



EVOLUCIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE EN PRESENCIA DEL ALELO DE TOLERANCIA *Ty-1*

Guillermo Domínguez Huerta

Directores:

Dra. Ana Grande Pérez

Dr. Jesús Navas Castillo



Universidad de Málaga
2015





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Guillermo Domínguez Huerta

 <http://orcid.org/0000-0001-9799-6139>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

TESIS DOCTORAL

Evolución de los begomovirus del rizado amarillo del tomate en presencia del alelo de tolerancia *Ty-1*.

Guillermo Domínguez Huerta

Directores:

Ana Grande Pérez

Jesús Navas Castillo



Málaga 2015



La Dra. Ana Grande Pérez, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

INFORMA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Evolución de los begomovirus del rizado amarillo del tomate en presencia del alelo de tolerancia *Ty-1*” que presenta Guillermo Domínguez Huerta para optar al grado de Doctor en Biología, se ha realizado en el Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC) bajo mi dirección y, considerando que se ha concluido, autorizo su presentación para que pueda ser evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente informe.

Fdo.: Ana Grande Pérez

Málaga, 7 de noviembre de 2015

Jesús Navas Castillo, Doctor en Ciencias Biológicas, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Profesor Asociado del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga,

INFORMA que el licenciado **Guillermo Domínguez Huerta** ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Virología del Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), bajo su dirección, el trabajo con el título “Evolución de los begomovirus del rizado amarillo del tomate en presencia del alelo de tolerancia *Ty-1*” se presenta en esta memoria y que constituye su Tesis Doctoral para aspirar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste y tenga los efectos que correspondan en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente informe en Algarrobo-Costa (Málaga) el 2 de noviembre de 2015.

TRIBUNAL DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Presidente

Dr. Eduardo Rodríguez Bejarano

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Universidad de Málaga

Vocales

Dra. Araceli Castillo Garriga

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Universidad de Málaga

Dr. Juan Antonio Díaz Pendón

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga

Dr. Pedro Gómez López

Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Murcia

Dra. Susana García Andrés

Estación El Ejido, Monsanto

Almería

Suplentes

Dr. Enrique Moriones Alonso

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”

(IHSM-UMA-CSIC)

Málaga

Dr. Guillermo Thode Mayoral

Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología

Universidad de Málaga

El trabajo recogido en la siguiente memoria se ha llevado a cabo en el Laboratorio Virología de la Estación Experimental “La Mayora”, integrada en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-CSIC-UMA), bajo la dirección de los doctores Ana Grande Pérez y Jesús Navas Castillo.

El trabajo de investigación ha sido financiado por el proyecto P09-CVI-5428 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía y el proyecto AGL2010-22287-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación y Ministerio de Economía y Competitividad con participación el FEDER y FSE.

Guillermo Domínguez Huerta ha disfrutado de una beca-contrato JAE predoctoral del CSIC.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido enviados para su publicación en la revista Journal of Virology:

Sánchez-Campos, S., **Domínguez-Huerta, G.**, Tomás, D.T., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Grande-Pérez, A. Begomoviruses adapt to plant hosts maintaining their consensus sequences.

Y presentados en las reuniones científicas:

XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. 2010. Vitoria.

XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Virología. 2011. Granada.

XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología. 2012. Málaga.

XIII Congreso Nacional de Virología. 2015. Madrid.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN/ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	
I. Los virus como patógenos de plantas	11
II. Variabilidad genética y evolución de virus	13
II.1. Fuentes de la variación genética	17
II.1.1. La mutación	17
II.1.2. La recombinación	21
II.1.3. El intercambio de componentes genómicos	23
II.2. Las fuerzas que determinan la estructura genética de las poblaciones virales	23
II.2.1. La deriva genética	23
II.2.2. La selección	24
II.2.3. La migración	25
III. El control de las enfermedades virales. El uso de la resistencia genética.	25
III.1. La resistencia genética natural	28
III.2. La herencia de la resistencia	28
III.3. La resistencia por ingeniería genética	29
III.4. Los mecanismos de la resistencia	30
III.5. La durabilidad de la resistencia	37
IV. El complejo de virus asociados de la enfermedad del rizado amarillo del tomate	39
IV.1. Los geminivirus: características, taxonomía y organización genómica	40
IV.2. Características biológicas de los begomovirus asociados a TYLCD	43
IV.2.1. Síntomas de TYLCD en tomate	43
IV.2.2. Gama de huéspedes de begomovirus asociados a TYLCD	44
IV.2.3. Transmisión	44
IV.3. Organización genómica y funciones génicas de los begomovirus asociados a TYLCD	45
IV.4. Replicación de los begomovirus asociados a TYLCD	48
IV.5. Diversidad genética y evolución de las poblaciones de virus asociados a TYLCD	50
IV.6. Control de begomovirus asociados a TYLCD	51
IV.6.1. Resistencia genética natural	51
IV.6.2. Resistencia genética transgénica	52
OBJETIVOS	57

CAPÍTULO 1

ESTUDIO DE LA ADAPTACIÓN A DISTINTOS HUÉSPEDES DE BEGOMOVIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE

1.1. Antecedentes	61
1.2. Materiales y métodos	64
1.2.1. Plantas, fuente de virus e inoculación viral	64
1.2.2. Extracción de ácidos nucleicos, amplificación del virus, clonación y secuenciación.	65
1.2.3. Análisis de secuencias	70
1.2.4. Determinación de la eficacia biológica viral	71
1.2.5. Análisis estadístico	72
1.3. Resultados	73
1.3.1. Cinética de la carga viral y eficacia biológica absoluta	73
1.3.2. Caracterización genética de los espectros de mutantes	76
1.3.4. El espacio de secuencia	82
1.3.3. Dirección de las fuerzas selectivas en el genoma	84
1.3.5. Tipos de mutación	87
1.4. Discusión	91

CAPÍTULO 2

EVOLUCIÓN DE TYLCV Y TYLCSV EN INFECCIONES MIXTAS EN PRESENCIA DEL ALELO *Ty-1*

2.1. Antecedentes	103
2.2. Materiales y métodos	105
2.2.1. Material vegetal e inoculación con clones virales infectivos	105
2.2.2. Clonación y secuenciación de genomas virales.	106
2.2.3. Análisis de secuencias	107
2.2.4. Análisis estadístico	107
2.3. Resultados	108
2.3.1. Caracterización de genomas virales recombinantes en infecciones mixtas	108
2.3.2. Identificación y caracterización de genomas defectivos	118
2.4. Discusión	126

CAPÍTULO 3

BÚSQUEDA DE LOS DETERMINANTES MOLECULARES RESPONSABLES DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DIFERENCIAL DE LOS BEGOMOVIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE FRENTE AL ALELO DE TOLERANCIA *Ty-1*

3.1. Antecedentes	137
3.2. Materiales y métodos	139
3.2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo	139
3.2.2. Inoculación viral	139
3.2.3. Quimeras virales	139

3.2.4. Mutantes deficientes en la proteína C4	142
3.2.5. Extracciones de ácidos nucleicos totales	142
3.2.6. Detección viral	143
3.2.7. Estimación de la virulencia	145
3.2.8. Estimación de la carga viral por qPCR	145
3.2.9. Análisis estadístico	145
3.3. Resultados	146
3.3.1. Quimeras virales derivadas de TYLCV-Mld y TYLCSV-ES	146
3.3.2. Quimeras derivadas de las cepas Mld e IL de TYLCV	153
3.3.3. Mutantes de begomovirus deficiente en C4	154
3.4. Discusión	156

CAPÍTULO 4

DURABILIDAD DE LA TOLERANCIA ASOCIADA AL ALELO Ty-1 FRENTE A UN INCREMENTO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS BEGOMOVIRUS DEL RIZADO AMARILLO DEL TOMATE

4.1. Antecedentes	165
4.2. Materiales y métodos	167
4.2.1. Plantas, cultivo, fuentes de virus e inoculación viral	167
4.2.2. Tratamiento con el análogo de base	168
4.2.3. Mutagénesis aleatoria mediante la amplificación por círculo rodante y elaboración de la mutateca de TYLCV	168
4.2.4. Método de injerto	170
4.2.5. Extracción de ácidos nucleicos, amplificación, clonación y secuenciación	170
4.2.6. Análisis de secuencias	171
4.2.7. Análisis estadísticos	172
4.3. Resultados	173
4.3.1. Actividad mutagénica in planta del 5-FU sobre los begomovirus TYLCV y TYLCSV	173
4.3.2. Durabilidad de la tolerancia asociada al alelo Ty-1 frente a la mutagénesis química del 5-FU en los begomovirus TYLCSV y TYLCV	185
4.3.3. Producción de una mutateca de TYLCV mediante epRCA	187
4.3.4. Tolerancia asociada al alelo Ty-1 frente a la mutateca de TYLCV	198
4.4. Discusión	202

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Esta tesis ha tenido como objetivo profundizar en el estudio de la evolución de los begomovirus asociados a la enfermedad del rizado amarillo del tomate (TYLCD) en algunos de sus huéspedes. La TYLCD está causada por un complejo de especies virales pertenecientes al género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*) y ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en tomate en numerosos países donde se encuentra difundido el insecto vector de los begomovirus, la mosca blanca *Bemisia tabaci*. La resistencia genética más explotada como estrategia de control es la proporcionada por el gen de tolerancia *Ty-1*, proveniente de *Solanum chilense*. Debido al uso extensivo de esta fuente de resistencia, el trabajo de la presente tesis hace énfasis en la evolución de estos begomovirus en tomate tolerante portador de este gen.

En primer lugar, se ha estudiado la evolución de las cuasiespecies de los begomovirus más relevantes en España [tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) y tomato yellow leaf curl Málaga virus (TYLCMaV)] tras la inoculación de sus clones infectivos en dos especies hortícolas (tomate con o sin el alelo de tolerancia *Ty-1* y *Phaseolus vulgaris*) y un reservorio silvestre (*Solanum nigrum*). Los resultados indicaron que el alelo *Ty-1* disminuyó en tomate la eficacia biológica de TYLCSV y TYLCV (permitiendo una acumulación estable de TYLCMaV) y que ésta fue inferior a la alcanzada en *P. vulgaris* y *S. nigrum*. La complejidad y heterogeneidad genéticas de los espectros de mutantes de las regiones Rep, C4, IR, V2 y CP fue comparable a la encontrada para virus de RNA y fue superior en *P. vulgaris* y *S. nigrum*. La adaptación a los distintos huéspedes, medida como cambios en la eficacia biológica, tuvo lugar sin variación de la secuencia consenso, a pesar de alta complejidad y heterogeneidad de las cuasiespecies virales en todos los huéspedes. En segundo lugar, se estudió la evolución de la cuasiespecie viral en coinfecciones prolongadas de TYLCV y TYLCSV en tomate con o sin el alelo *Ty-1*. La progenie resultante a los 421 dpi presentó una alta frecuencia de genomas virales recombinantes, en muchos casos con más de dos puntos de recombinación. Sólo en ausencia del alelo *Ty-1*, se han detectado genomas defectivos de diversos tamaños formados por deleciones, repeticiones, inversiones y translocaciones a partir de los virus parentales. En tercer lugar, para localizar los determinantes moleculares de distintos aislados de begomovirus asociados a TYLCD que dan cuenta del comportamiento biológico diferencial en tomate con el alelo *Ty-1*, se emplearon clones infectivos de virus quiméricos y mutantes. Los resultados reflejaron que la diferencia

de acumulación entre TYLCV-MId y TYLCSV-ES en tomate tolerante reside en las regiones genómicas Rep, C4 e IR, probablemente debido a la actividad supresora del silenciamiento génico transcripcional producido por el alelo *Ty-1*. TYLCV-IL y las quimeras derivadas de éste y de TYLCV-MId indujeron una leve expresión de síntomas en el huésped tolerante, aunque no se han podido localizar los determinantes moleculares de virulencia asociados. El mutante de TYLCV-MId deficiente en la proteína C4 mostró una mayor acumulación en presencia del alelo de tolerancia *Ty-1* respecto al correspondiente virus salvaje, por lo que apoya su papel como factor de patogenicidad. Finalmente, para determinar si es posible romper la tolerancia a begomovirus mediada por el alelo *Ty-1* en tomate, se incrementó la diversidad genética viral empleando dos estrategias. En la primera, el tratamiento de plantas infectadas con el análogo de base 5-fluorouracilo tuvo un efecto mutagénico leve sobre el genoma de los begomovirus (probablemente causada por una fuerte selección purificadora) y una elevada toxicidad en tomate. En la segunda estrategia, la elevada diversidad genética presente en la mutateca producida por *error-prone rolling circle amplification* (epRCA), tras su inoculación en tomate y varios pases de injerto, se redujo a algunas mutaciones polimórficas (sinónimas o cuyo impacto estuvo cercano a la neutralidad) detectadas en la secuencia consenso viral. En ningún caso se han obtenido signos de superación de la tolerancia. La durabilidad de la tolerancia a begomovirus puede atribuirse a una fuerte presión purificadora presente en tomate superior a la selección adaptativa que pudiese ejercer el producto del gen *Ty-1*.

CONCLUSIONES

1. TYLCV y TYLCSV presentaron una mayor eficacia biológica en *P. vulgaris* y *S. nigrum* que en tomate. La eficacia biológica de TYLCMaV no se ve afectada por la presencia del alelo *Ty-1*.
2. La complejidad y la heterogeneidad genéticas de los begomovirus fue mayor en *P. vulgaris* y *S. nigrum* que en tomate, especialmente en las regiones V2, IR y CP.
3. La adaptación de los begomovirus a los distintos huéspedes, reflejada por los cambios en la eficacia biológica, tuvo lugar sin variación de la secuencia consenso en ninguna de las cuasiespecies, a pesar de la alta complejidad y heterogeneidad detectada en todos los huéspedes.
4. La progenie generada en las coinfecciones prolongadas de TYLCV y TYLCSV en tomate mostró una alta frecuencia de genomas virales recombinantes, a menudo asociados a patrones de recombinación complejos. En presencia del alelo *Ty-1*, la progenie mostró una mayor frecuencia de genomas de virus recombinantes.
5. En las coinfecciones prolongadas de TYLCV y TYLCSV en tomate en ausencia del alelo *Ty-1*, y no en el huésped tolerante, se formaron genomas defectivos de diversos tamaños con características genéticas complejas, incluyendo fenómenos de recombinación, delección, duplicación, inversión y translocación.
6. El estudio del comportamiento biológico de los virus quiméricos apunta a que probablemente en las regiones Rep, C4 e IR se localicen los determinantes moleculares implicados en la acumulación diferencial de TYLCV y TYLCSV en presencia del alelo *Ty-1*.
7. El mayor nivel de acumulación asociado al mutante de TYLCV deficiente en la proteína C4 respecto al correspondiente virus salvaje refleja el posible papel de este factor viral como determinante de avirulencia en tomate con el alelo de tolerancia *Ty-1*.

8. TYLCV-IL, así como los virus quiméricos derivados de éste con TYLCV-MId, son capaces de superar la tolerancia asociada al alelo *Ty-1* induciendo la expresión de síntomas, aunque mantienen una acumulación disminuida respecto a tomate susceptible.
9. La mutagénesis por epRCA ha supuesto una estrategia eficiente para incrementar la diversidad genética de TYLCV a partir del clon infectivo, llegando a multiplicar por 9 la complejidad e incluso el grado máximo de heterogeneidad. En cambio, con el tratamiento con el análogo de base mutagénico 5-fluorouracilo, se ha conseguido un modesto incremento de la frecuencia de mutación de TYLCV y TYLCSV y se ha visto que resulta muy tóxico para el huésped.
10. La inoculación de la mutateca de TYLCV generada por epRCA en tomate ha producido la aparición de mutaciones polimórficas en la secuencia consenso de la cuasiespecie viral. El carácter probablemente neutro del impacto de la mayoría de estas mutaciones lleva a pensar en la acción de una fuerte selección negativa y sucesivos cuellos de botella sobre la diversidad genética inicial.
11. A pesar de la alta diversidad genética presente en la mutateca de TYLCV, no se ha observado ningún evento de superación de la tolerancia asociada al alelo *Ty-1*, incluso habiendo prolongado la replicación viral en el huésped a través de injertos. Asumimos que esto se debe a que la selección positiva que pudiese ejercer la presencia del alelo *Ty-1* a favor de un virus mutante sea inferior a la fuerte selección negativa que se ha visto en tomate.