

# TESIS DOCTORAL

## TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

**“Emerging viruses infecting solanaceous crops: genetic characterization of the pepper vein yellows virus complex and generation of tomato chlorosis virus infectious clones”.**

**DOCTORANDA:** Elisa Navas Hermosilla

**PROGRAMA DE DOCTORADO:** Programa de Doctorado en Biotecnología Avanzada (UMA)

**DIRECTORES:** Jesús Navas Castillo (IHSM La Mayora, CSIC), Elvira Fiallo Olivé (IHSM La Mayora, CSIC).

**CENTRO DE TRABAJO Y FINANCIACION:** Tesis Doctoral realizada en el grupo Interacción entre Virus de Plantas e Insectos Vectores del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea La Mayora (IHSM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas. La financiación procedía de un Contrato Predoctoral para la Formación de Doctores del Ministerio de Economía y Competitividad en el marco de los proyectos del Plan Nacional de I+D+i AGL2013-48913-C2-1-R y AGL2016-75819-C2-2-R.

**FECHA Y LUGAR DE LECTURA:** 22 de septiembre de 2023. Salón de Actos del IHSM La Mayora, Algarrobo-Costa, Málaga.

**COMPOSICIÓN DEL TRIBUNAL:** Carmelo López del Rincón (Presidente), Juan Antonio Díaz Pendón (Secretario), Luis Rubio Miguélez (Vocal).

**CALIFICACIÓN:** Sobresaliente *cum laude*.

## RESUMEN:

Los virus de plantas causan pérdidas económicas significativas y, a diferencia de los hongos y otros patógenos, no existen agentes antivirales directos disponibles para su control. La multitud de virus que infectan a las plantas es un factor crítico que limita la agricultura a nivel mundial, especialmente en los países menos desarrollados. Los insectos vectores desempeñan un papel crucial en las epidemias virales de plantas al introducir nuevos virus en el medio ambiente. Entre estos vectores, los pulgones, los cicadélidos y las moscas blancas son los principales transmisores.

En los últimos años, se ha observado la aparición de síntomas de amarilleo de venas y enrollamiento de hojas en los cultivos de pimientos asociados con la presencia de polerovirus (género *Polerovirus*, familia *Solemoviridae*) en muchos países de todo el mundo. España fue el primer país europeo donde se informó sobre la enfermedad del amarilleo del pimiento. De manera similar, el virus del amarilleo del tomate (ToCV, género *Crinivirus*, familia *Closteroviridae*) es un patógeno emergente de plantas que posee un genoma bipartito de ARN de cadena sencilla de polaridad positiva encapsidado en viriones largos y flexuosos. ToCV

está limitado al floema, se transmite por moscas blancas y causa clorosis interveinal y necrosis en las hojas inferiores de las plantas de tomate, lo que resulta en reducción del vigor y rendimiento de frutos.

En la presente tesis se ha secuenciado un aislado de polerovirus de España que infecta pimientos y demostramos su transmisión por el pulgón *Aphis gossypii*. Comparamos el genoma del aislado español con aislados de Japón, Israel, China y Australia. El aislado español exhibió la organización típica de los polerovirus, que comprende siete marcos de lectura abiertos (ORF0 a ORF5 y ORF3a), que putativamente codifican las proteínas P0 a P5 y P3a. La comparación de esta secuencia con las cuatro secuencias completas disponibles para los polerovirus que infectan pimientos, de Japón, Israel, China y Australia, reveló una relación más cercana con el aislado israelí, lo que sugiere la existencia de un complejo con al menos cinco especies de polerovirus. Considerando la similitud de los síntomas causados por todos los polerovirus de pimiento descritos, proponemos nombrarlos pepper vein yellows virus 1 a pepper vein yellows virus 5 (PeVYV-1 a PeVYV-5), siendo PeVYV-5 el polerovirus de España descrito en esta tesis. Nuestros resultados, junto con hallazgos previamente publicados, resaltan la alta complejidad de los polerovirus emergentes que amenazan los cultivos de pimiento en todo el mundo debido a eventos de recombinación.

La disponibilidad de clones infectivos de virus es indispensable para llevar a cabo estudios de genética reversa. En el caso de los miembros de la familia *Closteroviridae*, el tamaño y complejidad de sus genomas ha dificultado esta tarea. En esta tesis hemos abordado la mejora de la infectividad de los clones infectivos de ToCV (aislado AT80/99-IC de España) previamente desarrollados. Esto se ha llevado a cabo incorporando el ribozima del virus de la hepatitis delta fusionado a los extremos 3' de ambos componentes del genoma de ToCV, ARN1 y ARN2. La inclusión del ribozima resultó en una progenie viral con extremos 3' del ARN1 más similares a los presentes en el clon utilizado para la agroinoculación. Aunque estos clones, al igual que los clones originales, no pudieron infectar directamente las plantas de tomate mediante agroinoculación, su infectividad en plantas de *Nicotiana benthamiana* aumentó en promedio un 100%.

Las moléculas de ARN que constituyen el genoma de ToCV están encapsidadas individualmente en partículas flexuosas con una estructura distintiva caracterizada por un "cuerpo" largo y una "cola" corta. El cuerpo del virión consiste en la proteína de la cápsida principal (CP), mientras que la cola contiene la proteína menor de la cápsida (CPm). El gen que codifica la proteína CPm se originó a partir de la duplicación y divergencia del gen que codifica la proteína CP. Se cree que la CPm de los crinivirus es crucial para la transmisión por las moscas blancas. Basándonos en la información disponible, hipotetizamos que el determinante de la transmisión dual de los crinivirus por miembros de los géneros de mosca blanca *Bemisia* y *Trialeurodes* se encuentra en la proteína CPm. Para investigar este aspecto de la biología de ToCV, se llevó a cabo un análisis *in silico* comparando las CPm de todos los crinivirus caracterizados hasta la fecha. El análisis reveló una región central de la proteína CPm exclusiva de los crinivirus transmitidos por *Trialeurodes vaporariorum*, ausente en los crinivirus transmitidos solamente por *Bemisia tabaci*. Posteriormente, utilizando el sistema de clones infectivos de ToCV, generamos un conjunto de mutantes de delección dirigidos a la región central de la CPm y sus subregiones. Cuatro de los cinco mutantes de delección fueron infectivos cuando se agroinocularon en plantas de *N. benthamiana*. La disponibilidad de estos clones infectivos del ARN2 de ToCV sientan las bases para investigaciones futuras que elucidarán el papel de regiones específicas de la CPm en la transmisión por diferentes especies de mosca blanca.



**La doctoranda, los miembros del tribunal y directores después de la defensa de la tesis.** De izquierda a derecha: Carmelo López del Rincón (Presidente), Elvira Fiallo Olivé (Codirectora), Elisa Navas Hermosilla (Doctoranda), Jesús Navas Castillo (Codirector), Juan Antonio Díaz Pendón (Secretario) y Luis Rubio Miguélez (Vocal).

**Trabajos derivados de la Tesis que ya han sido publicados:**

- Fiallo-Olivé E, Navas-Hermosilla E, Ferro CG, Zerbini FM, Navas-Castillo J (2018) Evidence for a complex of emergent poleroviruses affecting pepper worldwide. *Archives of Virology* 163: 1171-1178.
- Navas-Hermosilla E, Fiallo-Olivé E, Navas-Castillo J (2021) Infectious clones of tomato chlorosis virus: Toward increasing efficiency by introducing the hepatitis delta virus ribozyme. *Frontiers in Microbiology* 12: 1-9.