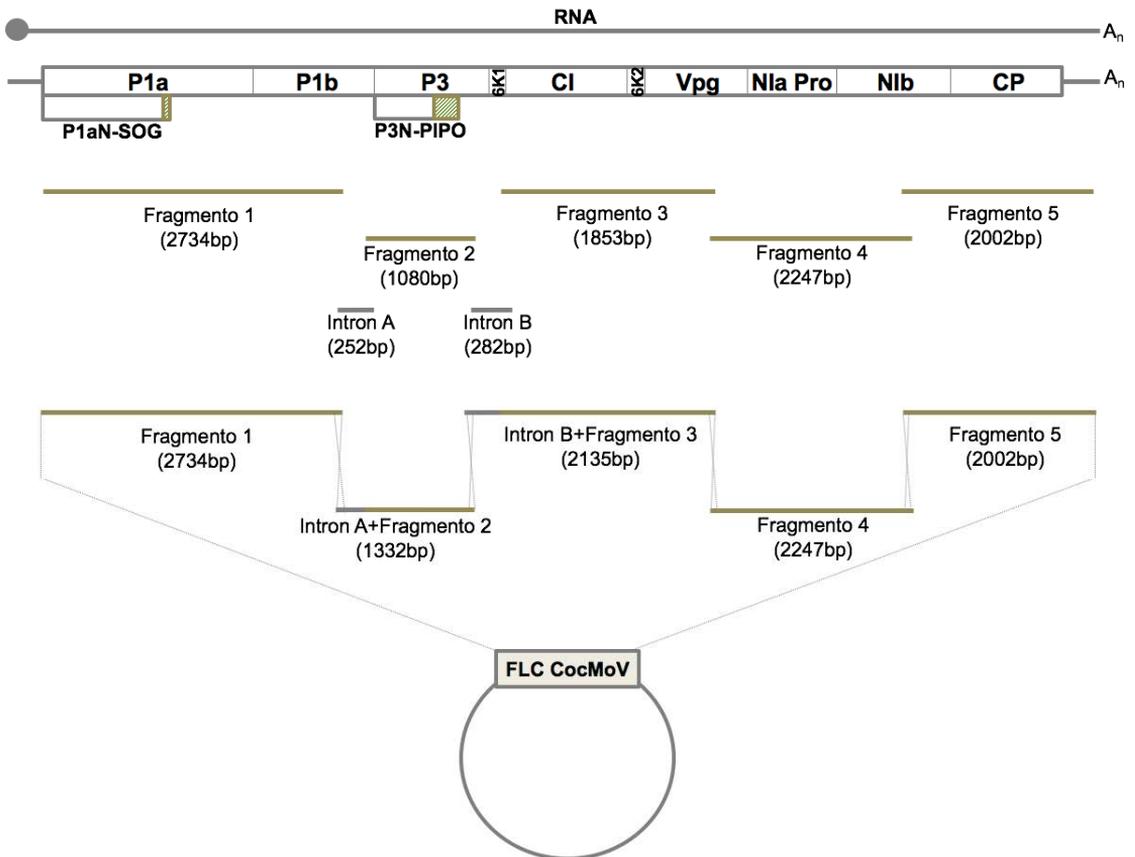
## 4.5 Obtención de clones virales

### 4.5.1 Obtención de un clon infectivo de CocMoV

Para proceder a la construcción de un clon completo del genoma de CocMoV, se decidió seguir una estrategia de recombinación de fragmentos solapantes en levadura, similar a la previamente descrita (Desbiez et al. 2012). Se diseñó y llevo a cabo dicha estrategia a partir del RNA viral extraído de plantas infectadas por el virus, amplificándolo

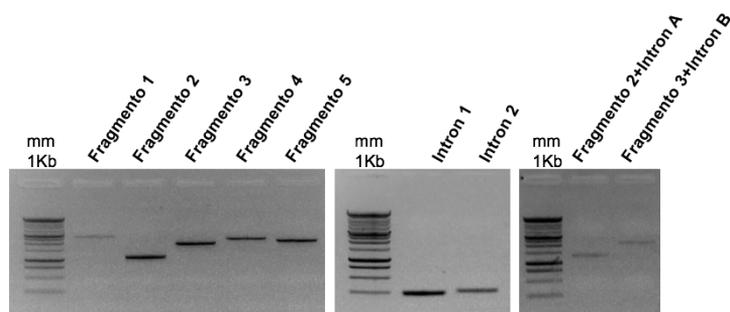
## Resultados

todo el genoma por RT-PCR en cinco fragmentos de tamaños entre 1-3 kb, más dos intrones que se posicionarían artificialmente en la secuencia viral para estabilizar la construcción en bacteria (Figura 31).



**Figura 31.** Esquema de la obtención del clon infectivo de CocMoV mediante recombinación en levadura. Debajo del mapa genómico se muestran los cinco fragmentos solapantes con indicación de sus tamaños así como las posiciones relativas de los dos intrones A y B, que se fusionaron mediante PCR con los fragmentos adyacentes 2 y 3. El proceso de recombinación en levadura con el plásmido linealizado PRSV-delta-eco se muestra en la parte inferior de la figura.

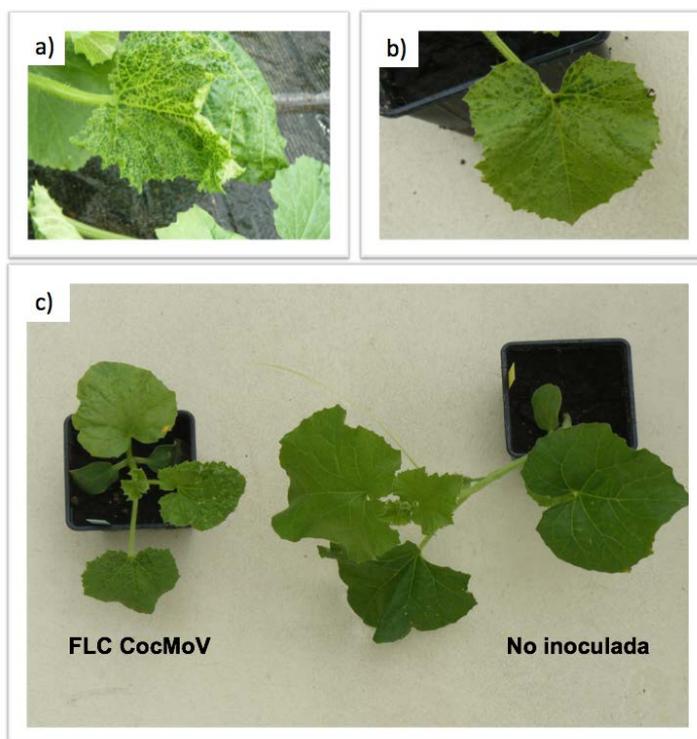
Se diseñaron oligos específicos con al menos 20 pares de bases en superposición (solapantes) con los fragmentos contiguos. Los cebadores correspondientes a los extremos del genoma 5' y 3' contienen una cola de 20-30 bp correspondientes a las extremidades del vector PRSV-delta-eco, descrito en la publicación mencionada y cedido amablemente por la Dra. C. Desbiez (PACA- INRA Avignon). Los intrones se amplificaron y fusionaron con procedimientos similares a los descritos (Desbiez et al. 2012). Los productos obtenidos (Figura 32) fueron recombinados en *S. cerevisiae* con el plásmido PRSV-delta-eco linearizado.



**Figura 32.** Visualización en gel de agarosa de los distintos fragmentos empleados en la obtención del clon infectivo de CocMoV mediante recombinación en levadura. Izquierda: los cinco fragmentos en los cuales se ha dividido el genoma del virus. Centro: intrones A y B amplificados. Derecha: fragmentos obtenidos por PCR de la fusión de los fragmentos 2 y 3 con los intrones A y B respectivamente. Más detalles de la estrategia en la figura 31.

Una vez obtenido el clon infectivo, se ensayó en plantas de melón y calabacín mediante inoculación biolística con un equipo tipo "gene gun" disponible en el laboratorio PACA-INRA Avignon; al tratarse de un patógeno no presente en Europa, todas las manipulaciones se realizaron

en instalaciones de seguridad adecuada, con el nivel de confinamiento necesario. Todas las plantas inoculadas desarrollaron síntomas (Figura 33) y una vez analizadas se confirmó que estaban infectadas por el virus.

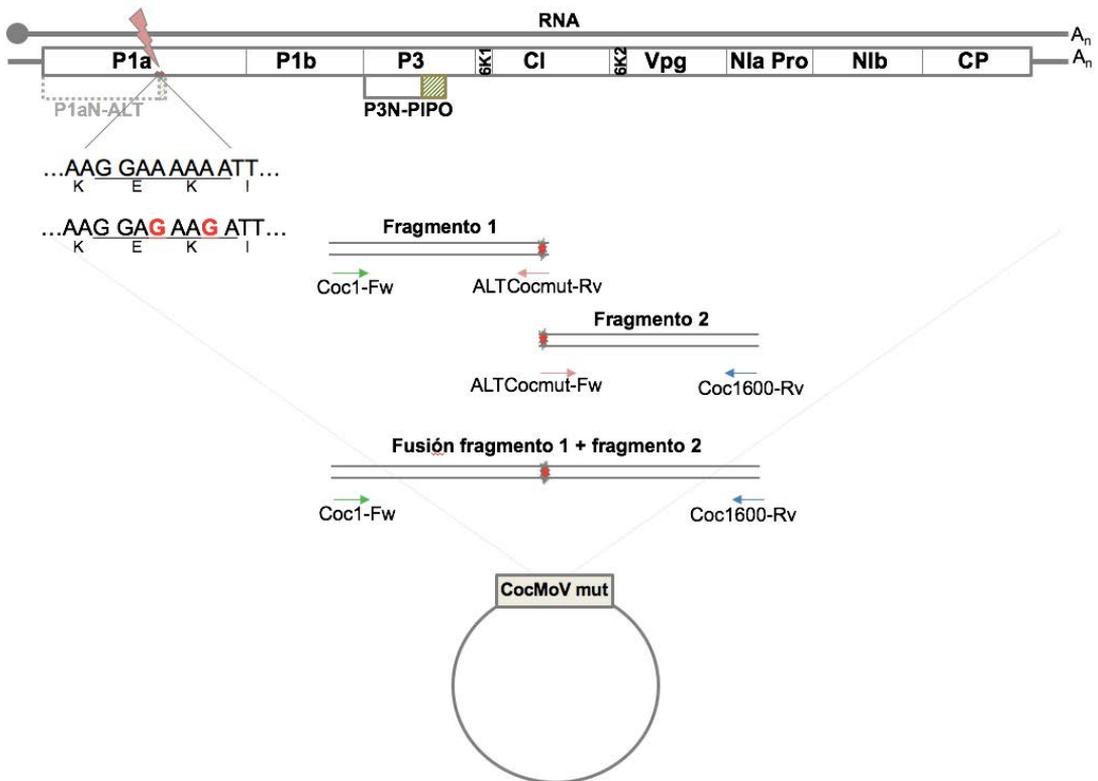


**Figura 33.** Síntomas de CocMoV en plantas inoculadas a partir del clon infectivo generado. a) detalle de síntomas en hoja de planta de calabacín b) detalle de síntomas en hoja planta de melón c) comparación de una planta de melón infectada a la izquierda con una planta de melón no inoculada.

### **4.5.2 Obtención de un mutante de CocMoV modificado para impedir la producción de P1aN-SOG y P1aN-ALT**

Para estudiar si la nueva proteína solapante P1aN-SOG tiene algún papel en la infección, se generó un mutante silencioso del clon infectivo, en el

cual se modificaron dos nucleótidos del motivo  $G_2A_6$  (GGAAAAA x GGAGAAGA) sin alterar la secuencia de aminoácidos (Figura 34).



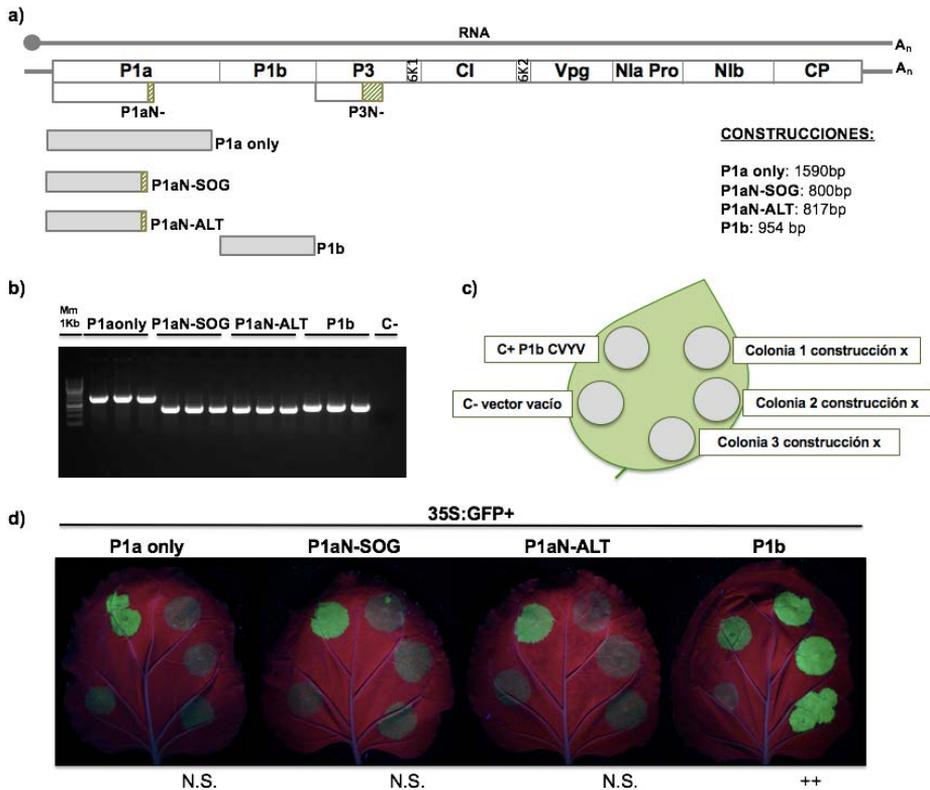
**Figura 34.** Esquema de la obtención de un mutante silencioso del clon completo de CocMoV que impediría la producción de P1aN-SOG. En el detalle de la secuencia se muestran en rojo las mutaciones silenciosas introducidas. Debajo se muestra la estrategia de fragmentos para PCR recombinante.

Una vez obtenido el clon mutante y confirmada la secuencia, se ensayó su infectividad en plantas de melón y calabacín, nuevamente mediante inoculación biolística. En este caso, solamente el 25% de las plantas inoculadas resultaron infectadas. Los síntomas en las plantas infectadas con el mutante resultaban indistinguibles de los producidos por el clon

infectivo (no mostrado). La secuencia de la progenie viral del mutante mostró que las mutaciones introducidas se mantenían de forma estable, al menos hasta el momento de muestreo (24 dpi).

### **4.6 Identificación del supresor de silenciamiento de CocMoV**

Se han obtenido clones capaces de expresar los siguientes productos génicos teóricos derivados de CocMoV: P1a (construcción derivada del mutante modificado para evitar el posible deslizamiento de la polimerasa, y denominada también "P1a only"), P1aN-SOG (con delección de 1 nucleótido en el dominio  $G_2A_6$  que pasa a  $G_2A_5$ ), P1aN-ALT (con inserción de 1 nucleótido en el dominio  $G_2A_6$  que pasa a  $G_2A_7$ ) y P1b. Los clones se generaron mediante la tecnología GATEWAY de clonación, y se ha ensayado su actividad supresora mediante expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* en plantas de *N. benthamiana* (Figura 35).



**Figura 35.** Identificación del supresor de silenciamiento génico de CocMoV. a) Esquema de las construcciones generadas para ensayar la actividad supresora de silenciamiento y tamaños esperados para cada caso. b) Análisis electroforético de amplicones obtenidos por PCR. c) Esquema de agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana*. Se usaron tres clones individuales de cada construcción. d) Imágenes tomadas a 3 dpai bajo luz ultravioleta de la co-agroinfiltración de las construcciones obtenidas junto a 35S:GFP. (N.S. no supresor, ++: supresor fuerte)

Como puede observarse en la figura 35, la proteína P1b de CocMoV tiene una fuerte actividad supresora de silenciamiento génico, mientras que ninguno de los productos posibles derivados de P1a mostraron actividad en el ensayo.



**DISCUSIÓN**



## 5. Discusión

Las adecuadas condiciones climáticas del sureste español lo hacen un lugar muy apto para una agricultura dedicada a la producción intensiva y de calidad de diferentes especies hortícolas, pero al mismo tiempo favorecen la propagación de diversas enfermedades, entre las cuales hay que destacar aquellas causadas por los virus. La investigación sobre virosis de hortícolas en nuestro país en efecto constituye un esfuerzo colectivo muy notable, con numerosos grupos de trabajo centrados en buscar estrategias de control que sean adecuadas para mantener la productividad de los cultivos en condiciones de producción intensiva. A pesar de estos esfuerzos, hay facetas del problema global que plantean las virosis que no han sido suficientemente abordadas, y en nuestro grupo hemos empezado a tratar de manera especial las infecciones mixtas en las que participan varios virus, y las peculiaridades que pueden presentar frente a las infecciones individuales, mucho más estudiadas. Partimos del hecho de que es muy común encontrar infecciones mixtas de virus en plantas cultivadas en la cuenca mediterránea, como demuestran los estudios de campo. En cuanto a virus que afectan a cucurbitáceas, objeto principal de esta tesis, podemos destacar entre otros la presencia frecuente del crinivirus CYSDV y del ipomovirus CVYV transmitidos por *B. tabaci*, y del polerovirus CABYV y del potyvirus WMV transmitidos por pulgones (Lecoq y Desbiez 2012). Todos ellos han sido encontrados en campo en infecciones mixtas (Bourdín y Lecoq 1994; Gil-Salas et al., 2011; Gil-Salas et al., 2012; Salvaudon et al., 2013).

Un ejemplo de la importancia de infecciones mixtas de virus de plantas es el caso de la “*enfermedad viral de la batata*” (sweet potato virus disease, SPVD) causada por la coinfección de un potyvirus como SPFMV y del crinivirus SPCSV. Aunque en España no es una especie muy extendida, la batata (*Ipomoea batatas*) sí es uno de los cultivos más importantes a

nivel mundial por su relevancia para la alimentación humana. Las batatas son propagadas vegetativamente a partir de brotes, raíces o tubérculos, por lo tanto las enfermedades virales pueden ser una limitación importante, ya que se mantienen y acumulan de generación a generación. En ocasiones, los efectos de virus individuales sobre los rendimientos del cultivo son escasos, sin embargo, en infecciones mixtas del tipo de SPVD pueden llegar a ocasionar pérdidas de más del 50% (Loebenstein 2015) con síntomas que incluyen clorosis, hojas de pequeño tamaño y deformadas, y reducción muy importante en el tamaño de la planta, lo cual está directamente relacionado con la disminución del tamaño de los tubérculos. Otras combinaciones de crinivirus con ipomovirus como SPMMV, también se han relacionado con enfermedades graves en batata.

En trabajos previos en otras especies, se han caracterizado infecciones mixtas entre potyvirus y no potyvirus como crinivirus, encontrando distintos comportamientos dependiendo del patosistema en estudio. Por ejemplo, en la infección mixta entre el crinivirus LIYV y el potyvirus TuMV en plantas de *N. benthamiana*, se ha observado una relación sinérgica dando como resultado una mayor acumulación del crinivirus (Wang et al. 2009). Este tipo de respuesta es la más habitual en las combinaciones en las que interviene un miembro de la familia *Potyviridae*. En cambio, en los estudios realizados en infecciones mixtas entre el SPCSV y el potyvirus SPFMV se ha observado un sinergismo donde el potyvirus es el beneficiario, es decir se ve favorecida su acumulación, mientras que los títulos virales de SPCSV no se ven afectados, llegando incluso a verse levemente disminuidos en algunos casos (Karyeija et al. 2000).

Por analogía con los precedentes que plantean estas combinaciones de crinivirus con virus de la familia *Potyviridae*, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de infecciones mixtas de CYSDV y WMV en plantas de melón, debido a la importancia económica de este cultivo en la

cuenca mediterránea, y a la prevalencia de estos dos virus en dicha zona. Posteriormente nos decidimos a incluir también la combinación con un ipomovirus susceptible de afectar a las mismas especies como es CocMoV, por las peculiaridades de su genoma que nos permitieron analizar el fenómeno de deslizamiento de la polimerasa en dos posiciones de dos productos génicos virales, y en el contexto de infecciones mixtas.

En nuestro caso, comenzando por los resultados obtenidos en cuanto a medición de niveles de carga viral en las infecciones mixtas de CYSDV y WMV, hemos encontrado un claro sinergismo que favorece la acumulación de CYSDV en presencia de WMV. Tanto es así, que en infecciones sencillas hemos observado que a partir del punto temporal de 36 dpi, la carga viral de CYSDV disminuye tanto que incluso se dificulta la detección del virus por métodos muy sensibles como RT-PCR, mientras que en presencia de WMV, la carga viral de CYSDV se mantiene a niveles mucho más altos, favoreciendo así su detección. Por el contrario, en el caso de WMV los niveles de carga viral en las plantas con infección mixta se mantuvieron siempre ligeramente por debajo del nivel en las plantas con infección sencilla. Por tanto, estas mediciones confirman una relación sinérgica entre CYSDV y WMV en plantas de melón, en la que el crinivirus se ve claramente favorecido en su acumulación por la presencia del potyvirus, mientras que el potyvirus muestra un moderado efecto antagónico, con disminución de sus niveles de acumulación en el caso de infecciones mixtas. La apariencia visual de las plantas a tiempos tardíos (60 días) sugiere que esta atenuación de la presencia del virus más agresivo (WMV) en las plantas doblemente infectadas podría resultar en una recuperación parcial respecto al daño causado por el potyvirus individualmente; no obstante, esta observación necesitaría ser cuantificada, y un intento preliminar de medición del peso seco de la parte aérea de lotes de algunas plantas con infecciones sencillas y mixtas no

resultó concluyente, por lo que se deberán repetir los análisis con un mayor número de plantas. Tampoco podemos descartar que el efecto observado en nuestras cámaras de cultivo no se produzca de la misma manera en otras condiciones menos controladas.

Nuestros resultados de las medidas de carga viral coinciden con los obtenidos en muchos otros trabajos en los cuales se ha descrito el efecto sinérgico causado por un potyvirus sobre otros virus, como es el caso concreto en cucurbitáceas de los potyvirus WMV y ZYMV sobre CMV, donde la carga viral de este último aumenta considerablemente (Wang et al. 2002). También nuestros resultados van en la misma dirección de los obtenidos por Gil-Salas (2011), en los cuales la carga viral de CYSDV aumenta considerablemente en presencia del ipomovirus CVYV, manteniéndose CYSDV detectable a lo largo de períodos de tiempo muy prolongados.

Teóricamente esta mayor acumulación de CYSDV en infecciones mixtas podría suponer un riesgo de una mayor tasa de transmisión del virus a tiempos largos de infección. Considerando que el riesgo sería mayor en los momentos en que se alcanzan los valores máximos de CYSDV, se realizaron experimentos de transmisión con vectores a 24 dpi. Sin embargo, nuestras mediciones no confirman esta hipótesis, al menos en experimentos realizados a 24 dpi, ya que la frecuencia de transmisión no solo no aumenta, si no que incluso disminuyó ligeramente (Tabla 7), aunque no podemos descartar totalmente que a otros tiempos o en otras condiciones el resultado sea diferente, por lo que sería interesante realizar nuevos experimentos en este sentido.

En el caso de WMV, como hemos dicho previamente, la carga viral se ve ligeramente afectada, siendo menor en presencia de CYSDV. Sin embargo, también hemos observado que los porcentajes de transmisión empleando pulgones como vectores naturales, son algo mayores en este

caso. Esto supone de nuevo una paradoja, ya que WMV parece que se transmite mejor desde plantas en infección mixta, aún cuando la carga viral en estas es menor. Para intentar dar una respuesta a esta observación, en el presente trabajo se ha llevado a cabo un análisis del comportamiento alimenticio de pulgones mediante la técnica EPG, ya que esta ha sido empleada en diversos estudios aplicados en el avance del conocimiento de los procesos de transmisión viral (Collar et al. 1997; Collar y Fereres 1998; Martín et al. 1997; Moreno et al. 2005; Palacios et al. 2002; Powell 1991; Powell et al. 1995; Prado y Tjallingii 1994). Puesto que la transmisión y dispersión de los virus de plantas dependen de la relación virus-vector, la cual podría ser modulada o modificada por el virus con el fin de obtener una ventaja adaptativa (Blua y Perring, 1992; Fereres et al. 2016), los análisis del comportamiento de vectores se consideran muy informativos para conocer la ecología de los virus transmitidos por ellos. Los pulgones son el vector más común de virus de plantas y su comportamiento alimenticio se sabe que es un importante determinante de la transmisión del virus; no obstante, el efecto que la presencia de los virus en las plantas podría tener sobre el comportamiento alimenticio de los pulgones no ha sido tan estudiado, y en particular no hemos encontrado ningún ejemplo publicado en que el caso de infecciones virales mixtas haya sido abordado en profundidad, por lo que en este trabajo se ha decidido evaluar por primera vez el comportamiento alimenticio de pulgones, utilizando gráficos de penetración eléctrica, en nuestras infecciones mixtas. El objetivo de este apartado ha sido evaluar el posible efecto de las infecciones mixtas sobre el comportamiento alimenticio de los pulgones, y en concreto comparar dicho comportamiento entre plantas infectadas con WMV y con WMV+CYSDV.

Aunque la monitorización del comportamiento de insectos empleando gráficos de penetración eléctrica ha sido mucho más aplicada en

pulgones que en otro tipo de vectores, ha sido empleada también en la evaluación del comportamiento alimenticio de otros insectos vectores de virus, como es el caso de *Frankliniella occidentalis* (trips), transmisor de *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) o *Bemisia tabaci*. En el primer caso, se observó una alteración del comportamiento de alimentación de los trips machos infectados con TSWV, los cuales se alimentaron hasta tres veces más que los machos no infectados, aumentando así la probabilidad de inoculación del virus (Stafford et al. 2011). En el caso de *B. tabaci* virulíferas, infectadas con TYLCV, se ha observado que se alimentan con mayor frecuencia de floema (Moreno-Delafuente et al. 2013), lo cual estaría relacionado con una mayor frecuencia de inoculación del virus. Ambos ejemplos sugieren que los virus pueden estar manipulando a sus vectores para favorecer su diseminación, aunque estos antecedentes se refieren a virus circulativos. Por ello, sería interesante realizar futuros experimentos de EPGs empleando *B. tabaci* para estudiar su comportamiento alimenticio en plantas infectadas con los virus empleados en este trabajo, para ver si alguno de ellos tiene una influencia directa sobre el vector.

Por otra parte, los EPGs también han sido utilizados para la evaluación de otros posibles efectos, como es el caso de la influencia de la presencia de enemigos naturales sobre la transmisión de virus. Se estudió así la dinámica espacio-temporal del CMV y CABYV, transmitidos por el pulgón *Aphis gossypii* de forma no persistente y persistente respectivamente, a corto y largo plazo en presencia y ausencia del parasitoide *Aphidius colemani*, y se observó que la presencia del mismo puede afectar directamente el comportamiento de los pulgones, influyendo así sobre la propagación de los virus de plantas (Dáder et al. 2012). También se han utilizado para profundizar en el conocimiento de las diferencias de inoculación entre virus no persistentes (TuMV) y virus semi-persistentes (CaMV), transmitidos por pulgones, comparando las duraciones de las

distintas subfases de las caídas de potencial pd (II-1, II-2 y II-3). (Moreno et al. 2012); así como para el estudio de la influencia de estrés hídrico en el comportamiento de insectos vectores, ya que la sequía es una gran amenaza para la producción de cultivos en todo el mundo y se puede ver muy acentuada por el calentamiento global y el cambio climático en determinadas regiones, entre las que España puede verse muy afectada. Las respuestas de las plantas a este estrés abiótico implican cambios fisiológicos que se superponen, al menos parcialmente, a las vías de defensa provocadas tanto por virus como por sus vectores herbívoros. Recientemente se ha evaluado el efecto directo de un déficit de agua severo en la eficacia de la transmisión de CaMV y TuMV sobre el comportamiento de los vectores. En ambos casos, se ha observado que la tasa de transmisión de vectores aumenta significativamente a partir de plantas fuente de inóculo privadas de agua (Munster et al. 2017). Otra aplicación de la técnica EPG, ha sido la evaluación del comportamiento alimenticio de pulgones frente a insecticidas (Garzo et al. 2016). Todos estos trabajos destacan el gran potencial de la metodología EPG para aumentar nuestro conocimiento de los factores que pueden condicionar la diseminación de enfermedades virales. Sin embargo, como ya hemos mencionado, el nuestro es el primer trabajo que conocemos donde se ha empleado la técnica EPG para estudiar el comportamiento de insectos vectores en plantas en infección mixta de virus.

Una hipótesis ampliamente aceptada, postula que la adquisición del virus ocurre durante la ingestión del contenido de células vegetales, lo cual se correlaciona con la subfase (II-3) de las punciones intracelulares del estilete (PDs) (Martin et al. 1997; Powell et al. 1995). Por lo tanto, la monitorización del proceso de alimentación puede revelar el mecanismo de comportamiento de la adquisición del virus de la planta por parte de los insectos vectores.

En los experimentos de EPG llevados a cabo, hemos observado que el tiempo de duración de las Pds es mayor en plantas en infección mixta, en concreto la duración de la subfase II-3, directamente relacionada con la adquisición de virus no-persistentes (Powell et al. 1995). Los resultados obtenidos sugieren que la mayor transmisión de WMV a partir de plantas en infección mixta podría ser debida al comportamiento alimenticio de los pulgones. Estas modificaciones del comportamiento observadas, podrían ser mediadas por alteraciones en los mecanismos de defensa y condiciones nutricionales de la planta producidas por la presencia de ambos virus, ya que los virus de plantas son conocidos por inducir cambios específicos en la morfología y fisiología de las plantas (Bosque-Pérez y Eigenbrode 2011; Mauck et al. 2012; Fereres et al. 2016). En nuestro caso, no hemos encontrado por ahora evidencia de que el aumento de transmisión se pueda deber a cambios en la emisión de volátiles, ya que no hemos observado diferencias claras en los ensayos preliminares de preferencia llevados a cabo en este trabajo, aunque no se pueden derivar conclusiones definitivas dadas las limitaciones experimentales y el escaso número de repeticiones independientes. En cambio, los análisis de los registros EPG sí revelaron un comportamiento alimenticio claramente distinto en el vector *M. persicae*, en las comparaciones entre plantas infectadas únicamente con WMV y plantas infectadas con WMV+CYSDV, lo cual podría dar una primera respuesta a nuestras observaciones de mayor frecuencia de transmisión de WMV a partir de plantas infectadas con ambos virus, a pesar de ser la carga viral de WMV más baja en este caso. Esto sugeriría una inesperada manipulación del comportamiento del vector de WMV por parte del virus heterólogo CYSDV, el cual se vería favorecido de forma indirecta y en términos ecológicos, por ejemplo, en cuanto a su mayor acumulación en las plantas doblemente infectadas, que serían más abundantes en una población de plantas al verse favorecida su adquisición por su vector

específico. Por lo tanto, poniendo en conjunto todos nuestros resultados, podríamos decir que las infecciones mixtas de WMV+CYSDV suponen efectos de sinergismo para ambos virus: en el caso de CYSDV, como se ha comentado anteriormente, la carga viral aumenta considerablemente, lo que supone una prevalencia mayor del virus en las plantas infectadas; mientras que en el caso de WMV la carga viral disminuye ligeramente, pero aumenta la transmisibilidad del virus mediante los insectos vectores, y de esta forma su dispersión poblacional. Así pues, el efecto directo de la adquisición del virus en el comportamiento alimenticio del vector puede influir sobre la propagación del virus, lo cual podría verse como parte de una estrategia general adoptada por los patógenos para la manipulación de sus vectores, lo cual encajaría con la conocida como "hipótesis de manipulación de vectores" (Ingwell et al. 2012). Aunque nuestros resultados no abordan los mecanismos celulares y moleculares específicos que pueden mediar los efectos directos del virus en la planta, y a través de ellos sobre su vector natural, sí ofrecen una primera evidencia cuantificable del efecto, proporcionando una base sobre la cual continuar nuevos estudios de manipulación mediada por patógenos de sus vectores, y la identificación de los mecanismos responsables en los diferentes niveles posibles, desde el molecular y celular al ecológico, pasando por los de organismo y población.

En cuanto a interacción planta-patógeno en el caso de virus de RNA, las plantas poseen un mecanismo de defensa de silenciamiento del RNA viral, conocido como silenciamiento génico, mediante el cual estas son capaces de reconocer el RNA viral durante la replicación del virus, degradándolo. Se sabe que la mayoría de los virus de plantas presentan una o más proteínas que actúan como supresores de silenciamiento, interfiriendo directa o indirectamente con diferentes fases del mecanismo de silenciamiento de RNA de la planta, y contrarrestando así la defensa

del huésped. La proteína HCPro, común en los miembros del género potyvirus, es reconocida como un RSS altamente efectivo (Anandalakshmi et al. 1998; Kasschau y Carrington 1998; Lakatos et al. 2006; Valli et al. 2017), aunque existen excepciones, como es el caso del potyvirus SPFMV, donde la actividad supresora de silenciamiento recae sobre la proteína P1N-PISPO (Mingot et al. 2016). Esto podría estar estrechamente relacionado con el efecto que tienen los potyvirus sobre otros virus en infecciones mixtas, generando un aumento de la acumulación del virus heterólogo que dependa de la actividad del supresor de silenciamiento HCPro. Esta hipótesis encaja bien con los casos ya mencionados de virus de batata en que el potyvirus no genera sinergismo en la misma dirección, no observándose por tanto este efecto en infecciones mixtas entre SPFMV y SPCSV puesto que el HCPro de SPFMV carece de actividad supresora. Nuestros datos muestran como los títulos virales de CYSDV aumentan en presencia de WMV (según la evaluación de los niveles del RNA1), lo cual reforzaría la hipótesis del papel clave que tiene HCPro en las infecciones mixtas. En cuanto a la transmisión de CYSDV, tanto los estudios de transmisión primaria como los estudios de transmisión secundaria llevados a cabo en este trabajo, sugieren que los porcentajes de transmisión no se ven afectados cuando las fuentes de inóculo son plantas en infección sencilla o mixta. Sí se ha observado una ligera tendencia mantenida en cuanto a la infección de plantas receptoras, siendo mayor el número de plantas previamente infectadas con WMV que se sobreinfectan con CYSDV, comparado con los niveles de transmisión a plantas no infectadas previamente.

En este trabajo, hemos querido ver si existe una posible relación entre los cambios asociados a las infecciones mixtas y las interacciones entre productos génicos virales. Para ello hemos estudiado la posible interacción directa y los efectos moduladores de funciones conocidas entre distintas proteínas de WMV y CYSDV. Para llevar a cabo este

objetivo, en primer lugar, hemos corroborado la actividad supresora de la proteína P25 de CYSDV, la cual ya estaba caracterizada como supresora de silenciamiento (Kataya et al. 2009), en el aislado español utilizado en este trabajo. También hemos identificado HCPro como supresor de silenciamiento de WMV, lo que coincide con muchos otros potyvirus, donde HCPro juega habitualmente este mismo papel (Valli et al. 2017). Además, se han generado construcciones con productos génicos sin actividad supresora de cada uno de los virus (P22 en el caso de CYSDV, y P1 en el caso de WMV) y se han llevado a cabo ensayos combinando proteínas con y sin actividad supresora, para evaluar la posible interferencia e influencia de distintos productos génicos heterólogos que podrían encontrarse en infecciones mixtas. Nuestros resultados sugieren que la proteína P1 de WMV tiene un efecto negativo sobre la actividad supresora de la proteína P25 de CYSDV. Este es un resultado inesperado, que no se había ensayado y por tanto no estaba descrito con anterioridad en otras combinaciones de crinivirus y potyvirus. Para profundizar en esta observación, se ha estudiado la localización subcelular de cada una de las proteínas implicadas. Hemos visto que P1 de WMV se localiza mayoritariamente en núcleo y nucleolo, y en menor cantidad en citoplasma, lo cual coincide con los resultados obtenidos en estudios previos con otros potyvirus (Martinez y Darós 2014) donde P1 de TEV al principio de la infección se localiza en citoplasma, núcleo y nucleolo, y conforme la infección avanza, parece ir desapareciendo del nucleolo. Por otra parte, hemos visto que la proteína P25 de CYSDV se localiza mayoritariamente en núcleo y en citoplasma. Esta localización coincide con diversos estudios previos que indican la acumulación frecuente de supresores de silenciamiento en estas regiones celulares, como por ejemplo en el caso de la proteína NS3 de *Rice stripe virus* (RSV) que se acumula en el núcleo (Xiong, R. et al. 2009), y en el caso

de la proteína 2b de CMV que se acumula en núcleo y citoplasma (Lucy 2000).

En nuestro estudio, hemos observado la existencia de una interacción física detectable entre la proteína P1 de WMV y el supresor de silenciamiento P25 de CYSDV en citoplasma, mediante complementación bimolecular fluorescente (BiFC). En estudios previos de interacción de P1 de otros potyvirus, se había observado la interacción entre P1 de PVA y otras proteínas virales como P3, así como de P1 con CI, VPg, NIa y NIb. Además, P1 también interactúa consigo mismo y con HCPPro (Merits et al. 1999). También se ha comunicado la interacción de la proteína P1 de SMV con factores del huésped, como las proteínas Rieske Fe/S (Shi et al. 2007), y la interacción de la proteína P1 de TEV con las subunidades del ribosoma 60S y algunas otras proteínas del huésped como la proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Martínez y Daròs 2014). No obstante, no hay mucha más información sobre la interacción de P1 de otros potyvirus con más productos génicos del huésped, ni con otros productos derivados de otros patógenos. En este trabajo, se ha demostrado el inesperado efecto negativo que P1 tiene sobre P25 de un virus heterólogo, afectando a su funcionalidad y disminuyendo cuantificablemente su actividad supresora, en un efecto directo y que hemos visto es dependiente de dosis.

Recientemente, se ha relacionado la actividad de P1 con la modulación de la infección viral (Pasin et al. 2014). Experimentos llevados a cabo con PPV muestran como la eliminación de P1 del genoma viral supone el incremento de los síntomas causados por el virus, así como la disminución de la carga viral. Además, la eficacia de infección del mutante viral PPV  $\Delta$ P1 (con la región P1 deletada), y los efectos de la mutagénesis de motivos conservados de P1 (Pasin et al. 2014), sugieren que la proteína P1, o su secuencia codificante de RNA, tengan otros roles adicionales aún no revelados en la replicación de potyvirus. A pesar de

estos avances, la proteína P1 en muchos sentidos sigue siendo una proteína viral poco caracterizada y que presenta una gran variabilidad, y las hipótesis iniciales de que su actividad pudiera estar relacionada con la especificidad de huésped, aún no se ha demostrado. En un escenario fuertemente especulativo, se podría tal vez relacionar la disminución de la carga viral de WMV en infecciones mixtas con la interacción observada entre la proteína P1 de WMV y P25 de CYSDV, que podría así resultar en una menor disponibilidad de P1 para ejercer algún papel necesario para la infección por WMV. Cómo esta interacción contribuiría al desarrollo de las infecciones mixtas es un aspecto que queda pendiente de abordar en mayor detalle. También sería interesante verificar en qué tejidos y en qué tipos celulares concretos se puede dar la presencia conjunta de los dos virus en la infección mixta. Nuestros estudios de interacción se han llevado a cabo con proteínas etiquetadas y en expresión transitoria, por lo que es prematuro avanzar conclusiones hasta verificar si las interacciones se mantienen en el caso del huésped natural y entre proteínas no etiquetadas.

En cuanto al ipomovirus CocMoV, descubierto recientemente en Sudán (Desbiez et al. 2016) presente en plantas de *Coccinia grandis*, es un virus de cuarentena en Europa, ya que hasta el momento no se han descrito casos de plantas infectadas por este virus en el continente. Sin embargo, se trata de un virus potencialmente peligroso, ya que en laboratorio causa daños muy graves en plantas de la familia cucurbitácea, entre ellas melón y calabacín. El trabajo realizado con este virus se ha llevado a cabo en laboratorios de alta seguridad del PACA-INRA-Avignon (Francia) bajo la supervisión de la Dra. C. Desbiez. Basándonos en la secuencia depositada en genbank KU935732, y en colaboración con el Dr. A. Valli (CNB-CSIC, Madrid) se ha analizado el motivo G<sub>2</sub>A<sub>6</sub> presente en la P1a de este virus. Mediante secuenciación masiva empleando la plataforma

Ilumina MiSeq, se ha observado la posible producción de dos nuevos productos génicos, los cuales se obtendrían por la delección o inserción de un nucleótido, dando lugar al producto que hemos denominado provisionalmente P1aN-SOG (de "Short Out-of-frame Gene-product") o a la variante P1aN-ALT respectivamente. En el caso del potyvirus SPFMV, recientemente se ha caracterizado que un mecanismo similar da lugar a la nueva proteína parcialmente solapante P1N-PISPO, activa como supresor de silenciamiento (Mingot et al. 2016; Untiveros et al. 2016). Por ello, se decidió evaluar la actividad supresora de las hipotéticas nuevas proteínas, P1aN-SOG y P1aN-ALT, sin observarse actividad supresora en ninguna de las dos, ni en la proteína P1a completa, confirmando al mismo tiempo el papel supresor de silenciamiento de la proteína P1b, de acuerdo con otros ipomovirus relacionados, como es el caso de CVYV (Valli et al. 2006).

Para intentar comprobar si alguno de los nuevos productos génicos P1aN-SOG o P1aN-ALT son esenciales para el virus, se decidió generar un clon infectivo de CocMoV, y a partir de la herramienta, un mutante del mismo que conservara la secuencia aminoacídica del virus original, pero que fuera presumiblemente incapaz de producir estos productos, por modificación del sitio de deslizamiento de la polimerasa. Los experimentos de infectividad llevados a cabo, mostraron que el mutante silencioso de CocMoV retiene la capacidad de infectar plantas. Sin embargo, el número de plantas infectadas fue menor en este caso comparado con el virus no modificado, y la repetición de los experimentos con el mutante (C. Desbiez, comunicación personal) sugiere que el efecto se mantiene, aunque el número de plantas ensayadas no es todavía lo suficientemente elevado para derivar conclusiones definitivas. Estos datos preliminares podrían apuntar hacia una relación de estos nuevos productos génicos con la capacidad infectiva del virus en las primeras

fases del establecimiento de la infección, aunque serían necesarios experimentos adicionales.

Además, también se ha estudiado en detalle el deslizamiento de la polimerasa en el motivo  $G_1A_7$  presente en P3, localizado al principio de la fase de lectura de PIPO, y altamente conservada en todos los miembros de la familia *Potyviridae* (Chung et al. 2008). En el caso de CocMoV, se observó tanto la inserción de un nucleótido dando lugar a la proteína solapante P3N-PIPO, la cual se ha relacionado directamente con el movimiento del virus en las plantas (Vijayapalani et al. 2012; Wei et al. 2010; Wen y Hajimorad, 2010; White, 2015), como a la variante P3N-ALT con una terminación prematura. En relación con el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se realizó primero un “two simple two sided t-test” que tiene en cuenta la diferencia entre medias y desviación de los porcentajes de inserciones y deleciones. En el caso de inserción y deleción en P1a no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre infección sencilla y mixta con virus homólogos o heterólogos. En el caso de P3, se observaron diferencias estadísticamente significativas en inserción entre infección sencilla y mixta con virus homólogos o heterólogos, mientras que en deleción solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre infección sencilla y mixta con virus heterólogos. Sin embargo, este test no tiene en cuenta el número de lecturas (reads), por lo que el tamaño de la muestra queda reducido a 100 para el análisis de frecuencias, lo cual lleva a una drástica pérdida de poder estadístico. Por ello, decidimos usar un “Pearson’s chi-square test” para validar nuestros resultados, confirmando las diferencias estadísticas observadas en inserción y deleción en P3. No obstante, en el caso de deleción en P1a en infección mixta con virus homólogos o heterólogos, así como en el caso de deleción en P3 en infección mixta con virus homólogos, se han observado diferencias estadísticamente significativas dentro de las muestras, por lo

que sería aconsejable realizar un número mayor de réplicas en futuros análisis.

En el motivo correspondiente a P3N-PIPO, los valores promedio de las frecuencias de variantes que producen dicha proteína en tres réplicas biológicas independientes fueron de 2.3% en CocMoV, frente a 1.9% en CocMoV+WMV, y 2.9% en CocMoV+CYSDV. Además, se produciría también P3N-ALT por la delección de un nucleótido en los tres casos de infecciones mixtas y sencillas anteriormente considerados, con valores ligeramente por encima de la expresión esperada de P3N-PIPO excepto en el caso de la infección mixta de CocMoV+CYSDV. Es interesante resaltar que la relación de frecuencias entre las variantes P3N-PIPO y P3N-ALT cambia en esta combinación de ipomovirus+crinivirus, pasando de ser 0,9 en infección sencilla a 1,1 en la mixta. Recientemente, se ha caracterizado que en el potyvirus CIYVV la proteína solapante P3N-ALT actúa en cooperación con P3N-PIPO en el movimiento viral célula a célula (Hagiwara-Komoda et al. 2015). Además, la expresión de P3N-ALT parece ser un requisito previo para la infección eficaz por CIYVV. La actividad de estos productos génicos en fenómenos de resistencia también ha sido propuesta (Choi et al. 2013), y sería interesante confirmar si en el caso de infecciones mixtas las cantidades relativas se ven en efecto moduladas.

En resumen, todos estos resultados recientemente obtenidos con ORFs fuera de fase y productos truncados por terminación prematura sugieren que tal vez no se conoce todo el potencial codificador de los genomas de virus, y que podrían existir más variedad de productos funcionales producidos a través de deslizamiento de la polimerasa. En otras palabras, es posible que en diversas especies de virus de RNA se haya subestimado la capacidad de codificación de los genomas, y por ejemplo en CocMoV nuestros resultados apuntan a la posible expresión de dos productos más, P1aN-SOG y P1aN-ALT. Se necesitarán más estudios

para confirmar si en efecto son producidos durante la infección viral, y en ese caso, para determinar sus posibles funciones en el ciclo del virus.

Para concluir, podemos decir que pese a que las infecciones mixtas de virus en plantas son objeto de estudio por parte de numerosos grupos de investigación de todo el mundo, el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con las infecciones mixtas así como sus efectos biológicos derivados son muy parciales todavía. Nuestro trabajo, es una aportación más en este sentido y será interesante seguir dedicando esfuerzos para la mayor comprensión del importante papel que juegan las infecciones mixtas en la naturaleza.



**CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

La presente tesis se ha ocupado de los efectos biológicos de las infecciones mixtas del crinivirus CYSDV (*Cucumber vein yellowing virus*) con virus de la familia *Potyviridae* como el potyvirus WMV (*Watermelon mosaic virus*) o el ipomovirus CocMoV (*Coccinia mottle virus*), en plantas cucurbitáceas susceptibles, y nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las comparaciones de la carga viral en plantas de melón PST111 entre infección sencilla o mixta de los virus WMV y CYSDV, mostraron un claro aumento de la acumulación de CYSDV en infección mixta con un pico máximo a 24 dpi, mientras que la carga viral de WMV se vió ligeramente reducida en el caso de infecciones mixtas en todos los puntos temporales analizados.
2. Los ensayos de transmisión de WMV y de CYSDV, a partir de plantas en infección sencilla y mixta, y empleando respectivamente *M. persicae* y *B. tabaci* como vectores naturales de cada virus, mostraron como tendencias un aumento de la tasa de transmisión de WMV, y una ligera reducción de la de CYSDV cuando la fuente de inóculo era una planta en infección mixta. Estos resultados contrastan con la reducción y el aumento de carga viral antes mencionados.
3. No se han observado diferencias en los ensayos de preferencia de *M. persicae* entre plantas con infección simple o mixta. En ensayos de comportamiento alimenticio empleando la técnica EPG para comparar como fuentes de inóculo plantas en infección mixta o sencilla, se observó en el primer caso mayor duración de las sufases II-3 de las pruebas

intracelulares detectadas como caídas de potencial PDs. Esta subfase se ha asociado a la actividad de adquisición, lo que podría explicar el aumento de la frecuencia de transmisión.

4. Las tasas de transmisión global de CYSDV por *B. tabaci* fueron similares a partir de plantas en infección sencilla y mixta, tanto en los experimentos de transmisión primaria como en los de transmisión secundaria llevados a cabo en condiciones de semicampo. No obstante, la comparación de las frecuencias de inoculación entre plantas receptoras mostró una mayor transmisión a plantas previamente infectadas con WMV que a plantas no infectadas, lo que podría contribuir a una más alta prevalencia de infecciones mixtas.

5. En experimentos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* se ha comprobado que la proteína P25 de nuestro aislado español de CYSDV presenta actividad como supresor de silenciamiento, y se ha analizado su localización celular, encontrándose en núcleo y citoplasma. También se ha determinado la actividad supresora de la proteína HCPro de WMV, y se ha analizado su localización celular, encontrándose en este caso en núcleo, nucleolo y citoplasma.

6. Experimentos de co-expresión de proteínas virales con actividad supresora del silenciamiento génico (P25 de CYSDV o HCPro de WMV) junto a proteínas sin esa actividad (P22 de CYSDV o P1 de WMV) nos han permitido identificar un efecto negativo de la proteína P1 de WMV sobre la actividad de la proteína P25 de CYSDV, y se ha confirmado la interacción entre ambas proteínas en experimentos de complementación de fluorescencia bimolecular. Esta interacción podría estar relacionada con las respuestas sinérgicas o antagónicas existentes entre virus heterólogos, y ser específica de determinadas combinaciones, puesto

que no se ha observado interacción entre proteínas P1 de otros miembros de la familia *Potyviridae* y proteínas con actividad supresora de otros virus.

7. Se han analizado los motivos de secuencia, característicos de deslizamiento de la polimerasa, del tipo  $G_{1-2} A_{6-7}$ , presentes en las regiones codificantes de P1a y P3 en el genoma de CocMoV. Estos motivos son susceptibles de dar lugar a variantes traducibles como nuevos productos génicos con una parte fuera de fase. La secuenciación masiva de amplicones que contienen dichos motivos mostró la existencia de inserciones y deleciones entre 0.3 y 0.6 % de las secuencias en P1a, y por encima del 2% de las secuencias en P3. Estos valores sugieren que además de la P1a con 530 aminoácidos, podrían formarse productos como P1aN-SOG con 271 aminoácidos (14 fuera de fase) después de la deleción de 1 nucleótido, o P1aN-ALT con 266 aminoácidos (9 fuera de fase) por inserción de un nucleótido. En el caso de proteína P3 con 285 aminoácidos, la inserción de un nucleótido daría lugar a la proteína P3N-PIPO con 214 aminoácidos (77 fuera de fase), y por deleción de un nucleótido podría formarse la proteína P3N-ALT con 143 aminoácidos (2 fuera de fase).

8. Se ha generado un clon infectivo de CocMoV, capaz de infectar plantas de melón y calabacín susceptibles con alta eficiencia. Un mutante viral generado mediante modificación silenciosa de la secuencia del motivo de deslizamiento de la polimerasa en P1a, retuvo la capacidad de infectar aunque con menor eficiencia, pero el análisis de la progenie viral no mostró cambios en la secuencia modificada. Esto sugiere la posible relación de las proteínas P1aN-SOG y P1aN-ALT con el mecanismo de infección de CocMoV.

9. Ensayos de actividad supresora de silenciamiento mediante expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* nos han permitido asignar esta función esencial a la proteína P1b de CocMoV, mientras que ni P1a ni los hipotéticos nuevos productos génicos P1aN-SOG y P1aN-ALT presentaron dicha actividad.

10. Las frecuencias de detección de variantes con inserciones o deleciones en los sitios de deslizamiento de la polimerasa cuando se compara por secuenciación masiva la progenie en muestras de plantas con infección sencilla de CocMoV, o mixtas de CocMoV con el potyvirus WMV, o con el crinivirus CYSDV, no cambiaban apenas para el caso del motivo localizado en P1a. En cambio, las frecuencias de variantes en el motivo localizado en P3 sí se modificaron en la combinación de CocMoV con CYSDV, lo que podría dar lugar a cambios en la proporción relativa de P3N-PIPO y P3N-ALT entre plantas con infección simple o doble.

**CONCLUSIONS**



## 7. Conclusions

In this work, different biological effects of mixed infections of the crinivirus CYSDV (*Cucumber vein yellowing virus*) with viruses of the family *Potyviridae* such as the potyvirus WMV (*Watermelon mosaic virus*) or the ipomovirus CocMoV (*Coccinia mottle virus*), have been characterized in susceptible cucurbitaceous plants. Our work has allowed to reach the following conclusions:

1. Comparison of the viral load in PST111 melon plants between single or mixed infection with WMV and CYSDV, showed an increase in accumulation of CYSDV in mixed infection, peaking at 24 dpi, while viral loads of WMV in mixed infections were slightly reduced at all time points.
2. Transmission assays of WMV and CYSDV, respectively by their natural vectors *M. persicae* and *B. tabaci*, showed increases in transmission rates for WMV, and a slight reduction for CYSDV when mixed infected plants were used as source of inocula. These results contrasted with the previously mentioned viral load changes.
3. No differences between single or mixed infected plants were observed in preference assays of *M. persicae*. Analysis of feeding behavior using EPG methods showed a longer duration of the II-3 subphase of the intracellular puncture PD waveform when aphids were fed on mixed infected plants. This subphase was directly associated with acquisition, a fact that could explain the increase in transmission frequency.
4. Overall transmission rates of CYSDV using *B. tabaci* were similar for single or double infected plants, both in primary and secondary

transmission assays performed under semi-field conditions. However, the comparison of receptor plants showed better transmission of CYSDV to plants previously infected with WMV compared to uninfected plants, which could contribute to a higher prevalence of mixed infections.

5. Transient expression in *N. benthamiana* leaves showed RNA silencing suppression activity for the protein P25 of our CYSDV Spanish isolate. The protein was found in both nucleus and cytoplasm. Also, the RNA silencing suppression activity was associated to the protein HC-Pro, localized in nucleus, nucleolus and cytoplasm.

6. Co-expression assays of viral proteins with RSS activity (such as P25 of CYSDV, or HCPro of WMV), together with proteins not exhibiting this activity (such as P22 of CYSDV, or P1 of WMV) allowed us to identify a negative effect of WMV P1 on the activity of CYSDV P25. The interaction among them, confirmed by bimolecular fluorescence complementation, could be related to synergistic or antagonistic responses for heterologous viruses. Specificity to certain combinations was anticipated, since no interactions were observed for P1 proteins of other members of the family *Potyviridae* and proteins with suppression activity of other viruses.

7. Conserved motifs like G<sub>1-2</sub> A<sub>6-7</sub> related with polymerase slippage, present in the proteins P1a and P3 in the CocMoV genome were analyzed. These motifs are likely to result in new gene products with part of the sequence out-of-frame compared to the viral polyprotein. Deep sequencing of amplicons flanking these motifs showed insertions and deletions with 0.3 and 0.6% frequencies for the motif in P1a, and over 2% for the motif in P3. These results suggested that in addition to P1a with 530 amino acids, new gene products such as P1aN-SOG with 271 amino acids (14 out of phase) by deletion of 1 nucleotide, or P1aN-ALT with 266

amino acids (9 out of phase) by insertion of a nucleotide, could be potentially produced during CocMoV infection. In the case of the P3 protein with 285 amino acids, the insertion of a nucleotide would result in P3N-PIPO with 214 amino acids (77 out of phase), and the deletion of one nucleotide in P3N-ALT with 143 amino acids (2 out of phase).

8. An infectious clone of CocMoV was constructed, able to infect susceptible melon and cucumber plants with high efficiency. A silent mutation affecting two positions in the P1a polymerase slippage motif resulted in a virus variant with a progeny showing no detectable changes in the modified sequence. The mutant retained the ability to infect plants although with less efficiency, suggesting a possible relationship of P1aN-SOG and P1aN-ALT with the infection mechanism.

9. RNA silencing suppression assays by transient expression in *N. benthamiana* leaves, allowed us to assign this essential function to the P1b protein of CocMoV, whereas neither P1a nor the hypothetical new gene products P1aN-SOG and P1aN-ALT presented such activity.

10. Variants with insertions or deletions detected by NGS in the polymerase slippage sites were compared for samples of plants infected by CocMoV alone, or combined with the potyvirus WMV, or with the crinivirus CYSDV. The frequencies of insertions and deletions were similar in the motif located in P1a. In contrast, the frequencies for the motif in P3 were different for the combination of CocMoV with CYSDV, which could lead to changes in the relative proportion of P3N-PIPO and P3N-ALT between plants with single or mixed infection.



## **BIBLIOGRAFÍA**



---

## 8. Bibliografía

- Abrahamian PE, Abou-Jawdah Y (2014)** Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Disease* 25:26-38.
- Abrahamian PE, Seblani R, Sobh H, Abou-Jawdah Y (2013)** Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 193:320-326.
- Agranovsky A a., Lesemann DE, Maiss E, Hull R, Atabekov JG (1995)** «Rattlesnake» structure of a filamentous plant RNA virus built of two capsid proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2470-3.
- Agrios GN (1988)** *Plant pathology*. 3rd Edition. Elsevier, Academic Press. 803 pp.
- Alfaro A (1953)** Aspecto fitopatológico del cultivo algodonoero en Aragón. *Bol Patol Veg Ent Agri* 20:145-166.
- Ali A, Natsuaki T, Okuda S (2006)** The complete nucleotide sequence of a Pakistani isolate of *Watermelon mosaic virus* provides further insights into the taxonomic status in the *Bean common mosaic virus* subgroup. *Virus Genes* 32:307-311.
- Allison RF, Sorenson JC, Kelly ME, Armstrong FB, Dougherty WG (1985)** Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: Evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc Natl Acad Sci* 82:3969-3972.
- Alvarez AE, Tjallingii WF, Garzo E, Vleeshouwers V, Dicke M, Vosman B (2006)** Location of resistance factors in the leaves of potato and wild tuber-bearing *Solanum* species to the aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl* 121:145-157.
- Ammar ED, Järlfors U, Pirone TP (1994)** Association of potyvirus helper component protein with virions and the cuticle lining the maxillary food canal and foregut of an aphid vector. *Phytopathology* 84:1054-1060.

- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB, Beachy RN (1998)** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Genetics* 95:13079-13084.
- Andret-Link P, Fuchs M (2005)** Transmission specificity of plant viruses by vectors. *J. Plant Pathol* 87:153-165
- Anjos JR, Taiwo M, Ghabrial S, Rayney R, Hamilton R (1992)** Soybean mosaic potyvirus enhances the titer of two comoviruses in dually infected soybean plants. *Phytopathology* 82:1022.
- Avila Y, Stavisky J, Hague S, Funderburk J, Reitz S, Momol T (2006)** Evaluation of *Frankliniella bispinosa* (Thysanoptera: Thripidae) as a vector of the *Tomato spotted wilt virus* in pepper. *Florida Entomol* 89:204-207.
- Baig MM, Dubey AK, Ramamurthy VV (2015)** Biology and morphology of life stages of three species of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) from India. *Pan-Pac Entomol* 91:168-183.
- Barker H, Dale MFB (2006)** Natural resistance mechanisms of plants to viruses. *Resistance to viruses in potato*; Springer pp. 341–366.
- Barry JK, Miller WA (2002)** A -1 ribosomal frameshift element that requires base pairing across four kilobases suggests a mechanism of regulating ribosome and replicase traffic on a viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:11133-8.
- Bates DM, Robinson RW, Jeffrey C (1990)** Biology and utilization of the *Cucurbitaceae*. Cornell University Press. New York. 449p.
- Beauchemin C, Laliberte J-F (2007)** The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during *Turnip mosaic virus* infection. *J Virol* 81:10905-10913.
- Belliure B, Janssen A, Maris PC, Peters D, Sabelis MW (2005)** Herbivore arthropods benefit from vectoring plant viruses. *Ecol Lett* 8:70-79.
- Blackman RL, Eastop VF (2007)** Taxonomic Issues. *Aphids as Crop Pests*, CABI, Wallingford, United Kingdom, 1-29.

- Blanc S, Michalakis Y (2016)** Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Curr Opin Insect Sci* 16:36-43
- Blua MJ, Perring TM (1992)** Alatae production and population increase of aphid vectors on virus-infected host plants. *Oecologia* 92:65-70.
- Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD (2011)** The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res* 159:201-205.
- Bourdin D, Lecoq H (1994)** Increase in *Cucurbit aphid-borne yellows virus* concentration by co-infection with sap-transmissible viruses does not increase its aphid transmissibility. *J Phytopathol* 141:143-152.
- Boyer JC, Haenni AL (1994)** Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology* 198:415-426
- Brandes J, Wetter C (1959)** Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology. *Virology* 8:99-115.
- Brault V, Herrbach É, Reinbold C (2007)** Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38:302-312.
- Bronkhorst AW, Van Rij RP (2014)** The long and short of antiviral defense: Small RNA-based immunity in insects. *Curr Opin Virol* 7:19-28
- Brown JK (1992)** Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis* 76:220.
- Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC (1995)** The Sweet potato or silverleaf whiteflies: Biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annu Rev Entomol* 40:511-534.
- Bujarski JJ, Miller WA (1992)** Use of in vitro transcription to study gene expression and replication of spherical, positive sense RNA plant viruses. In *Genetic Engineering with Plant Viruses*. Edited by T. M. A. Wilson & J. W. Davies. Boca Raton: CRC Press 115-147 pp.
- Calvert L, Ghabrial S (1983)** Enhancement by *Soybean mosaic virus* of *Bean pod mottle virus* titer in doubly infected soybean. *Phytopathology* 992-997.

- Campbell BC, Stephen-Campbell JD, Gill R (1995)** Origin and radiation of whiteflies: an initial molecular phylogenetics assessment. In: Gerling, D., Mayer, R.T. (eds.), *Bemisia: Taxonomy, Biology, Damage, Control and Management*. Intercept, UK, pp. 29-52
- Carmo-Sousa M, Moreno A, Garzo E, Fereres A (2014)** A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Res* 186:38-46.
- Carnero A, Montesdeoca M, Pérez F, Silverio A, Rodríguez P (1990)** Presencia de *Bemisia tabaci* (Genn.) en cultivos comerciales de hortícolas y ornamentales en la isla de Tenerife (Islas Canarias). *Cuadernos de Fitopatología*, 25: 176-18
- Castle SJ, Berger PH (1993)** Rates of growth and increase of *Myzus persicae* on virus-infected potatoes according to type of virus-vector relationship. *Entomol Exp Appl* 69:51-60.
- Castle SJ, Mowry TM (1998)** Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. *Ann Entomol Soc Am* 91:661-667
- Celix A, LopezSese A, Almarza N, Gomez-Guillamon ML, RodriguezCerezo E (1996)** Characterization of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*, a *Bemisia tabaci*-transmitted closterovirus. *Phytopathology* 86:1370-1376
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV., Carrington JC (2004)** Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18:1179-1186.
- Charron C, Nicolai M, Gallois JL, Robaglia C, Moury B, Palloix A, Caranta C (2008)** Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J* 54:56-68.

- Chávez-Calvillo G, Contreras-Paredes CA, Mora-Macias J, Noa-Carrazana JC, Serrano-Rubio AA, Dinkova TD, Carrillo-Tripp M, Silva-Rosales L (2016)** Antagonism or synergism between *Papaya ringspot virus* and *Papaya mosaic virus* in *Carica papaya* is determined by their order of infection. *Virology* 489:179-191.
- Chen Q, Wei T (2016)** Viral receptors of the gut: insect-borne propagative plant viruses of agricultural importance. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16:9-13
- Choi SH, Hagiwara-Komoda Y, Nakahara KS, Atsumi G, Shimada R, Hisa Y, Naito S, Uyeda I (2013)** Quantitative and qualitative involvement of P3N-PIPO in overcoming recessive resistance against *Clover yellow vein virus* in pea carrying the *cyv1* gene. *J Virol* 87:7326-37.
- Choi J, Xu Z, Ou JH (2003)** Triple decoding of *Hepatitis C virus* RNA by programmed translational frameshifting. *Mol Cell Biol* 23:1489-1497.
- Chung BY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008)** An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc Natl Acad Sci* 105:5897-5902.
- Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T (2006)** Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J Mol Biol* 362:1120-1131.
- Collar JL, Avilla C, Fereres A (1997)** New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environ Entomol* 26:537-544.
- Collar JL, Fereres A (1998)** Nonpersistent virus transmission efficiency determined by aphid probing behavior during intracellular punctures. *Environ Entomol* 27:583-591.
- Csorba T, Pantaleo V, Burgyán J. (2009)** RNA silencing: an antiviral mechanism. *Adv Virus Res.* 75:35-71.

- Cuellar WJ, Tairo F, Kreuze JF, Valkonen JPT (2008)** Analysis of gene content in *Sweet potato chlorotic stunt virus* RNA1 reveals the presence of the p22 RNA silencing suppressor in only a few isolates: Implications for viral evolution and synergism. *J Gen Virol* 89:573-582.
- Cullen BR, Cherry S, Tenoever BR (2013)** Is RNA interference a physiologically relevant innate antiviral immune response in mammals? *Cell Host Microbe* 14:374-378
- Dáder B, Moreno A, Viñuela E, Fereres A (2012)** Spatio-temporal dynamics of viruses are differentially affected by parasitoids depending on the mode of transmission. *Viruses* 4:3069-3089.
- De Barro PJ, Liu S-S, Boykin LM, Dinsdale AB (2011)** *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu Rev Entomol* 56:1-19.
- Desbiez C, Chandeysson C, Lecoq H, Moury B (2012)** A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *J Virol Methods* 183:94-97.
- Desbiez C, Lecoq H (2004)** The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, Potyvirus) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Arch Virol* 149:1619-1632
- Desbiez C, Verdin E, Tepfer M, Wipf-Scheibel C, Millot P, Dafalla G, Lecoq H (2016)** Characterization of a new cucurbit-infecting ipomovirus from Sudan. *Arch Virol* 161:2913-2915.
- Díaz-Pendón JA, Ding SW (2008)** Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 46:303-326.
- Dicke M, Hilker M (2003)** Induced plant defences: From molecular biology to evolutionary ecology. *Basic Appl Ecol* 4:3-14.
- Ding SW, Voinnet O (2007)** Antiviral Immunity Directed by Small RNAs. *Cell* 130:413-426

- Dolja V V., Kreuze JF, Valkonen JPT (2006)** Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res* 117:38-51.
- Domínguez García-Tejero F (1961)** Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. Ed.Dossat. Madrid. 929 pp.
- Dougherty WG, Carrington JC, Cary SM, Parks TD (1988)** Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *EMBO J* 7:1281-7
- Dufresne PJ, Ubalijoro E, Fortin MG, Laliberté JF (2008)** *Arabidopsis thaliana* class II poly(A)-binding proteins are required for efficient multiplication of Turnip mosaic virus. *Journal of General Virology*, 89: 2339-2348.
- Dunn JJ, Studier FW, Gottesman M (1983)** Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. *J Mol Biol* 166:477-535.
- Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, Wang Y, Jay F, Alioua A, Himber C, Voinnet O (2010)** An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J* 29:1699-1712.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005)** DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nat Genet* 37:1356-1360.
- Eenink AH (1977)** Genetics of host-parasite relationship and the stability of resistance. In: Proceedings of a Symposium. Induced mutant against plant diseases. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, pp. 47-57.
- Eigenbrode SD, Ding H, Shiel P, Berger PH (2002)** Volatiles from potato plants infected with *Potato leafroll virus* attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc R Soc B Biol Sci* 269:455-460.

- Elena SF, Bernet GP, Carrasco JL (2014)** The games plant viruses play. *Curr Opin Virol* 8:62-67.
- Esquinas-Alcazar JT, Gulick PJ (1983)** Genetic resources of *Curcubitaceae*. International Board of Plant Genetic Resources. Rome. pp. 67-70.
- Fereres A, Peñaflores MFGV, Favaro CF, Azevedo KEX, Landi CH, Maluta NKP, Bento JMS, Lopes JRS (2016)** Tomato infection by whitefly-transmitted circulative and non-circulative viruses induce contrasting changes in plant volatiles and vector behaviour. *Viruses* 8:e225.
- Fereres A, Moreno A (2009)** Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res* 141:158-168.
- Fernández-Calvino L, López-Abella D, López-Moya JJ, Fereres A (2006)** Comparison of *Potato virus Y* and *Plum pox virus* transmission by two aphid species in relation to their probing behavior. *Phytoparasitica* 34:315-324.
- Gal-On A, Meiri E, Elman C, Gray DJ, Gaba V (1997)** Simple hand-held devices for the efficient infection of plants with viral-encoding constructs by particle bombardment. *J Virol Methods* 64:103-110.
- García-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, González VM, Hénaff E, Câmara F, Cozzuto L, Lowy E, Alioto T, Capella-Gutiérrez S, Blanca J, Cañizares J, Ziarsolo P, Gonzalez-Ibeas D, Rodríguez-Moreno L, Droege M, Du L, Alvarez-Tejado M, Lorente-Galdos B, Melé M, Yang L, Weng Y, Navarro A, Marques-Bonet T, Aranda MA, Nuez F, Picó B, Gabaldón T, Roma G, Guigó R, Casacuberta JM, Arús P, Puigdomènech P (2012)** The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11872-7.
- Garzo E, Moreno A, Hernando S, Mariño V, Torne M, Santamaría E, Díaz I, Fereres A (2016)** Electrical penetration graph technique as a tool to monitor the early stages of aphid resistance to insecticides. *Pest Manag Sci* 72:707-718.

- Garzo E, Soria C, Gómez-Guillamón ML, Fereres A (2002)** Feeding behavior of *Aphis gossypii* on resistant accessions of different melon genotypes (*Cucumis melo*). *Phytoparasitica* 30:129-140.
- Gergerich RC, Dolja VV (2006)** Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor, Aps.
- Gil-Salas FM, Peters J, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D (2011)** Yellowing disease in zucchini squash produced by mixed infections of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* and *Cucumber vein yellowing virus*. *Phytopathology* 101:1365-1372.
- Gil-Salas FM, Peters J, Boonham N, Cuadrado IM, Janssen D (2012)** Co-infection with *Cucumber vein yellowing virus* and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* leading to synergism in cucumber. *Plant Pathol* 61:468-478.
- Giner A, Lakatos L, García-Chapa M, López-Moya JJ, Burgyán J (2010)** Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* 6:1-13.
- Gómez P, Sempere RN, Aranda MA (2012)** *Pepino mosaic virus* and *Tomato torrado virus*. Two emerging viruses affecting tomato crops in the Mediterranean basin. *Adv Virus Res* 84:505-532.
- Gómez-Menor J (1943)** Contribución al conocimiento de los Aleyrodidos de España. (Hem. Homoptera). 1ª notas. *Eos* 19:173-209.
- Gray S, Gildow FE (2003)** Luteovirus-aphid interactions. *Annu Rev Phytopathol* 41:539-566.
- Gray SM, Banerjee N (1999)** Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:128-48.
- Guirao P, Beitia F, Cenis JL (1997)** Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull Entomol Res* 87:587-593.

- Guo JY, Ye GY, Dong SZ, Liu SS (2010)** An invasive whitefly feeding on a virus-infected plant increased its egg production and realized fecundity. *PLoS One* 5:e11713.
- Hagiwara-Komoda Y, Choi SH, Sato M, Atsumi G, Abe J, Fukuda J, Honjo MN, Nagano AJ, Komoda K, Nakahara KS, 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
- Hameed A, Iqbal Z, Asad S, Mansoor S (2014)** Detection of multiple potato viruses in the field suggests synergistic interactions among potato viruses in Pakistan. *Plant Pathol J* 30:407-415.
- Hamilton J, Baulcombe DC (1999)** A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286:950-952.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1997)** Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:575-607.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000)** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.
- Hari V, Siegel A, Rozek C, Timberlake WE (1979)** The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* 92:568-571.
- Harris KF (1990)** Aphid Transmission of plant viruses. En: *Plant Viruses*. Vol. II. Pathology. Editado por: Mandahar, C.L. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp. 177-204
- Hassan AA, Duffus JE (1991)** A review of a yellowing and stunting disorder of cucurbits in the United Arab Emirates. *Emirates Journal of Agricultural Sciences*: 2, 1–16.

- Higashi CHV, Bressan A (2013)** Infection rates and comparative population dynamics of *Peregrinus maidis* (Hemiptera: Delphacidae) on corn plants with and without symptoms of *Maize mosaic virus* (Rhabdoviridae: Nucleorhabdovirus) Infection. *Environmental Entomology*, 42: 949–956.
- Hisa Y, Suzuki H, Atsumi G, Choi SH, Nakahara KS, Uyeda I (2014)** P3N-PIPO of *Clover yellow vein virus* exacerbates symptoms in pea infected with *White clover mosaic virus* and is implicated in viral synergism. *Virology* 449:200-206.
- Hofius D, Li L, Hafrén A, Coll NS (2017)** Autophagy as an emerging arena for plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol.* 38:117-123.
- Hogenhout SA, Ammar E-D, Whitfield AE, Redinbaugh MG (2008)** Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46:327-359.
- Hollings M, Brunt AA (1981)** Potyvirus group. Commonwealth Mycological Institute. Association of Applied Biologists. *Descriptions of Plant Viruses*, n. 245.
- Howe GA (2004)** Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* 23:223-237.
- Hull R (2009)** Propagation of major plant-virus hosts. *Curr Protoc Microbiol* 16:16A.2
- Hull R (2013)** *Plant Virology: Fifth Edition*. Academic Press. 1118 pp.
- Hurd H (2003)** Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annu Rev Entomol* 48:141-161.
- Incarbone M, Dunoyer P (2013)** RNA silencing and its suppression: Novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.* 18:382-392
- Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA (2012)** Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci Rep* 2:578.

- Ivanov KI, Eskelin K, Bašić M, De S, Lõhmus A, Varjosalo M, Mäkinen K (2016)** Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J* 85:30-45.
- Izquierdo A, Duran M (1967)** Enfermedades y parásitos del tabaco en España. *Bol Patol Veg Ent Agri* 30:155-214.
- Jamous RM, Boonrod K, Fuellgrabe MW, Ali-Shtayeh MS, Krczal G, Wassenegger M (2011)** The helper component-proteinase of the *Zucchini yellow mosaic virus* inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *J Gen Virol* 92:2222-2226.
- Janssen D, Martín G, Velasco L, Gómez P, Segundo E, Ruiz L, Cuadrado IM (2005)** Absence of a coding region for the helper component-proteinase in the genome of *Cucumber vein yellowing virus*, a whitefly-transmitted member of the *Potyviridae*. *Arch Virol* 150:1439-1447.
- Jeffrey C (1990)** Systematics of the Cucurbitaceae: An overview. In: Bates DM, Robinson RW, Jeffrey C (eds) *Biology and utilization of the cucurbitaceae*. Cornell University Press, Ithaca, USA, pp 3–28.
- Jiménez-Martínez ES, Bosque-Pérez NA, Berger PH, Zemetra RS, Ding H, Eigenbrode SD (2004)** Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to *Barley yellow dwarf virus*-infected transgenic and untransformed wheat. *Environ Entomol* 33:1207-1216.
- Johnson DD, Walker GP, Creamer R (2002)** Stylet penetration behavior resulting in inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*. *Entomol Exp Appl* 102:115-123.
- Karasev AV. (2000)** Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu Rev Phytopathol* 38:293-324.
- Karyeija RF, Kreuze JF, Gibson RW, Valkonen JPT (2000)** Synergistic interactions of a potyvirus and a phloem-limited crinivirus in sweet potato plants. *Virology* 269:26-36.

- Kasschau KD, Carrington JC (1998)** A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461-470.
- Kataya ARA, Suliman MNS, Kalantidis K, Livieratos IC (2009)** *Cucurbit yellow stunting disorder virus p25* is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Virus Res* 145:48-53.
- Kaufmann L, Schürmann F, Yiallourous M, Harrewijn P, Kayser H (2004)** The serotonergic system is involved in feeding inhibition by pymetrozine. Comparative studies on a locust (*Locusta migratoria*) and an aphid (*Myzus persicae*). *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 138:469-483.
- Kendall A, McDonald M, Bian W, Bowles T, Baumgarten SC, Shi J, Stewart PL, Bullitt E, Gore D, Irving TC, Havens WM, Ghabrial SA, Wall JS, Stubbs G (2008)** Structure of flexible filamentous plant viruses. *J Virol* 82:9546-9554.
- Kennedy JS, Day MF, Eastop VF (1962)** A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, United Kingdom. 114pp.
- Kerppola TK (2006)** Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* 1:1278-1286.
- Kimmins FM, Tjallingii WF (1985)** Ultrastructure of sieve element penetration by aphid stylets during electrical recording. *Entomol Exp Appl* 39:135-141.
- Kirkbride JH (1993)** Biosystematic monograph of the genus *Cucumis* (*Cucurbitaceae*), botanical identification of cucumbers and melons. US Department of Agriculture. Boone: Parkway publishers. 159pp.

- Kreuze JF, Savenkov EI, Valkonen JPT (2002)** Complete genome sequence and analyses of the subgenomic RNAs of *Sweet potato chlorotic stunt virus* reveal several new features for the genus Crinivirus. *J Virol* 76:9260-70.
- Lacasa A, Sánchez JA, Gutiérrez L, Contreras J, Guirao P, Ros C, Molina J, Lorca M, Hita I (1997)** Dinámica poblacional de *Bemisia tabaci* (Gennadius) y evolución de la incidencia del TYLCV en cultivos de tomate de Murcia. En: El virus del rizado amarillo (Hoja en cuchara) del tomate (TYLCV) y su vector *Bemisia tabaci*. Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Murcia. pp. 35-46.
- Lacomme C, Hrubikova K, Hein I (2003)** Enhancement of virus-induced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. *Plant J* 34:543-553.
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja V V., Calvino LF, López-Moya JJ, Burgyán J (2006)** Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25:2768-2780.
- Leckie BM, Stewart CN (2011)** Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. *Plant Cell Rep* 30:325-334.
- Lecoq H (1992)** Les virus des cultures de melon et de courgette de plein champ (I). *PHM Rev Horticole* 324:15–25
- Lecoq H, Desbiez C (2012)** Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region. An Ever-Changing Picture. *Adv Virus Res* 84:67-126.
- Lecoq H, Wisler G, Pitrat M (1998)** Cucurbit viruses: the classics- and the emerging. *Fruits* 75:208-211
- Lefèvre T, Thomas F (2008)** Behind the scene, something else is pulling the strings: Emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infect Genet Evol* 8:504-519.

- Lei W, Li P, Han Y, Gong S, Yang L, Hou M (2016)** EPG recordings reveal differential feeding behaviors in *Sogatella furcifera* in response to plant virus infection and transmission success. *Sci Rep* 6:30240.
- Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF (2000)** Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* 74:7730-7737.
- Li F, Ding SW (2006)** Virus Counterdefense: Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60:503-531.
- Li S, Wang H, Zhou G (2014)** Synergism between *Southern rice black-streaked dwarf virus* and *Rice ragged stunt virus* enhances their insect vector acquisition. *Phytopathology* 104:794-799.
- Li W, Hilf ME, Webb SE, Baker CA, Adkins S (2008)** Presence of P1b and absence of HC-Pro in *Squash vein yellowing virus* suggests a general feature of the genus *Ipomovirus* in the family *Potyviridae*. *Virus Res* 135:213-219.
- Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding SW (2013)** RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 80-342:231-234.
- Liu HY, Wisler GC, Duffus JE (2000)** Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. *Plant Dis* 84:803-805.
- Llave C (2010)** Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci.* 15:701-707
- Loebenstein G (2015)** Control of sweet potato virus diseases. *Adv Virus Res* 91:33-45.
- López-Moya JJ, García JA (1999)** Potyviruses (Potyviridae). En: *Encyclopedia of virology, Second edition, volume 3.* Webster, RG, Granoff, A., cd. Academic Press, London, pp 1369-1375.
- López-Moya JJ, Valli A, García JA (2009)** Potyviridae. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester (2009), pp. 1-10.

- Lucy AP (2000)** Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 19:1672-1680.
- Maillard P V., Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, Voinnet O (2013)** Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 80-342:235-238.
- Malpica JM, Sacristán S, Fraile A, García-Arenal F (2006)** Association and host selectivity in multi-host pathogens. *PLoS One* 1:e41.
- Mandadi KK, Scholthof KB (2013)** Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*. 25(5):1489-505.
- MAPAMA**, Anuario de estadística 2016.
- Marco CF, Aguilar JM, Abad J, Gómez-Guillamón ML, Aranda MA (2003)** Melon resistance to *Cucurbit yellow stunting disorder virus* is characterized by reduced virus accumulation. *Phytopathology* 93:844-852.
- Martelli GP, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja V V., Falk BW, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev A V., Minafra A, Namba S, Vetten HJ, Wisler GC, Yoshikawa N (2002)** The family *Closteroviridae* revised. *Arch Virol* 147:2039-2044.
- Martin B, Collar JL, Tjallingii WF, Fereres A (1997)** Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J Gen Virol* 78:2701-2705.
- Martínez-Turiño S, Hernández C (2009)** Inhibition of RNA silencing by the coat protein of *Pelargonium flower break virus*: Distinctions from closely related suppressors. *J Gen Virol* 90:519-525.
- Martinez F, Daros JA (2014)** *Tobacco etch virus* protein P1 traffics to the nucleolus and associates with the host 60S ribosomal subunits during infection. *J Virol* 88:10725-10737.
- Mascia T, Gallitelli D (2016)** Synergies and antagonisms in virus interactions. *Plant Sci* 252:176-192.

- Matthews REF (1992)** Fundamentals of Plant Virology. Elsevier Science Publishing Co Inc, United States. 403pp.
- Mauck K, Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC (2012)** Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: Evidence from plant viruses. *Funct Ecol* 26:1162-1175.
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2010)** Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proc Natl Acad Sci* 107:3600-3605.
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2014)** Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of *Cucumber mosaic virus* on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell Environ* 37:1427-1439.
- Mbanzibwa DR, Tian Y, Mukasa SB, Valkonen JP (2009)** *Cassava brown streak virus* (Potyviridae) encodes a putative Maf/HAM1 pyrophosphatase implicated in reduction of mutations and a P1 proteinase that suppresses RNA silencing but contains no HC-Pro. *J Virol*. 83(13):6934-40.
- McLean DL, Kinsey MG (1964)** A technique for electronically recording aphid feeding and salivation. *Nature* 202:1358-1359.
- McMenemy LS, Hartley SE, MacFarlane SA, Karley AJ, Shepherd T, Johnson SN (2012)** Raspberry viruses manipulate the behaviour of their insect vectors. *Entomol Exp Appl* 144:56-68.
- Mehedi M, Falzarano D, Seebach J, Hu X, Carpenter MS, Schnittler H-J, Feldmann H (2011)** A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* 85:5406-5414.
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR (1984)** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12:7035-7056.

- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, Rivera-Bustamante RF (2003)** Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93:270-277.
- 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.
- Mingot A, Valli A, Rodamilans B, San León D, Baulcombe DC, García JA, López-Moya JJ (2016)** The P1N-PISPO trans-frame gene of sweet potato feathery mottle potyvirus is produced during virus infection and functions as RNA silencing suppressor. *J Virol* 90:3543:3557
- Miralles R, Ferrer R, Solé R V., Moya A, Elena SF (2001)** Multiple infection dynamics has pronounced effects on the fitness of RNA viruses. *J Evol Biol* 14:654-662.
- Morales FJ, Anderson PK (2001)** The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Arch Virol* 146:415-441.
- Morell M, Czihal P, Hoffmann R, Otvos L, Avilés FX, Ventura S (2008)** Monitoring the interference of protein-protein interactions in vivo by bimolecular fluorescence complementation: The DnaK case. *Proteomics* 8:3433-3442.
- Moreno-Delafuente A, Garzo E, Moreno A, Fereres A (2013)** A Plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS One* 8:e61543.
- Moreno A, Palacios I, Blanc S, Fereres A (2005)** Intracellular salivation is the mechanism involved in the inoculation of *Cauliflower mosaic virus* by its major vectors *Brevicoryne brassicae* and *Myzus persicae*. *Ann Entomol Soc Am* 98:763-769.

- Moreno A, Tjallingii WF, Fernandez-Mata G, Fereres A (2012)** Differences in the mechanism of inoculation between a semi-persistent and a non-persistent aphid-transmitted plant virus. *J Gen Virol* 93:662-667.
- Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT (2006)** Interactions between a crinivirus, an ipomovirus and a potyvirus in coinfecting sweet potato plants. *Plant Pathol* 55:458-467.
- Müller CB, Williams IS, Hardie J (2001)** The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecol Entomol* 26:330-340
- Munster M Van, Yvon M, Vile D, Dader B, Fereres A, Blanc S (2017)** Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. *PLoS One* 12:e0174398.
- Murphy JF, Rhoads RE, Hunt AG, Shaw JG (1990)** The VPg of *Tobacco etch virus* RNA is the 49-kDa proteinase or the N-terminal 24-kDa part of the proteinase. *Virology* 178:285-288.
- Nault LR (1997)** Arthropod Transmission of plant viruses: A new synthesis. *Ann Entomol Soc Am* 90:521-541.
- Navas-Castillo J, Fiallo-Olivé E, Sánchez-Campos S (2011)** Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu Rev Phytopathol* 49:219-248.
- Navas-Castillo J, López-Moya JJ, Aranda MA (2014)** Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Ann Appl Biol* 165:155-171
- Ng JCK, Falk BW (2006)** Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44:183-212.
- Ngumbi E, Eigenbrode SD, Bosque-Pérez NA, Ding H, Rodriguez A (2007)** *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-infected potato. *J Chem Ecol* 33:1733-1747.

- Nisbet AJ, Woodford JAT, Strang RHC, Connolly JD (1993)** Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae*. Entomol Exp Appl 68:87-98.
- Oliveira MRV, Henneberry TJ, Anderson P (2001)** History, current status, and collaborative research projects for *Bemisia tabaci*. Crop Prot 20:709-723.
- Olsper A, Chung BY, Atkins JF, Carr JP, Firth AE (2015)** Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. EMBO Rep 16:995-1004.
- Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A, Fereres A (2002)** *Cauliflower mosaic virus* is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. J Gen Virol 83:3163-3171.
- Pasin F, Simón-Mateo C, García JA (2014)** The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. PLoS Pathog 10:e1003985.
- Peters D (1987)** Spread of viruses in potato crops. In: de Bokx JA, van der Want JPH, editors. Viruses of potatoes and seed-potato production. Wageningen, NL: Pudoc. pp. 126-145.
- Picó B, Díez MJ, Nuez F (1996)** Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The *Tomato yellow leaf curl virus*- A review. Sci Hortic (Amsterdam) 67:151-196
- Pirone TP, Blanc S (1996)** Helper-dependent vector transmission of plant viruses. Annu Rev Phytopathol 34:227-247.
- Poolpol P, Inouye T (1986)** Enhancement of *Cucumber mosaic virus* multiplication by *Zucchini yellow mosaic virus* in doubly infected cucumber plants. Ann Phytopathol Soc Jpn 52:22-30.
- Powell G (1991)** Cell membrane punctures during epidermal penetrations by aphids: consequences for the transmission of two potyviruses. Ann Appl Biol 119:313-321.

- Powell G, Pirone T, Hardie J (1995)** Aphid stylet activities during potyvirus acquisition from plants and an in vitro system that correlate with subsequent transmission. *Eur J Plant Pathol* 101:411-420.
- Prado E, Tjallingii WF (1994)** Aphid activities during sieve element punctures. *Entomol Exp Appl* 72:157-165.
- Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Bowman Vance V (1997)** Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9:859-868.
- Pumplin N, Voinnet O (2013)** RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Microbiol* 11:745-760.
- Purcifull D, Hiebert E, Edwardson J (1984)** *Watermelon mosaic virus*. No. 293. In: Description of plant viruses, CMI/AAB, Surrey, England, 7 pp
- Rajabaskar D, Wu Y, Bosque-Pérez NA, Eigenbrode SD (2013)** Dynamics of *Myzus persicae* arrestment by volatiles from *Potato leafroll virus*-infected potato plants during disease progression. *Entomol Exp Appl* 148:172-181.
- Raman KV, Radcliffe EB (1992)** Pest aspects of potato production, Part 2, Insect pests. In: Harris PM, editor. *The Potato Crop: The scientific basis for improvement*, 2nd edn. London: Chapman and Hall. pp. 476-506.
- Ratcliff F (1997)** A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 80-276:1558-1560.
- Ratinier M, Boulant S, Combet C, Targett-Adams P, Mclauchlan J, Lavergne JP (2008)** Transcriptional slippage prompts recoding in alternate reading frames in the *Hepatitis C virus* (HCV) core sequence from strain HCV-1. *J Gen Virol* 89:1569-1578.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992)** Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73:1-16

- Robinson RA (1969)** Disease resistance terminology. *Rev App Mycol* 48: 593-606.
- Rodamilans B, Valli A, Mingot A, San León D, Baulcombe D, López-Moya JJ, García JA (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.
- Roossinck MJ (2015)** Plants, viruses and the environment: Ecology and mutualism. *Virology* 479-480:271-277.
- Rubio Huertos M, López-Abella D (1966)** Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas. *Microbiología Española*:19, 77-86.
- Ruiz-Ferrer V, Voinnet O (2009)** Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu Rev Plant Biol* 60:485-510.
- Russell GE (1978)** Plant breeding for pest and disease resistance. Butterworth, London, England, 485 pp.
- Saldaña J, Elena SF, Solé R V. (2003)** Coinfection and superinfection in RNA virus populations: A selection-mutation model. *Math Biosci* 183:135-160.
- Salvaudon L, De Moraes CM, Mescher MC (2013)** Outcomes of coinfection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies. *Proc R Soc B Biol Sci* 280:20122959-20122959.
- Sanfaçon H (2015)** Plant translation factors and virus Resistance. *Viruses*. 7:3392-419.
- Sano Y, Kojima M (1989)** Increase in *Cucumber mosaic virus* concentration in Japanese radish plants co-infected with *Turnip mosaic virus*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 55:296-302.
- Sarria E, Cid M, Garzo E, Fereres A (2009)** Excel Workbook for automatic parameter calculation of EPG data. *Comput Electron Agric* 67:35-42.

- Saunders NA (2004)** Real-time PCR. *Methods Mol Biol* 266:191-211.
- Schaad MC, Anderberg RJ, Carrington JC (2000)** Strain-specific interaction of the *Tobacco etch virus* NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273:300-306.
- Scholthof HB (2005)** Plant virus transport: Motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci* 10:376-382.
- Scholthof KBG, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD (2011)** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938-954.
- Seddas P, Boissinot S, Strub JM, Van Dorsseleer A, Van Regenmortel MHV, Pattus F (2004)** Rack-1, GAPDH3, and actin: Proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* 325:399-412.
- Shadmany M, Omar D, Muhamad R (2013)** First report of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotype Q in Malaysia. *Florida Entomologist* 96:280-282.
- Shi Y, Chen J, Hong X, Chen J, Adams MJ (2007)** A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Mol Plant Pathol* 8:785-790.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994)** *The Potyviridae*, CAB International, Wallingford, 448 pp.
- Sikorski RS, Hieter P (1989)** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27.
- Spiller NJ, Koenders L, Tjallingii WF (1990)** Xylem ingestion by aphids – a strategy for maintaining water balance. *Entomol Exp Appl* 55:101-104.

- Srinivasan R, Alvarez JM, Cervantes F (2013)** The effect of an alternate weed host, hairy nightshade, *Solanum sarrachoides* (Sendtner) on green peach aphid distribution and *Potato leafroll virus* incidence in potato fields of the Pacific Northwest. *Crop Prot* 46:52-56.
- Stafford CA, Walker GP, Ullman DE (2011)** Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci* 108:9350-9355.
- Sufrin-Ringwald T, Lapidot M (2011)** Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: *Squash leaf curl virus* and *Watermelon chlorotic stunt virus*. *Phytopathology* 101:281-289.
- Syller J (2012)** Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol Plant Pathol* 13:204-216.
- Takeshita M, Koizumi E, Noguchi M, Sueda K, Shimura H, Ishikawa N, Matsuura H, Ohshima K, Natsuaki T, Kuwata S, Furuya N, Tsuchiya K, Masuta C (2012)** Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between *Cucumber mosaic virus* and *Turnip mosaic virus*. *Mol Plant Microbe Interact* 25:18-27.
- Tena Fernández F, González I, Doblas P, Rodríguez C, Sahana N, Kaur H, Tenllado F, Praveen S, Canto T (2013)** The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of *Potato virus Y* helper-component proteinase (HCPPro) in heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Mol Plant Pathol* 14:530-541.
- Thivierge K, Cotton S, Dufresne PJ, Mathieu I, Beauchemin C, Ide C, Fortin MG, Laliberté JF (2008)** Eukaryotic elongation factor 1A interacts with *Turnip mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* 377:216-225.
- Tian T, Rubio L, Yeh HH, Crawford B, Falk BW (1999)** *Lettuce infectious yellows virus*: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol* 80:1111-7.

- Tjallingii WF (1985)** Membrane potentials as an indication for plant cell penetration by aphid stylets. *Entomol Exp Appl* 38:187-193.
- Tjallingii WF (1987)** Stylet penetration activities by aphids: New correlations with electrical penetration graphs. In: *Insect-Plants*. Ed. Labeyrie V, Fabres G, Lachaise, D Junk, Dordrecht. pp. 301-306.
- Tjallingii WF (1978)** Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomol Exp Appl* 24:721-730.
- Tripathi S, Suzuki JY, Ferreira SA, Gonsalves D (2008)** *Papaya ringspot virus-P*: Characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. *Mol Plant Pathol* 9:269-280.
- Truniger V, Aranda MA. (2009)** Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res.* 75:119-59.
- Tugume AK, Amayo R, Weinheimer I, Mukasa SB, Rubaihayo PR, Valkonen JPT (2013)** Genetic variability and evolutionary implications of RNA silencing suppressor genes in RNA1 of *Sweet potato chlorotic stunt virus* isolates infecting sweetpotato and related wild species. *PLoS One* 8:e81479.
- Tzanetakis IE, Martin RR, Wintermantel WM (2013)** Epidemiology of criniviruses: An emerging problem in world agriculture. *Front. Microbiol.* 4:119.
- Untiveros M, Fuentes S, Salazar LF (2007)** Synergistic interaction of *Sweet potato chlorotic stunt virus* (crinivirus) with Carla-, Cucumo-, Ipomo-, and Potyviruses infecting sweet potato. *Plant Dis* 91:669-676.
- Untiveros M, Olsper A, Artola K, Firth AE, Kreuze JF, Valkonen JPT (2016)** A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Mol Plant Pathol* 17:1111-1123.

- USDA-ARS 2010.** National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network. (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars.grin.gov/cgi.bin/npgs/html/taxon>
- Vaghchhipawala ZE, Mysore KS (2008)** Agroinoculation: A simple procedure for systemic infection of plants with viruses. *Methods Mol Biol* 451:555-562.
- Valli A, Dujovny G, García JA (2008)** Protease activity, self-interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus. *J Virol* 82:974-86.
- Valli A, García JA, López-Moya JJ (2015)** *Potyviridae*. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. pp 1-10
- Valli A, Gallo A, Rodamilans B, López-Moya JJ, García JA (2017)** The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have. *Mol Plant Pathol* Epub, ahead of print.
- Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA (2006)** RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber veing yellowing ipomovirus, a member of the family *Potyviridae* that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* 80:10055-63.
- Van Poecke RMP, Dicke M (2004)** Indirect defence of plants against herbivores: Using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Biol*. 6:387-401
- Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Ming SX (1995)** 5' proximal potyviral sequences mediate *Potato virus X*/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. *Virology* 206:583–590.
- Vance V, Vaucheret H (2001)** RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science* 292:2277-2280

- Várallyay E, Havelda Z (2013)** Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol Plant Pathol* 14:567-575.
- Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA (2012)** Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog* 8:e1002639.
- Voinnet O (2008)** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends Plant Sci* 13:317-328.
- Vucetic A, Dahlin I, Petrovic-Obradovic O, Glinwood R, Webster B, Ninkovic V (2014)** Volatile interaction between undamaged plants affects tritrophic interactions through changed plant volatile emission. *Plant Signal Behav* 9:e29517.
- Wang J, Turina M, Medina V, Falk BW (2009)** Synergistic interaction between the Potyvirus, *Turnip mosaic virus* and the Crinivirus, *Lettuce infectious yellows virus* in plants and protoplasts. *Virus Res* 144:163-170.
- Wang RY, Pirone TP (1999)** Purification and characterization of *Turnip mosaic virus* helper component protein. *Phytopathology* 89:564-567.
- Wang Y, Gaba V, Yang J, Palukaitis P, Gal-On A (2002)** Characterization of synergy between *Cucumber mosaic virus* and potyviruses in cucurbit hosts. *Phytopathology* 92:51-58.
- Webb RE, Scott HA (1965)** Isolation and identification of *Watermelon mosaic virus* 1 and 2. *Phytopathology* 55: 895–900
- Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD, Zhou X, Carrington JC, Wang A (2010)** Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6:e1000962.

- Wen RH, Hajimorad MR (2010)** Mutational analysis of the putative pipo of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400:1-7.
- White KA (2015)** The polymerase slips and PIPO exists. *EMBO Rep* 16:e201540871.
- Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D (2015)** Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480:278-289.
- Whitfield AE, Rotenberg D (2015)** Disruption of insect transmission of plant viruses. *Curr Opin Insect Sci* 8:79-87.
- Wintermantel WM, Cortez AA, Anchieta AG, Gulati-Sakhuja A, Hladky LL (2008)** Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathology* 98:1340-1345.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberté JF (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 SJ, Adams M, Chalam C, Kreuze J, López-Moya JJ, Ohshima K, Praveen S, Rabenstein F, Stenger D, Wang A, Zerbini FM, Ictv Report Consortium (2017)** ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J Gen Virol* 98:352-354.
- Xiang DL, Bao PZ, Xiao XZ, Jian MZ (2005)** Impact of transgenic cotton plants on a non-target pest, *Aphis gossypii* Glover. *Ecol Entomol* 30:307-315.
- Xiong R, Wu J, Zhou Y, Zhou X (2009)** Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by Rice stripe tenuivirus. *Virology* 387:29-40.

- Xu H, He X, Zheng X, Yang Y, Tian J, Lu Z (2014)** *Southern rice black-streaked dwarf virus* (SRBSDV) directly affects the feeding and reproduction behavior of its vector, *Sogatella furcifera* (Horváth) (Hemiptera: Delphacidae). *Virology* 11:55.
- Zapata M, Cabrera P, Bañón S, Roth P (1989)** *El melón*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 174pp.









