TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA
Y DE BIOSISTEMAS

Host range and transmission pathways as drivers of virus infection patterns in a heterogeneous ecosystem

DOCTORAL THESIS

ADRIAN DĂNUȚ ZAMFIR VELEA

M.Sc. in Crop Sciences – Plant Nutrition and Protection

2023

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

"Host range and transmission pathways as drivers of virus infection patterns in a heterogeneous ecosystem".

DOCTORANDO: Adrian Dănuţ Zamfir Velea

PROGRAMA DE DOCTORADO: "Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas y Microorganismos Asociados" de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

DIRECTOR: Dr. Fernando García-Arenal Rodríguez, Profesor Emérito de la Universidad Politécnica de Madrid.

CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION: Esta tesis doctoral se ha realizado en el grupo de "Interacción y coevolución planta-virus" del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC. Ha sido financiada con el proyecto RTI2018-094302-B-I00. El doctorando ha disfrutado también de un contrato financiado por las Acciones Marie Skłodowska-Curie (convenio de subvención N.º 813542T, INEXTVIR).

FECHA Y LUGAR DE LECTURA: 16 de enero de 2024. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA/CSIC.

COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL: Dra. Soledad Sacristán Benayas (Presidente), Dr. Jesús Israel Pagán Muñoz (Secretario), Dr. Miguel Ángel Aranda Regules (Vocal), Dr. Fernando Escriu Paradell (Vocal) y Dr. Denis Fargette (Vocal).

CALIFICACIÓN: Sobresaliente *cum laude*.

RESUMEN

Las enfermedades virales en plantas constituyen una amenaza significativa para la seguridad alimentaria, la economía y la dinámica de los ecosistemas, al disminuir la productividad de los cultivos y alterar las comunidades vegetales. La emergencia viral resulta de interacciones complejas entre factores ecológicos y evolutivos que promueven la adaptación a nuevos huéspedes. La gama de huéspedes de un virus es clave para comprender su emergencia y está influenciada tanto por las características genéticas del virus como por factores ecológicos. Aunque se ha investigado ampliamente el papel de los factores genéticos en la especificidad de la infección, el conocimiento sobre los factores ecológicos es limitado, en particular en comunidades de plantas silvestres. Los avances recientes en secuenciación de alto rendimiento (HTS) han permitido una

identificación más precisa de las comunidades virales y sus interacciones en diversos ecosistemas vegetales. La finalidad general de esta tesis doctoral consistió en lograr una mejor comprensión de las dinámicas de transmisión de virus en ecosistemas agrarios, y cómo afecta al uso de huéspedes y al ensamblaje de las comunidades de virus. Este objetivo general se abordó mediante el análisis de doce virus pertenecientes a siete géneros virales, y que muestran diferentes modos de transmisión, en cuatro hábitats distintos (Cultivos, Lindes, Encinares y Eriales) pertenecientes a un ecosistema agrícola heterogéneo.

La estimación de la gama de huéspedes de estos doce virus focales se llevó a cabo en base a los resultados de detección en las bibliotecas de HTS usando un método de dos pasos que llamamos HTS2C. La gama de huéspedes se validó posteriormente mediante ensayos por RT-PCR que permitieron también estimar la incidencia. Se observó que la distribución de los huéspedes de los virus en función del hábitat es específica. Mientras que la mayoría de los virus transmitidos por contacto presentaron un número similar de huéspedes en los cuatro hábitats, los virus transmitidos por pulgones de forma persistente, o por polen, tuvieron su máxima gama de huéspedes en las Lindes. Los análisis de agrupación jerárquica de los huéspedes de cada virus revelaron que las gamas de huéspedes no se agrupan según la taxonomía de los virus, lo que indica la relevancia de factores extrínsecos al virus en su determinación (**Figura 1**). Los análisis de redes de infección virus-planta revelaron una estructura mixta anidada y modular, poniendo de manifiesto una estructura espacial de las interacciones virus-planta, con módulos de interacción que se corresponden con el hábitat (**Figura 2**). Además, un análisis más detallado de los módulos permitió identificar los huéspedes preferidos de cada especie de virus, que se encuentran mayoritariamente en las Lindes. Este resultado, junto a la asimetría de la distribución de la gama de huéspedes de los virus transmitidos por pulgones y polen, indica que las Lindes contienen comunidades de plantas que son un reservorio de virus para los cultivos y los demás hábitats.

Al estimar la incidencia de los virus en extractos de ARN de muestras individuales de plantas, se encontró que cada especie de virus generalista presenta un patrón de infección preferencial y específico. Además, los conjuntos de huéspedes preferenciales de cada virus dependen del hábitat, estos virus se comportan como generalistas facultativos que usan sus huéspedes potenciales en función de su disponibilidad en la comunidad de plantas. Los análisis de regresión de los factores que determinan la incidencia indicaron un papel del género de los virus, es decir de su historia evolutiva, y del modo de transmisión, pero en casi todos los análisis el hábitat explicaba un porcentaje elevado de la varianza de la incidencia, subrayando la importancia de los factores

ecológicos. Además, la matriz de las interacciones virus-planta según detecciones por RT-PCR permitió obtener patrones de coocurrencia y coinfección. Se observó que la coinfección por virus es común en este ecosistema, y que está asociada a su modo de transmisión. En base a los datos de HTS se estudió la diversidad genética, y se observó que las poblaciones de los virus analizados no estaban estructuradas según el hábitat ni el huésped, lo que no apoya la adaptación al huésped ni que en la determinación de la gama de huéspedes tengan un papel fuertes compromisos de adaptación entre huéspedes. Por tanto, estos resultados apoyan la teoría del ajuste ecológico en la determinación de las gamas de huéspedes observadas de los virus analizados, todos ellos transmitidos por contacto.

En conclusión, los resultados de esta tesis evidencian la plasticidad de la gama de huéspedes de los virus de plantas y cómo está modelada por factores genéticos y ecológicos. Se destaca el papel de las Lindes como reservorios de virus y la prevalencia de coinfecciones en el ecosistema estudiado. La plasticidad fenotípica de los virus podría facilitar los saltos de huésped y, por ende, ser un precursor de la emergencia viral. Esta investigación subraya la complejidad de las interacciones virus-planta y la necesidad de considerar tanto factores genéticos como ecológicos para comprender y manejar la emergencia y propagación de enfermedades virales en plantas.

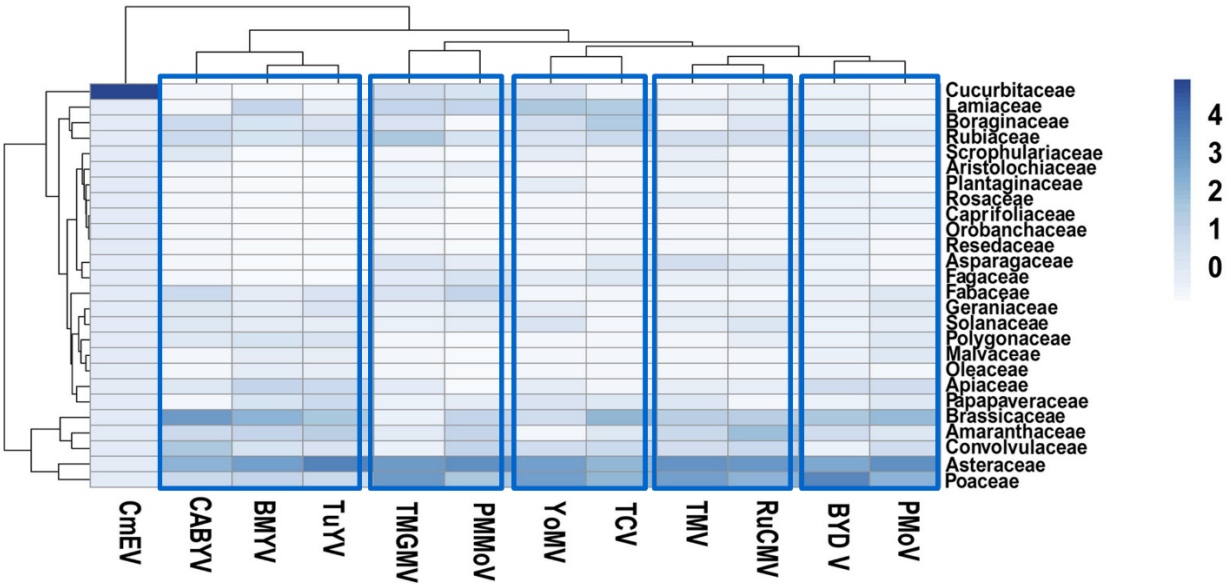

Figura 1. Agrupación jerárquica normalizada de las gamas de huéspedes de los virus analizados utilizados para inferir patrones en el uso de huéspedes en base a los datos de RT-PCR. El mapa de calor se generó a partir de una matriz del número de especies infectadas por familia en las gamas de huéspedes de cada virus. El acrónimo de cada

especie de virus analizado es el siguiente: *Cucumis melo alphaendornavirus* (CmEV); *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV); *Beet mild yellowing virus* (BMYV); *Turnip yellows virus* (TuYV); *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV); *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); *Youcai mosaic virus* (YoMV); *Turnip crinkle virus* (TCV); *Tobacco mosaic virus* (TMV); *Rubus chlorotic mottle virus* (RuCMV); *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) y *Parietaria mottle virus* (PMoV).

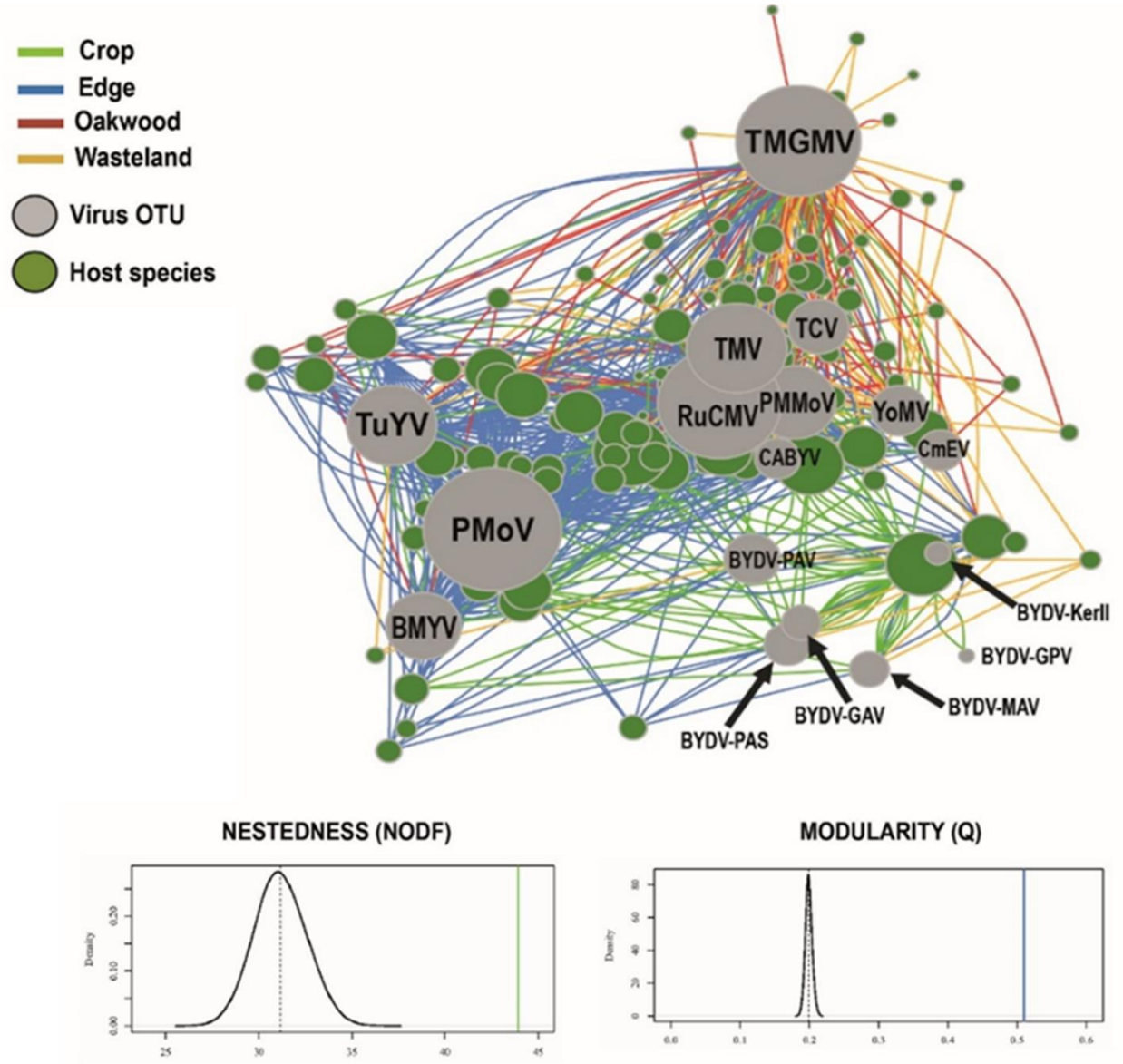

Figura 2. Red de interacción planta-virus a escala de hábitat. Los nodos grises representan UTOs virales (n = 17), detectados según los criterios de selección del HTS2C. Los nodos verdes representan las especies de huésped (n = 106). El tamaño de los nodos es proporcional al número de enlaces. Los enlaces están coloreados según el hábitat, Cultivos, Lindes, Encinares y Eriales, en el que se produjeron las interacciones. Los nodos de los virus se indican mediante sus acrónimos: *Cucumis melo alphaendornavirus* (CmEV); *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV); *Beet mild yellowing virus* (BMYV); *Turnip yellows virus* (TuYV); *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV); *Pepper mild mottle virus* (PMMoV); *Youcai mosaic virus* (YoMV); *Turnip crinkle virus* (TCV); *Tobacco mosaic virus* (TMV); *Rubus chlorotic mottle virus* (RuCMV); *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) y *Parietaria mottle virus* (PMoV).

Publicaciones derivadas de este trabajo:

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis han sido publicados en revistas indexadas (SCI, Science Citation Index):

- McLeish, M.J., **Zamfir, A.D.**, Babalola, B.M., Peláez, A., Fraile, A., García-Arenal, F. (2022). Metagenomics show high spatiotemporal virus diversity and ecological compartmentalisation: Virus infections of melon, *Cucumis melo*, crops, and adjacent wild communities. Virus Evolution 8, veac095. https://doi.org/10.1093/ve/veac095.
- **Zamfir, A.D.**, Babalola, B.M., Fraile, A., McLeish, M., Garcia-Arenal, F. (2023). Tobamoviruses show broad host ranges and little genetic diversity among four habitat types of a heterogeneous ecosystem. Phytopathology 113 (*9*), 1697-1707. https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-22-0439-V.

Otras publicaciones en revistas SCI indirectamente relacionadas con la tesis doctoral:

- de Andrés-Torán, R., Guidoum, L., **Zamfir, A.D.**, Mora, M.Á., Moreno-Vázquez, S., García-Arenal, F. (2023). Tobacco Mild Green Mosaic Virus (TMGMV) Isolates from Different Plant Families Show No Evidence of Differential Adaptation to Their Host of Origin. Viruses 15 (*12*), 2384. https://doi.org/10.3390/v15122384.