



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Interacción de la TGB1 del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) con factores de transcripción de tomate.

AUTOR Jesús Enmanuel Rodríguez Úbeda

DIRECTOR Miguel Ángel Aranda Regules

2026



UNIVERSIDAD
DE MURCIA

Escuela
de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Interacción de la TGB1 del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) con factores de transcripción de tomate.

AUTOR Jesús Enmanuel Rodríguez Úbeda

DIRECTOR Miguel Ángel Aranda Regules

2026



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL TÍTULO DE DOCTOR/A**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, D. Jesús Enmanuel Rodríguez Úbeda, habiendo cursado el Programa de Doctorado Biología Vegetal de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Interacción de la TGB1 del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV) con factores de transcripción de tomate

y dirigida por:

D.: Miguel Ángel Aranda Regules

D.:

D.:

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 26 de enero de 2026

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

Código seguro de verificación: RUxFMmra-PkNjLV77-qNZ3hShK-LCe+TAle

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Financiación

El autor de esta tesis doctoral ha sido beneficiario de una ayuda predoctoral del programa “Formación de Personal Investigador (FPI)” (PRE2019-089811) del Ministerior de Ciencia, Innovación y Universidades.

La investigación desarrollada en la presente tesis doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos y contratos:

- RTI2018-097099-B-100. Exploring the multiple functions of the capsid and the triple gene block 1 proteins in the pepino mosaic virus (PepMV) cycle (EXCITEP). Ministerior de Ciencia, Innovación y Universidades.
- PID2021-125010OB-100. Interacciones proteína-proteína y proteína-ARN entre PepMV, ToBRFV y sus huéspedes (InPeTO). Ministerio de Ciencia e Innovación.

Índice

RESUMEN	I
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	1
1.1. FAMILIA ALPHAFLEXIVIRIDAE	4
1.1.1. ORGANIZACIÓN GENÓMICA	6
1.1.2. REPLICASA Y PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE	7
1.1.3. EL BLOQUE DE TRES GENES	10
1.1.4. MODELO DE REORGANIZACIÓN CELULAR ORQUESTADO POR EL TGB	13
1.2. GÉNERO POTEXVIRUS	19
1.2.1. MORFOLOGÍA Y GENOMA	19
1.2.2. RELEVANCIA EN VIROLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA	20
1.2.3. RELEVANCIA EN FITOPATOLOGÍA	22
1.3. VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO DULCE (PEPMV)	23
1.3.1. ORIGEN, DISTRIBUCIÓN E IMPORTANCIA ECONÓMICA	23
1.3.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	25
1.3.3. GAMA DE HUÉSPEDES Y SINTOMATOLOGÍA	26
1.3.4. GENOMA Y ELEMENTOS CIS-REGULADORES	29
1.3.5. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS	32
1.3.6. CONTROL Y RESISTENCIA GENÉTICA	34
1.3.7. RESPUESTA DEL HUÉSPED A LA INFECCIÓN POR PEPMV	37
1.4. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ALOG	41
1.4.1. ORIGEN Y ESTRUCTURA	41
1.4.2. FUNCIONES BIOLÓGICAS	43
1.5. FAMILIA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN BZIP	46
1.5.1. ORIGEN Y CLASIFICACIÓN	46
1.5.2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	48
1.5.3. RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO	50
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	61
3.1.1. INÓCULO VIRAL	61
3.1.2. MATERIAL VEGETAL	61
3.1.3. BACTERIAS	62
3.2. CONSTRUCCIONES DE ADN	62
3.2.1. CONSTRUCCIONES GENERADAS PARA EL ESCRUTINIO DE Y2H	63
3.2.2. CONSTRUCCIONES CRISPR/Cas9 PARA LA TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTOS DE TOMATE	63
3.2.3. CONSTRUCCIONES GENERADAS MEDIANTE EL SISTEMA GATEWAY	64
3.2.4. CONSTRUCCIONES GENERADAS MEDIANTE EL SISTEMA GREENGATE	65
3.3. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	66
3.4. PURIFICACIÓN DE PEPMV	67
3.5. GENOTECA DE CDNA Y ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	68
3.6. PURIFICACIÓN DE NÚCLEOS	69

3.7.	SDS-PAGE Y WESTERN BLOT	70
3.8.	TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS.....	70
3.8.1.	TRANSFORMACIÓN TRANSITORIA DE PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN.....	70
3.8.2.	TRANSFORMACIÓN ESTABLE DE TOMATE CV. <i>MICROTOM</i> Y OBTENCIÓN DE PLANTAS EDITADAS POR CRISPR/Cas9 ..	71
3.9.	ENSAYOS DE SUSCEPTIBILIDAD A PEPMV	73
3.10.	MICROSCOPIA LASER CONFOCAL DE CÉLULAS VIVAS	74
3.11.	FRET-FLIM	76
3.12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
3.13.	RNA-SEQ	77
	RESULTADO	79
4.1.	ESTUDIO DE LA TGB1 DE PEPMV	81
4.1.1.	ANÁLISIS IN SILICO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA TGB1 DE PEPMV	81
4.1.2.	LA TGB1 DE PEPMV PRESENTA UNA LOCALIZACIÓN NÚCLEO-CITOPLÁSMICA EN CÉLULAS SANAS	86
4.1.3.	LA TGB1 DE PEPMV LOCALIZA EN PLASMODESMOS Y ORGÁNULOS DE REPLICACIÓN VIRAL DURANTE LA INFECCIÓN ..	89
4.2.	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS NUCLEARES DE TOMATE INTERACTORAS DE LA TGB1 MEDIANTE	
	ESCRUTINIO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA.....	91
4.3.	CARACTERIZACIÓN DE SLALOG1.....	92
4.3.1.	EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA LÍNEA <i>SLALOG1</i> A PEPMV	97
4.3.2.	LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>SLALOG1</i> SE VE ALTERADA DURANTE LA INFECCIÓN POR PEPMV	98
4.3.3.	ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE <i>SLALOG1</i> Y TGB1	99
4.3.4.	EVALUACIÓN DEL FENOTIPO DE OTROS MIEMBROS DE LA FAMILIA <i>ALOG</i> ANTE LA INFECCIÓN POR PEPMV	102
4.3.5.	ANÁLISIS DE MUTANTES DE DELECIÓN Y QUIMERAS DE <i>SLALOG1</i> Y <i>SLALOG5</i>	103
4.3.6.	RNASEQ DEL MUTANTE <i>SLALOG1</i>	107
4.4.	CARACTERIZACIÓN DE SLBZIP42.....	111
4.4.1.	EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA LÍNEA <i>SLBZIP42</i> A PEPMV	114
4.4.2.	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE <i>SLBZIP42</i>	116
4.4.3.	ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE <i>SLBZIP42</i> Y TGB1	117
4.4.4.	ESTUDIO DEL CLADO I DE LA FAMILIA <i>BZIP</i> DE TOMATE	118
4.4.5.	RNASEQ DEL MUTANTE <i>SLBZIP42</i>	120
	DISCUSIÓN.....	125
5.1.	LIMITACIONES Y PROBLEMAS EXPERIMENTALES.....	127
5.2.	LA TGB1 DE PEPMV	130
5.3.	SLALOG1 DURANTE LA INFECCIÓN POR PEPMV	132
5.4.	SLBZIP42 DURANTE LA INFECCIÓN POR PEPMV	137
5.5.	UN MODELO PARA EL SECUESTRO DE DOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN POR LA TGB1	140
	CONCLUSIONES	143
	CONCLUSIONS	149
	BIBLIOGRAFÍA.....	155

Resumen

En esta tesis doctoral se ha estudiado la proteína 1 del bloque de tres genes (TGB) del virus del mosaico del pepino dulce (PepMV; especie *Potexvirus pepini*) con un interés especial en su papel en el núcleo. PepMV, perteneciente al género *Potexvirus* de la familia *Alphaflexiviridae*, es actualmente el agente causante de una pandemia en tomate cultivado, con importantes pérdidas económicas asociadas. Además de su relevancia agronómica, PepMV se ha consolidado como un modelo de referencia en virología vegetal gracias al desarrollo de numerosas herramientas biotecnológicas y la caracterización de su genoma e interacción con el huésped. La TGB1 de PepMV desempeña un papel central en distintas etapas del ciclo infectivo, incluyendo el silenciamiento de ARN, aunque muchas de sus funciones han sido inferidas por homología con virus relacionados.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido caracterizar experimentalmente la localización subcelular de la TGB1 de PepMV, con especial interés en su función nuclear, identificando y caracterizando factores nucleares del huésped interactores de TGB1.

En la primera parte de esta tesis se caracterizó la localización subcelular de la TGB1 de PepMV, determinando que se trata de una proteína soluble con una distribución núcleo-citoplásmica en células sanas, con exclusión del nucleolo, que durante la infección se acumula de forma preferente en plasmodesmos y orgánulos de replicación viral (VROs). Aunque en el VRO se concentran gran parte de las funciones asociadas la infección, la presencia consistente de TGB1 en el núcleo sugiere un papel funcional adicional en este compartimento subcelular.

Para abordar esta cuestión, en la segunda parte de esta tesis doctoral, se caracterizaron factores nucleares del huésped interactores de la TGB1 de PepMV identificados a través de un escrutinio de doble híbrido en levadura. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas permitió identificar las proteínas SIALOG1 y SlbZIP42, pertenecientes a las familias de factores de transcripción ALOG y bZIP, respectivamente. Mientras que la familia bZIP participa en una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo respuesta a estrés tanto abiótico como biótico, la

familia ALOG únicamente ha sido descrita como reguladores homeóticos del desarrollo.

Tanto SIALOG1 como SlbZIP42 mostraron localización nuclear en células sanas, donde colocalizaron con la TGB1 de PepMV, y se acumularon de forma preferente en los VROs durante la infección. El análisis comparativo con otros miembros de ambas familias mostró un comportamiento diferencial. Únicamente SIALOG1, dentro de la familia ALOG, fue capaz de acumularse en los VROs, mientras que varios miembros del clado I de la familia bZIP, incluyendo SlbZIP42, pero no SlbZIP11, presentaron esta capacidad, lo que sugiere funciones específicas y no redundantes durante la infección por PepMV. Los ensayos de susceptibilidad a PepMV mostraron una acumulación viral significativamente menor en plantas *slalog1* y *slbzip42* respecto a plantas de genotipo WT. Además, los análisis transcriptómicos en mutantes *slalog1* y *slbzip42* mostraron un papel para ambas proteínas como reguladores maestros de la transcripción, implicados principalmente en procesos redox y de regulación hormonal.

En base a los resultados de esta tesis doctoral se ha propuesto un modelo integrativo en el que la TGB1 de PepMV modula la función y localización de SIALOG1 y miembros de la familia bZIP a lo largo del ciclo infectivo. En las fases iniciales de la infección, la TGB1 presenta una localización núcleo-citoplásmica sin alteraciones en la ultraestructura celular, coexistiendo en el núcleo con SIALOG1 sin interacción, mientras que se asocia de manera constitutiva con SlbZIP42 y otros factores bZIP. Con el avance de la infección, la TGB1 se acumula en los complejos de replicación viral (VRCs) nacientes junto con factores bZIP y, de forma paralela, cambios conformacionales de alguna de las proteínas en el núcleo permitirían la interacción TGB1-SIALOG1. El secuestro de SIALOG1 y factores bZIP por parte de la TGB1 contribuiría a modular la respuesta defensiva del huésped. En las fases avanzadas de la infección, la TGB1 concentraría complejos formados a partir de SIALOG1 en los VRCs, subestructuras condensadas en el interior de los VROs, junto al resto de proteínas virales para optimizar procesos de replicación/transcripción, mientras que

los miembros del clado I de la familia bZIP estarían formando el andamiaje primario de estos orgánulos virales.

Abstract

In this doctoral thesis, the triple gene block protein 1 (TGB1) of pepino mosaic virus (PepMV; species *Potexvirus pepini*) was investigated, with particular emphasis on its role in the nucleus. PepMV, a member of the genus *Potexvirus* within the family *Alphaflexiviridae*, is currently responsible for a pandemic in cultivated tomato, causing substantial economic losses. Beyond its agronomic relevance, PepMV has become a reference model in plant virology owing to the development of a complete biotechnological toolkit and the characterization of its genome and host interactions. PepMV TGB1 plays a central role in multiple stages of the viral infection cycle, including RNA silencing suppression; however, many of its functions have largely been inferred from homology with related viruses.

The main objective of this doctoral thesis was to experimentally characterize the subcellular localization of PepMV TGB1, with particular interest in its nuclear function, through the identification and characterization of nuclear host factors interacting with this viral protein.

In the first part of this thesis, the subcellular localization of PepMV TGB1 was characterized, revealing that it is a soluble protein displaying a nucleo-cytoplasmic distribution in healthy cells, with exclusion from the nucleolus, and that it preferentially accumulates in plasmodesmata and viral replication organelles (VROs) during infection. Although VROs concentrate most functions associated with viral infection, the consistent presence of TGB1 in the nucleus suggests an additional functional role in this subcellular compartment.

To address this question, the second part of this thesis focused on the characterization of nuclear host factors interacting with PepMV TGB1, identified through a yeast two-hybrid screen. *In silico* analysis of the retrieved sequences identified the proteins SIALOG1 and SlbZIP42, members of the ALOG and bZIP transcription factor families, respectively. Whereas the bZIP family is involved in a wide range of biological processes, including responses to both biotic and abiotic stresses, the ALOG family has so far been described mainly as homeotic regulators of development.

Both SIALOG1 and SlbZIP42 exhibited nuclear localization in healthy cells, where they colocalized with PepMV TGB1, and preferentially accumulated in VROs during infection. Comparative analyses with other members of both families revealed differential behaviors. Within the ALOG family, only SIALOG1 was able to accumulate in VROs, whereas several members of the clade I bZIP family, including SlbZIP42 but not SlbZIP11, displayed this ability, suggesting specific and non-redundant functions during PepMV infection. Susceptibility assays showed significantly lower PepMV accumulation in *slalog1* and *slbzip42* plants compared with wild-type plants. Furthermore, transcriptomic analyses in *slalog1* and *slbzip42* mutants indicated that both proteins act as transcriptional master regulators, primarily involved in redox-related processes and hormonal regulation.

Based on these results, an integrative model is proposed in which PepMV TGB1 modulates the function and localization of SIALOG1 and members of the bZIP family throughout the infection cycle. During the early stages of infection, TGB1 exhibits a nucleo-cytoplasmic localization without detectable alterations in cellular ultrastructure, coexisting in the nucleus with SIALOG1 without interaction, while constitutively associating with SlbZIP42 and other bZIP factors. As infection progresses, TGB1 accumulates in nascent viral replication complexes (VRCs) together with bZIP factors, while, in parallel, conformational changes in one or more proteins within the nucleus may enable the TGB1-SIALOG1 interaction. The sequestration of SIALOG1 and bZIP factors by TGB1 would contribute to the modulation of host defense responses. At advanced stages of infection, TGB1 would concentrate SIALOG1-containing complexes within VRCs -condensed substructures inside VROs- together with other viral proteins to optimize replication/transcription processes, whereas clade I bZIP family members would form the primary scaffold of these viral organelles.

Introducción

La familia *Alphaflexiviridae* comprende un grupo de virus de ARN monocatenario de polaridad positiva [(+)ssRNA, (+) single stranded RNA], ampliamente distribuidos y de gran importancia en fitopatología. En esta familia, la capacidad de movimiento tanto intra como intercelular está codificada principalmente en el bloque de tres genes (TGB), que da lugar a una proteína citosólica y dos asociadas a membranas. Estas tres proteínas coordinan un complejo proceso de reorganización celular que convierte a la célula infectada en un campo de batalla, y posteriormente en un centro de producción viral y control de la infección.

Dentro de la familia *Alphaflexiviridae*, el género *Potexvirus* es el que incluye más especies, y destaca por su adaptabilidad y capacidad de infectar una amplia gama de huéspedes, muchos de ellos especies cultivadas de gran importancia económica y social. La comprensión detallada de su biología y patología es esencial para diseñar las estrategias de control y resistencia eficaces frente a las enfermedades que causan.

En este contexto, un representante significativo del género es el virus del mosaico del pepino dulce (PepMV, pepino mosaic virus; especie: *Potexvirus pepini*), de amplia distribución mundial y gran relevancia económica en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). PepMV ha sido objeto de una intensa investigación científica, que ha generado un corpus significativo de conocimiento sobre su genoma, proteínas codificadas y mecanismos de interacción con la planta huésped, así como una variada gama de herramientas biotecnológicas extremadamente útiles para su estudio (Le et al., 2019; Ruiz-Ramón et al., 2019). Estas circunstancias convierten a PepMV en un modelo de gran interés en el estudio de la interacción virus-huésped (Hanssen & Thomma, 2010).

Por último, en la introducción de esta tesis también se expondrá una visión general del origen y función de las familias de factores de transcripción (TF) bZIP y ALOG. Ambas familias de TFs son cruciales en la regulación del desarrollo y la respuesta a estrés en plantas, y jugaron un papel crucial en el proceso de adaptación al medio terrestre.

Mientras que los factores bZIP están bien documentados en la modulación de la percepción del estrés biótico y la activación de vías de defensa contra diferentes agentes de estrés, la familia ALOG ha emergido como un componente clave durante el desarrollo y, potencialmente, en la respuesta a estrés. Dos TFs, cada uno de una de estas familias, han sido identificados como potenciales interactores de la proteína TGB1 de PepMV. Esta tesis doctoral se propone como objetivo profundizar en la interacción molecular entre la proteína TGB1 de PepMV y dos TFs específicos de tomate, con el objetivo de identificar nuevos mecanismos subyacentes a la infección y respuesta viral, contribuyendo al avance del conocimiento básico en virología de plantas, así como al desarrollo de estrategias eficaces en el control de las enfermedades causadas por virus.

1.1. Familia *Alphaflexiviridae*

De acuerdo con la clasificación megataxonómica propuesta actualmente por el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV, International committee on taxonomy of viruses), la familia *Alphaflexiviridae* se clasifica dentro del dominio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Kitrinoviricota*, clase *Alsuviricetes* y orden *Tymovirales* (Koonin et al., 2024). Esta familia viral agrupa a virus de (+)ssRNA, con genomas cuyo tamaño varía entre las 5,4 y 9 kb. Los miembros de la familia *Alphaflexiviridae* presentan viriones filamentosos y flexuosos con un tamaño de 470-800 nm de longitud y 12-13 nm de diámetro, capaces de infectar tanto plantas como hongos fitopatógenos. Actualmente se reconocen 72 especies dentro de la familia *Alphaflexiviridae* (Figura 1.1), distribuidas en seis géneros: los géneros *Botrexvirus* y *Sclerodarnavirus*, incluyen las especies virales aisladas de hongos, mientras que los géneros *Allexivirus*, *Lolavirus*, *Platypuvirus* y *Potexvirus* aquellas aisladas de plantas. Dentro de los géneros *Allexivirus* y *Potexvirus* se diferencian los subgéneros *Acarallexivirus* y *Mandarivirus*, respectivamente (Figura 1.1) (Úbeda et al., 2025).



Figura 1.1. Análisis filogenético de la familia *Alphaflexiviridae*. El alineamiento múltiple de 72 secuencias de replicasa correspondiente a cada uno de los miembros tipo de las 72 especies aceptadas actualmente dentro de la familia se realizó empleando MUSCLE. El mejor método de sustitución de aminoácidos se determinó con MEGA 11. Los árboles de máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood) se infirieron mediante el software RAXML-NG empleando el método LG, considerando la proporción de sitios invariantes (+I) y la variación de la tasa de sustitución entre sitios, de acuerdo con una distribución gamma (+G). Se muestra el mejor árbol ML con valores de soporte *bootstrap* (1000 réplicas); únicamente se muestran los valores >50%. Carnation latent virus (QJX15400.1) (*Carlavirus latensdianthi*, familia *Quinvirinae*) se utilizó como externo al grupo, y el árbol fue enraizado en esta secuencia. *Figura modificada de Úbeda et al., 2025.*

Los miembros de la familia *Alphaflexiviridae* que infectan plantas han sido aislados de una amplia variedad de especies vegetales tanto mono como dicotiledóneas, aunque el rango de hospedadores de cada especie individual suele ser limitado. Todos los miembros de la familia que infectan plantas pueden ser transmitidos mediante inoculación mecánica y en la mayoría de casos no se conocen vectores específicos asociados a su transmisión (Úbeda et al., 2025), excepto para algunos *Allexivirus*, que son transmitidos por ácaros (Kang et al., 2007).

1.1.1. Organización genómica

En todos los casos estudiados el genoma de los miembros de la familia *Alphaflexiviridae* se encuentra poliadenilado en su extremo 3' y presenta una estructura cap de tipo 7-metilguanosina (m7G) en su extremo 5'. Los extremos 3' y 5' no traducibles (UTRs, untranslated regions) presentan una longitud variable entre los miembros de la familia (Figura 1.2), e incluyen diferentes secuencias y estructuras reguladoras (Úbeda et al., 2025). La replicasa está codificada en la primera pauta abierta de lectura (ORF, open reading frame) del genoma, con la excepción del miembro del género *Platypuvirus* (Figura 1.2). A continuación, se codifican hasta cinco ORFs hipotéticas (Figura 1.2), cuyo número y naturaleza constituyen un criterio diferenciador entre los géneros de la familia (Úbeda et al., 2025).

El ARN genómico de los miembros de la familia *Alphaflexiviridae* es utilizado directamente para la traducción de la replicasa, mientras que las ORFs situadas aguas abajo de esta son traducidas a partir de ARNs subgenómicos (sgRNA, subgenomic RNA). Los distintos sgRNAs sintetizados son 3' coterminales con el ARN genómico y presentan un extremo 3' poliadenilado. Además, se les supone capeados en su extremo 5' con una estructura m7G imitando al ARN genómico (Úbeda et al., 2025). Estos sgRNAs pueden ser policistrónicos y la estrategia de *leaky ribosome scanning* parece ser el mecanismo utilizado para la traducción de las ORFs aguas abajo de la primera (Fujimoto et al., 2022). Los distintos sgRNAs pueden o no ser

parece haber evolucionado a partir de un ancestro de la CP de *Potexvirus* (Úbeda et al., 2025).

La replicasa de la familia *Alphaflexiviridae*, la única proteína viral necesaria para la replicación (Úbeda et al., 2025), presenta un tamaño comprendido entre 121 y 196 kDa y contiene de manera ordenada los motivos metiltransferasa de ARN de tipo 1 (MET), helicasa-*like* de ARN (HEL) y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp). Hasta la fecha no se ha descrito actividad helicasa para el dominio HEL de los miembros de la familia *Alphaflexiviridae*. Según resultados obtenidos con BaMV (bamboo mosaic virus; especie *Potexvirus bambusae*), la replicasa codificaría todas las actividades enzimáticas necesarias para el capping de los ARN virales en los dominios MET y HEL (Huang et al., 2005; Y. I. Li et al., 2001; Y.-I. Li et al., 2001; Lin et al., 2012; Meng & Lee, 2017). Sin embargo, todavía está por confirmar si esta vía de capping puede generalizarse a todas las replicasas de *Alphaflexiviridae*, aunque la conservación de residuos críticos tanto en el dominio MET como en el HEL, así lo sugieren (Úbeda et al., 2025). El dominio RdRp, por su parte, se localiza en el extremo C-terminal de la replicasa y se caracteriza por la presencia del motivo central S/TGX3TX3NS/TX22GDD (Koonin et al., 1993). Para BaMV se ha demostrado que el dominio RdRp es el encargado de reconocer estructuras en conformación de *pseudoknot* en el extremo 3', y que esta interacción es necesaria para la síntesis de cadenas negativas del genoma viral (Huang et al., 2001). Secuencias similares en otras especies virales (Osman et al., 2014), así como otras secuencias y estructuras presentes en las cadenas positivas y negativas del ARN viral también serían necesarias para el inicio de la transcripción (Chen et al., 2010; Pillai-Nair et al., 2003).

Además de los tres dominios canónicos, las replicasas de la familia *Alphaflexiviridae* pueden contener (o no) un motivo AlkB, ubicado entre los dominios MET y HEL. Las proteínas AlkB tienen un papel principal en la defensa frente a daño por metilación tanto del ARN como del ADN. Aunque su función ha sido demostrada únicamente en virus de plantas fuera de la familia *Alphaflexiviridae* (van den Born et al., 2008), algunos análisis bioinformáticos sugieren una asociación directa entre la

presencia del motivo y que los virus estén restringidos a floema, así como una adquisición del motivo mediante transferencia horizontal; este patrón también se ha observado en *Alphaflexiviridae* (Moore & Meng, 2019). Por otro lado, se han identificado regiones con homología estructural intercaladas entre los dominios principales. Un ejemplo es una alfa hélice anfipática localizada aguas abajo del dominio MET. Resultados experimentales empleando PLAMV (plantago asiatica mosaic virus; especie *Potexvirus marmorplantagonis*) han demostrado que esta región es un determinante para la asociación a membranas, y que posiblemente contribuya al anclaje del complejo de replicación a estas (Komatsu et al., 2021).

La otra proteína característica codificada en el genoma de *Alphaflexiviridae* es la CP, una proteína muy variable en tamaño que oscila entre los 20,7 y 63,3 kDa. En términos generales esta variación de tamaño está causada por el extremo N-terminal, ya que existe una gran variabilidad en esta región de la proteína; por ejemplo, la CP de ReAV (rehmannia allexivirus; especie *Allexivirus rehmanniae*) tiene más de 300 aa adicionales en su extremo N-terminal sin homología conocida (Qin et al., 2024). Sin embargo, cuando se excluye esta región, la conservación entre las CP de los miembros de *Alphaflexiviridae* es sorprendentemente alta (Úbeda et al., 2025). Dos desviaciones importantes al modelo general de CP y de la partícula viral que conforman son SsDRV (Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus; especie *Sclerodarnavirus sclerotinae*), por carecer de un ORF de CP en su genoma; y LoLV (lolium latent virus; especie *Lolavirus latensloli*) por incorporar en sus viriones, en proporciones equimolares, dos formas carboxi-coterminales de la CP (Úbeda et al., 2025; Vaira et al., 2012).

Hasta la fecha se ha resuelto la estructura 3D del virión únicamente para cinco miembros del género Potexvirus: BaMV (DiMaio et al., 2015), PVX (potato virus X; especie *Potexvirus ecspotati*) (Grinzato et al., 2020), PepMV (Agirrezabala et al., 2015), PapMV (papaya mosaic virus; especie *Potexvirus papayae*) (Yang et al., 2012), y AltMV (alternanthera mosaic virus; especie *Potexvirus alternantherae*) (Thuenemann et al., 2021). Estos estudios han mostrado una estructura de la

partícula viral y los protómeros de CP esencialmente coincidentes entre sí y con un parecido significativo a las de otros virus filamentosos flexuosos. Cada protómero de CP comprende tres regiones: (i) una región N-terminal, (ii) una región central y (iii) la región C-terminal. Mientras que las regiones N-terminal y central permanecen expuestas en el virión, la región C-terminal forma un canal interno en el que hay varios residuos de aminoácidos muy conservados entre los miembros de la familia que conforman un bolsillo de unión a ARN, el cual estabiliza y protege el ARN viral dentro del virión. Cada protómero de CP establece contacto lateral con los dos protómeros inmediatamente adyacentes y con los protómeros inferior y superior en la disposición helicoidal (Agirrezabala et al., 2015; DiMaio et al., 2015; Grinzato et al., 2020; Thuenemann et al., 2021; Yang et al., 2012).

1.1.3. El bloque de tres genes

El TGB es un módulo génico evolutivamente conservado, esencial para el movimiento intra e intercelular, gracias a la acción coordinada de las tres proteínas que codifica (TGB1, TGB2 y TGB3) (Linnik et al., 2013; Morozov & Solovyev, 2003; Park et al., 2014). Además, las tres proteínas son clave en la formación y estructura de los VRO aunque no son necesarias para la replicación, ni la encapsidación del ARN viral (Beck et al., 1991; Morozov & Solovyev, 2003; Tilsner et al., 2012; Tilsner & Oparka, 2012; Verchot et al., 1998). Todos los miembros de la familia *Alphaflexiviridae*, salvo los géneros *Botrexvirus*, *Platypuvirus* y *Sclerodarnavirus*, presentan este bloque. Además, dos especies del género *Potexvirus* y la mayoría de miembros del género *Allexivirus* carecen de una ORF canónica para la TGB3, al estar ausente el codón de inicio (Úbeda et al., 2025).

Las tres ORFs del TGB se solapan parcialmente. Esta organización podría haberse conservado evolutivamente por conferir ventajas regulatorias con respecto tanto al momento de expresión como a la proporción relativa de las distintas proteínas, lo que compensaría la posible pérdida de eficacia biológica derivada de su reducida capacidad para tolerar mutaciones en las regiones solapantes (Morozov &

Solovyev, 2015; Verchot-Lubicz et al., 2010). Es aceptado como una generalidad del TGB que la TGB1 se expresa a partir del sgRNA1, el más grande y abundante, mientras que la TGB2 y la TGB3 se traducirían a partir del sgRNA2, siendo la TGB3 traducida mediante *leaky ribosome scanning* (Verchot et al., 1998).

La TGB1 normalmente se encuentra codificada en la ORF2 y es la proteína más grande del TGB con un peso molecular de 24-27 kDa (214-306 aa). La TGB1 de los miembros de la familia *Alphaflexiviridae* es una helicasa perteneciente a la superfamilia 1 (Morozov & Solovyev, 2003). Para los virus estudiados se ha descrito que el dominio helicasa de la TGB1 actúa a través de interacciones homologas uniendo cooperativamente ARN, y tiene capacidad ARN helicasa y NTPasa dependientes de ATP y Mg²⁺ (Kalinina et al., 2002; Leshchiner et al., 2006; Lin et al., 2004; Liou et al., 2000; Rouleau et al., 1994). Además del dominio helicasa, se puede identificar una región N-terminal de unos 25 aa a la que se le han atribuido funciones moduladoras de la unión a nucleótidos, la actividad ATPasa y la capacidad de movimiento viral, al menos para BaMV (Lin et al., 2004; Liou et al., 2000; Wung et al., 1999). Además de ser clave en el movimiento viral, la TGB1 tiene un papel clave como supresor del silenciamiento de ARN, limitando la propagación de la señal de silenciamiento (Voinnet et al., 2000). Sin embargo, se ha descrito la existencia de diferencias significativas en la capacidad de supresión del silenciamiento de la TGB1 de distintos miembros del género Potexvirus (Senshu et al., 2009). Pese a que las funciones de movimiento y supresión del silenciamiento están ligadas, es posible desacoplarlas y conseguir versiones de TGB1 funcionales en cuanto a movimiento pero que carecen de actividad como supresor del silenciamiento y viceversa. Sin embargo, únicamente se puede complementar en trans la función de supresor del silenciamiento y rescatar un fenotipo de infección silvestre (Bayne et al., 2005; Jaubert et al., 2011; Lim, A. M. Vaira, et al., 2010; Lim, A M Vaira, et al., 2010). El cambio entre las distintas funciones de la TGB1 parece estar mediado por la fosforilación de determinados residuos de la proteína. En este contexto, la forma fosforilada conservaría la capacidad de movimiento, perdiendo su actividad como

supresor del silenciamiento. No obstante, el mecanismo que regula esta interconversión funcional aún no se ha descrito en detalle (Módena et al., 2008; Wu et al., 2024).

La TGB2, a diferencia de la TGB1, es una proteína asociada a membrana con un tamaño que oscila entre los 11 y 14 kDa (99-135 aa). Esta proteína se asocia a las membranas del retículo endoplasmático (ER, *endoplasmic reticulum*) a través de dos dominios transmembrana, adquiriendo una conformación en “U”, donde ambos extremos quedarían expuestos hacia el citosol, mientras que el dominio hidrofílico central quedaría expuesto en el interior de las cisternas del ER (Hsu et al., 2008; Morozov & Solovyev, 2003). Cabe señalar que también se ha propuesto la posibilidad de que esta proteína adquiriera una conformación en “W” quedando asociada a membrana a través de los dos dominios transmembrana y exponiendo las tres regiones hidrofílicas al citoplasma, de forma similar a la conformación adquirida por proteínas *reticulon-like* (Lazareva et al., 2021; Wu et al., 2019). La TGB2 es la proteína dentro del TGB más conservada entre los miembros de la familia *Alphaflexiviridae*, especialmente en su extremo N-terminal, siendo el extremo C-terminal -incluye el segundo fragmento transmembrana y la zona solapante con la ORF4- variable entre los miembros de la familia (Úbeda et al., 2025). En el ER la TGB2 es capaz de inducir constricciones en las cisternas y promover la formación de vesículas (Ju et al., 2005; Lazareva et al., 2021; Tilsner et al., 2012), además de acumularse en el desmotúbulo (Tilsner et al., 2013). Algunas observaciones relacionan este patrón de localización con un papel en el aumento del límite de exclusión molecular (SEL, *size exclusion limit*) del plasmodesmo (PD) (Tamai & Meshi, 2001). Sin embargo, es generalmente asumido que esta función recae principalmente en la TGB1 (Howard et al., 2004). La TGB2 juega un papel clave en la organización de los complejos de replicación viral (VRCs, *viral replication complexes*) a través de interacciones con el dominio C-terminal de la replicasa. Esta interacción es esencial para la relocalización tanto de la replicasa como de la TGB3 a los VRCs,

ya que el bloqueo de esta interacción reduce de forma significativa la replicación y compromete la capacidad de movimiento (Wu et al., 2019).

La TGB3, la más variable y pequeña de las proteínas del TGB, con 5,8-13 kDa (52-126 aa), parece haberse originado dentro de un bloque génico formado por TGB1 y TGB2 mediante un proceso de *overprinting* (Morozov & Solovyev, 2015). La TGB3 tiene un único fragmento transmembrana y, al igual que la TGB2, se asocia a ER, quedando el extremo N-terminal orientado hacia el lumen y el C-terminal proyectado hacia el citosol (Chou et al., 2013; Morozov & Solovyev, 2003). Los miembros del género *Allexivirus* carecen de un gen de TGB3 canónico, al no presentar un codón de inicio; sin embargo, esta proteína se traduciría mediante *leaky scanning* como la TGB3 del resto de miembros de la familia (Lezzhov et al., 2015). La expresión de la TGB3 activa la respuesta ante proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*) en el ER, y desencadena muerte celular programada (Ye et al., 2013). Además, se han identificado diferentes determinantes de patogenicidad en la TGB3 (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011).

Se acepta como una generalidad que las proteínas TGB2 y TGB3 establecen interacciones tanto homólogas como heterólogas esenciales para el reclutamiento de la TGB1 a los PD y la formación del complejo de movimiento viral (Tilsner et al., 2013; Tilsner & Oparka, 2012; Úbeda et al., 2025). Este mecanismo coordinado es fundamental para el movimiento del virus y representa un modelo común en virus del género *Potexvirus* (ver más adelante) y virus relacionados dentro de la familia *Alphaflexiviridae*.

1.1.4. Modelo de reorganización celular orquestado por el TGB

Pese a la simplicidad relativa del genoma de los miembros del género *Potexvirus*, estos presentan una estrategia sofisticada a la hora de infectar a su huésped y expandirse colonizando todas las células del individuo, secuestrando la maquinaria celular y haciéndola propia.

Tras la entrada del virión en la célula huésped (Figura 1.3 A), este se desencapsida exponiendo el ARN genómico, dejándolo accesible a la maquinaria de traducción celular. Este proceso posiblemente este mediado por la fosforilación de subunidades de CP a cargo de factores del huésped, lo que desestabilizaría la partícula viral (Atabekov et al., 2001). Tras las primeras rondas de traducción y transcripción gracias a la replicasa viral y diferentes factores del huésped, las proteínas TGB2 y TGB3 comienzan a acumularse asociándose a las membranas del ER. Ambas proteínas son capaces de formar complejos homólogos y heterólogos consigo mismas y con distintos factores del huésped lo que posibilita su movimiento lateral a lo largo de la red ER-actina (Huang et al., 2023). Además, también pueden moverse por el interior celular a través de vesículas inducidas por la TGB2 mediante un mecanismo no convencional, independiente de COPII (Haupt et al., 2005) (Figura 1.3 B).

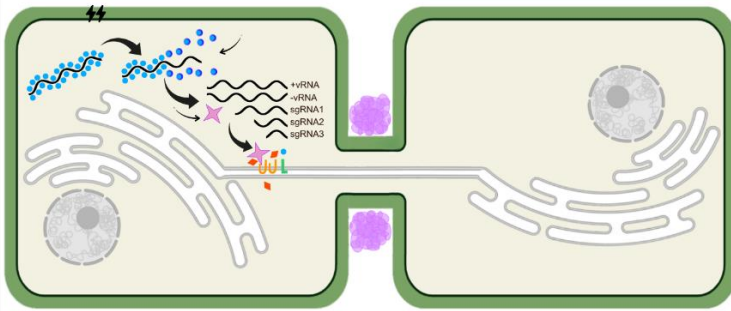
Los complejos formados por TGB2 y TGB3 actuarían como núcleos para la formación de gránulos asociados al ER, en los que es reclutada la replicasa y el ARN viral no encapsidado gracias a la acción de la TGB2 (Bamunusinghe et al., 2009) (Figura 1.3 B). Estos gránulos representarían VRCs tempranos. La TGB3 contiene señales de localización que la dirigen al ER cortical, donde conforma los cuerpos periféricos (Figura 1.3 C): estructuras membranosas punteadas en el ER cortical que incluyen las diferentes proteínas virales, así como distintos factores del huésped, y que han sido originados a partir de los gránulos asociados al ER previamente descritos. En los cuerpos periféricos se desarrollan entonces distintos eventos clave: (1) La TGB2 recluta a la replicasa, el ARN viral no encapsidado y concentra la TGB3 (Wu et al., 2019). (2) La TGB3 sufre cambios conformacionales y/o de su estado de oligomerización, formando estructuras punteadas junto a TGB2. Estas estructuras se diferencian de los gránulos asociados al ER, descritos anteriormente, por un aumento en su tamaño y reducción de su motilidad (Lee et al., 2010). (3) La TGB2 actuaría con función similar a proteínas *reticulon-like*, remodelando y estabilizando las cisternas del ER cortical en membranas con una gran curvatura y próximas a los PD. Estas

membranas representan el andamiaje donde los cuerpos periféricos se ensamblan y estabilizan. Se ha propuesto que la TGB2 sería capaz de adoptar una conformación en “W” en estas estructuras, análoga a la de las proteínas *reticulon-like*, en lugar de la conformación en “U” descrita (Lazareva et al., 2021). (4) La actividad de las proteínas *reticulon-like* del huésped es secuestrada (Lazareva et al., 2021; Lee et al., 2010). En este punto, se pueden observar los cuerpos periféricos de replicación anclados a los PD, mientras siguen siendo visibles los gránulos asociados al ER (Figura 1.3 C) (Tilsner et al., 2013).

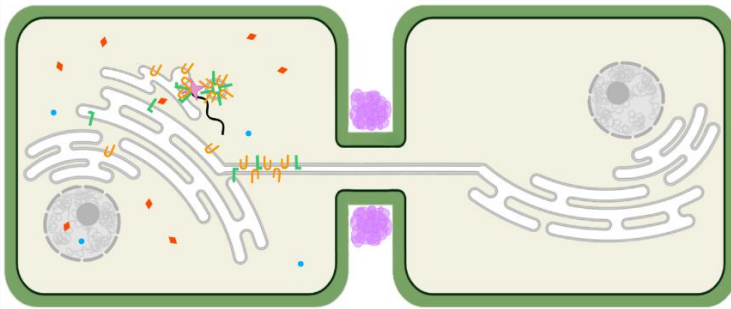
Como se mencionó anteriormente, la TGB3 es considerada el factor de direccionamiento hacia los PD, jugando un papel esencial al reclutar a la TGB1 a estas estructuras de comunicación. En los PD la TGB1 incrementa el SEL (Figura 1.3 C) (Howard et al., 2004). Así, las tres proteínas TGB colonizan el desmotúbulo preparándolo para el transporte de los viriones y/o ribonucleoproteínas (RNP) a la célula adyacente (Figura 1.3 D). La CP de los potexvirus es esencial para el movimiento célula a célula, aunque no es capaz por sí misma de insertarse en los PD y necesita de otros factores virales. Actualmente, la hipótesis con la que se trabaja es que la CP es insertada a los PD en forma de ribonucleoproteína (RNP) formada por el ARN genómico del virus recién sintetizado que comienza a encapsidarse al salir del VRC y une TGB1 en su extremo 5' como señal de direccionamiento (Figura 1.3 D). Para la CP se ha descrito un *switch* funcional que supone que la forma de CP reducida, fuera del VRC, mostraría afinidad por el ARN viral, formando el virión y la RNP; mientras que, dentro de los VRCs, la CP podría sufrir S-oxidación (Méndez-López & Aranda, 2023) (zoom en Figura 1.3 D). La oxidación de la CP reduce su afinidad por el ARN viral o su capacidad de oligomerización, permitiendo que el ARN quede disponible para su traducción y síntesis de cadenas negativas y sgRNAs. La RNP se transfiere a través del PD mediante asociaciones estables con los complejos de TGB2-TGB3 anclados a membrana (Chou et al., 2013) (Figura 1.3 D). Así, la célula receptora no solo recibe el ARN viral junto a distintas subunidades de CP, sino que también recibe un set de proteínas virales que favorecerían el inicio de la nueva

Introducción

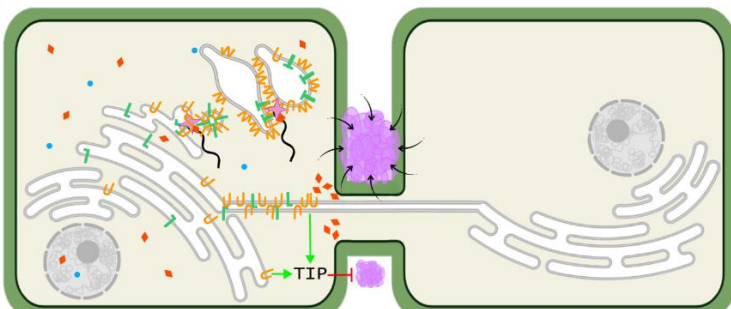
A



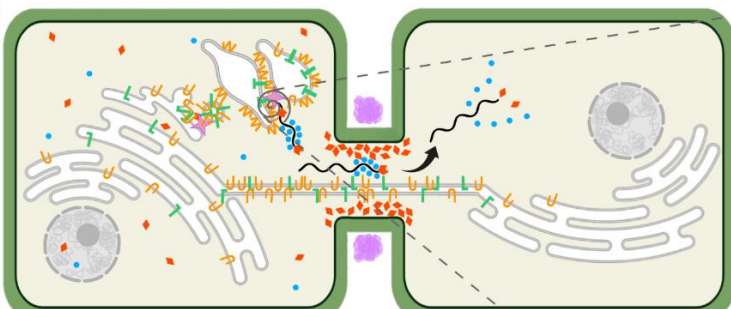
B



C



D



E

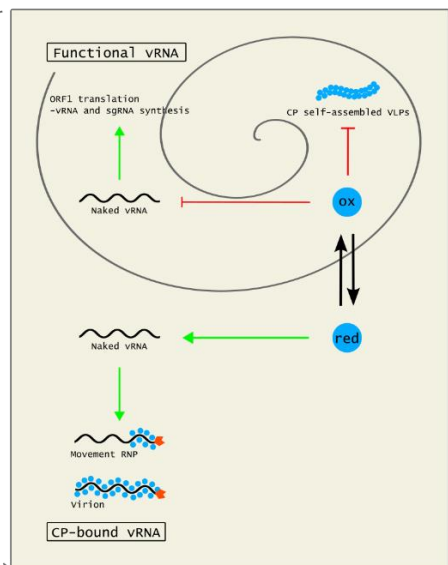
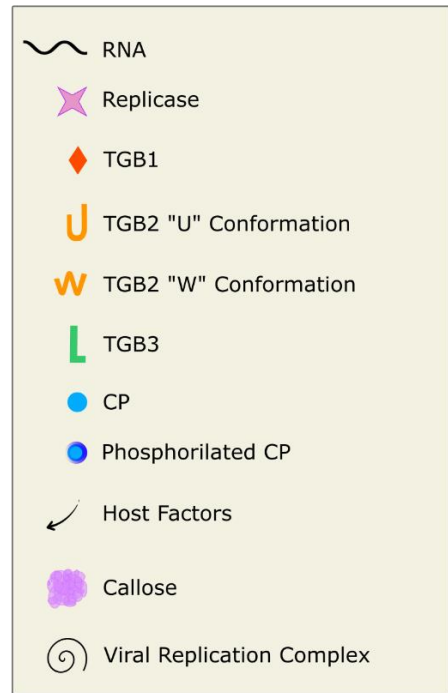
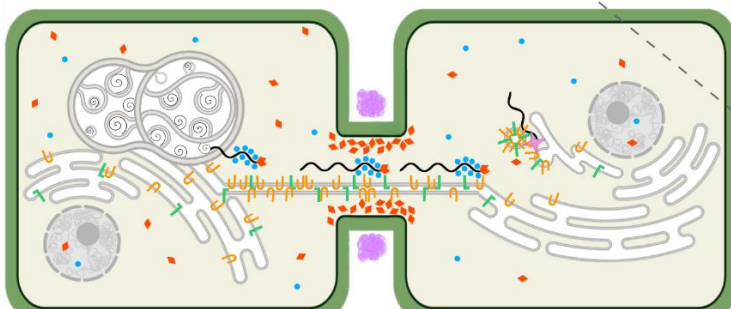


Figura 1.3. Modelo de la remodelación celular coordinado por las proteínas del bloque de tres genes (TGB) de la familia *Alphaflexiviridae*. **A. Entrada del virus y replicación inicial.** El virión penetra en la célula huésped a través de una microlesión y se desestabiliza mediante la fosforilación de las subunidades de CP por factores del huésped. El ARN viral libre recluta la maquinaria de traducción del huésped y sintetiza la replicasa. La replicasa transcribe las cadenas negativas del ARN viral (-vRNA) y los ARN subgenómicos (sgRNA) que son utilizados como molde para la replicación y traducción de las proteínas virales, respectivamente. N: núcleo; nu: nucleolo; ER: retículo endoplasmático; PD: plasmodesmo. **B. Formación de gránulos asociados al retículo endoplasmático y vesículas inducidas por TGB2.** La TGB2 y TGB3 se desplazan a través de las membranas del ER formando complejos, a los cuales reclutan la replicasa y el ARN viral libre, formando así gránulos asociados a ER los cuales actúan como complejos de replicación viral (VRCs) tempranos. Además, la TGB2 induce la formación de vesículas a partir de las membranas del ER a las que también es reclutada la TGB3. **C. Formación de cuerpos periféricos.** La TGB3 tiene señales de localización que la dirigen al ER distal, donde sufre oligomerización y/o cambios conformacionales que generan estructuras punteadas fácilmente visibles en las cisternas más próximas a la membrana celular del ER. En el ER distal, la TGB2 adquiere una conformación *reticulon-like*, con capacidad de remodelar las membranas del ER en estructuras altamente curvadas, formando así los cuerpos periféricos. Estas estructuras membranosas actúan como VRCs intermedios, acoplando transcripción y traducción con el movimiento viral a través de los PD. La TGB1 es reclutada a los PD por acción de la TGB3 y TGB2, incrementando el límite de exclusión molecular del PD. A través de diferentes mecanismos moleculares, el huésped es capaz de percibir la infección aumentando los depósitos de calosa del PD como respuesta. Como contramedida, la TGB2 interactúa con distintas proteínas para activar la β -1,3-glucanasa, y degradar la calosa facilitando el movimiento viral a través del PD. **D. Formación de la ribonucleoproteína (RNP) e infección de la célula adyacente.** Dentro del VRC, la CP puede experimentar procesos de oxidación, modificando su estado RedOx, lo que suprime su afinidad por el ARN viral. De esta forma el ARN viral del interior de los VRCs quedaría disponible para transcripción / traducción. Por el contrario, fuera de los VRCs, la CP se presentaría en su forma reducida, con gran afinidad por el ARN o con capacidad de oligomerización, promoviendo así la formación de la ribonucleoproteína (RNP) y viriones. El ARN viral recién sintetizado comienza a encapsidarse a medida que sale del VRC. A este virión parcialmente encapsidado se le unirían subunidades de TGB1 en su extremo 5', formando así la RNP. Las RNPs se asocian a los complejos TGB2-TGB3 que colonizan el desmotúbulo. La RNP coloniza la célula adyacente, y la TGB1 desencadena la desencapsidación de la RNP, haciendo accesible el ARN viral a la maquinaria de traducción del huésped. Así, la célula recién infectada posee todo un conjunto de las proteínas virales antes de la llegada del ARN viral. **E. Formación del pseudo-orgánulo de replicación viral (VRO).** En las etapas finales de la infección todas las estructuras inducidas por el virus se concentran en un VRO mediante el secuestro y reestructuración del sistema de endomembranas y el citoesqueleto de la célula huésped. En los diferentes VRCs, con una disposición en espiral gracias a la reestructuración de los filamentos de actina, se concentran la TGB1 soluble, y pequeñas vesículas de TGB2-TGB3, dejando un espacio entre ellos donde tiene lugar la transcripción y traducción viral. Este pseudo-orgánulo viral alberga grandes cantidades de ARN viral libre, y su periferia está colonizada por una gran cantidad de viriones nacientes. *Figura tomada de Úbeda et al., 2025.*

infección. Un ejemplo de ello sería la TGB1, la cual forma parte de la RNP, y posteriormente facilita su desencapsidación en la célula receptora, acelerando el inicio de la infección de manera independiente a los factores del huésped (Figura 1.3 D) (Atabekov et al., 2000).

El reconocimiento de proteínas virales por parte de la planta activa quinasas dependientes de calcio, que a su vez activan a remorinas, un grupo de proteínas asociadas a los PD. Una vez activadas, las remorinas cambian su localización y dinámica dentro de los PD, lo que conduce a la deposición de calosa, reduciendo el SEL del PD y restringiendo así el movimiento del virus (Perraki et al., 2018). Como respuesta, se ha descrito que la TGB2 es capaz de interaccionar de forma específica con tres proteínas del huésped llamadas proteínas interactoras de la TGB2 (TIPs), las cuales se propone que activan una beta-1,3-glucanasa, promoviendo la degradación de calosa, lo que aumenta el SEL y facilita el movimiento viral entre células (Figura 1.3 C) (Fridborg et al., 2003).

Finalmente, en las etapas avanzadas de la infección, todas las estructuras inducidas por el virus se concentran en la región perinuclear, formando un VRO, el cual rivaliza en tamaño con el núcleo celular (Figura 1.3 D). El VRO se encuentra rodeado por membranas del huésped reordenadas en un proceso coordinado por la actividad conjunta del TGB. Los VROs presentan una estructura altamente organizada, que consiste en distintos VRCs. Cada VRC presenta un núcleo de agregados helicoidales de TGB1, gracias a la reorganización de los filamentos de actina, rodeado por pequeñas vesículas de distinto tamaño de TGB2-TGB3 (Fig 1.3 D). Estas estructuras, así como el VRO al completo, permanecen estables mediante una red de interacciones entre la RdRp, las proteínas del TGB, la CP, el ARN viral y diferentes factores del huésped reclutados por el virus a este orgánulo (Linnik et al., 2013; Tilsner et al., 2012). Se ha documentado la incorporación de diferentes proteínas virales en vesículas endosomales; sin embargo, sigue siendo incierto si este proceso refleja el reciclaje de proteínas virales, la degradación de las proteínas virales

inducida por la planta huésped o incluso un posible mecanismo de transmisión y colonización de tejidos no conectados simplásticamente (Haupt et al., 2005).

1.2. Género *Potexvirus*

El género *Potexvirus* es el más numeroso y representativo de la familia *Alphaflexiviridae*. Fue nombrado tras la descripción de su miembro tipo *Potexvirus ecspotati* (especie anteriormente denominada *Potato virus X*), y actualmente el ICTV reconoce 52 especies de potexvirus (Figura 1.1) (Úbeda et al., 2025). Dentro del género *Potexvirus* se diferencia el subgénero *Mandarivirus* con tres especies descritas (Figura 1.1).

1.2.1. Morfología y genoma

Los potexvirus presentan viriones flexuosos y filamentosos, característicos de la familia *Alphaflexiviridae*, aunque típicamente más cortos (< 700 nm; 470-580 nm de longitud), ya que su tamaño está condicionado al del genoma también más corto (5,9-7 kb). El (+)ssRNA genómico de los potexvirus únicamente constituye el 6% del peso del virión (Atabekov et al., 2007).

Los potexvirus, como norma general, presentan la organización genómica tipo de la familia *Alphaflexiviridae*, codificando las cinco proteínas canónicas; la replicasa en la ORF1, las TGB1, 2 y 3 en las ORFs 2, 3 y 4, respectivamente, y la CP en la ORF5 (Figura 1.2) (Verchot-Lubicz et al., 2007). Sin embargo, los miembros del subgénero *Mandarivirus* presentan una ORF adicional aguas abajo de la CP y solapante con esta, que codifica una proteína con función de unión a ácidos nucleicos (Figura 1.2). La presencia de esta ORF extra es un criterio distintivo del subgénero (Úbeda et al., 2025). Los potexvirus se diferencian de otros grupos virales que también codifican un TGB, como los hordevirus, en la estructura y función de sus proteínas TGB (Verchot-Lubicz et al., 2010). La TGB2 es la proteína más conservada codificada por el TGB en el género *Potexvirus* (Cotillon et al., 2002; Navarro et al., 2019). Además,

para los potexvirus, la CP es estrictamente necesaria en el movimiento intercelular y sistémico (Sempere et al., 2011; Verchot-Lubicz et al., 2010). Otro rasgo distintivo del género *Potexvirus* es la ausencia de vectores biológicos, por lo que su transmisión natural ocurre, casi en exclusiva, por contacto mecánico. Sin embargo, se ha descrito la transmisión de CYVCV (citrus yellow vein clearing virus, especie *Potexvirus citriflavivenae*) y PAMV (potato aucuba mosaic virus, especie *Potexvirus marmoraucuba*) mediante pulgones (Loconsole et al., 2012; Maghsoudi et al., 2023), aunque en el último caso la transmisión mediante vectores es dependiente de la asociación con un potyvirus, el cual suministra la proteína *helper* (Baulcombe et al., 1993).

1.2.2. Relevancia en virología y biotecnología

El género *Potexvirus* ha sido, y es, esencial en la comprensión de la virología vegetal, ya que varios de sus miembros han tenido papeles clave para la investigación tanto de la virología molecular como de sus aplicaciones biotecnológicas. El conocimiento generado utilizando algunos de sus miembros, sobre todo PVX y BaMV, ha servido para desarrollar modelos de gran relevancia para entender, por ejemplo, la remodelación celular que acompaña a las fases tempranas de la infección (ver apartado 1.1.4. y discusión).

PVX ha ocupado un lugar destacado en el avance de la virología situándose en el top 10 de virus de plantas en patología molecular debido a su desarrollo como modelo en el estudio de la interacción planta-virus, así como para la replicación, mecanismos de expresión de los genes virales y movimiento viral (Scholthof et al., 2011; Verchot, 2022). Entre las contribuciones más significativas se encuentra el descubrimiento del silenciamiento de ARN, y los supresores del silenciamiento de ARN codificados en los genomas virales, gracias al desarrollo de vectores basados en PVX para la expresión de construcciones de interés de forma heteróloga (Anandalakshmi et al., 1998; Baulcombe, 1996). PVX ha sido crucial para la comprensión de los mecanismos de resistencia viral en plantas, como la resistencia

mediada por el gen *Rx*. Este gen actúa como un sensor de la infección, capaz de reconocer la CP de PVX y desencadenar la señalización de una respuesta defensiva que es capaz de bloquear la infección viral en las primeras células infectadas, y que es epistática sobre la respuesta hipersensible (Bendahmane et al., 1999). Además, fue clave en la descripción del papel de las proteínas de movimiento virales en el transporte a través de plasmodesmos, y en el uso de proteínas fluorescentes como la GFP para monitorizar y estudiar el desarrollo de la infección viral (Samuels et al., 2007).

De manera similar, el estudio de BaMV ha permitido caracterizar numerosos elementos *cis* clave del ARN viral y proteínas necesarias para la replicación y transporte, mecanismos no canónicos para unir el cap a los ARNs virales, así como la estructura de los viriones flexuosos filamentosos. Además, BaMV ofrece un sistema óptimo para el estudio de ARN satélites y las implicaciones que estos tienen en la biología del virus (Alazem & Lin, 2017; Chen et al., 2010; Huang et al., 2001; Lin & Lin, 2017; Meng & Lee, 2017).

PepMV, inicialmente debido a su gran importancia aplicada, se ha consolidado como un virus modelo en la virología molecular de plantas debido a los avances que han permitido entender la relevancia de la interacción entre cepas del virus en el desarrollo de las epidemias y en la evolución del virus, en la identificación de nuevas fuentes de resistencia, y en el desarrollo y aplicación de estrategias de control (véase más abajo). El estudio de la interacción molecular entre PepMV y sus huéspedes, de importancia creciente, se beneficia enormemente del conocimiento acumulado generado con PVX y BaMV, entre otros.

Por otra parte, los virus de plantas en general, y los potexvirus en particular, representan valiosas herramientas biotecnológicas gracias a sus propiedades físicas y químicas distintivas, como su composición proteica, su simetría filamentosa, su capacidad de encapsular ARN, y su rápida multiplicación y sencilla purificación (Steele et al., 2017). En particular, una dimensión relevante del género *Potexvirus* es su aplicación en biotecnología vegetal, donde virus como PVX y PepMV han sido

ampliamente empleados como vectores modulares para la expresión de proteínas heterólogas. Su alta eficiencia de infección y la capacidad de integrar secuencias exógenas sin comprometer significativa su infectividad, han facilitado avances en la producción de proteínas terapéuticas y de interés comercial (*molecular farming*), así como el estudio funcional de genes de plantas (Cañizares et al., 2005; Le et al., 2019; Ruiz-Ramón et al., 2019). Estas características intrínsecas y su versatilidad convierten a los virus de plantas, especialmente a los potexvirus, en plataformas biotecnológicas claves para la innovación en los campos biomédico y nanotecnológico.

1.2.3. Relevancia en fitopatología

Desde un punto de vista fitopatológico, el género *Potexvirus* destaca como uno de los más importantes dentro de la familia *Alphaflexiviridae*, debido al significativo impacto fitosanitario y económico que provocan varias de sus especies en cultivos de interés industrial. Pese a que las especies de potexvirus presentan, de forma aislada, una gama de huéspedes relativamente restringida, el género en su conjunto tiene una distribución cosmopolita y muestra una notable adaptabilidad a diversos huéspedes (Úbeda et al., 2025). Los potexvirus infectan principalmente especies herbáceas, incluyendo cultivos hortícolas, ornamentales y de interés industrial, aunque los *Mandarivirus* han sido aislados de diferentes especies de árboles frutales (Loconsole et al., 2012; Maghsoudi et al., 2023). La infección por potexvirus presenta una sintomatología variable, que en general incluye mosaicos y leves deformaciones foliares, aunque en muchos casos pueden inducir clorosis internervial, así como malformaciones graves y necrosis en hojas y frutos. Estos daños afectan tanto al estado foliar como a la calidad y el rendimiento de los frutos, provocando un impacto significativo en el valor comercial de los cultivos afectados.

Entre los potexvirus de mayor relevancia fitopatológica y económica destacan PVX y PepMV. Ambos virus tienen una distribución global y afectan a cultivos esenciales: PVX es uno de los virus más prevalentes en patata (*S. tuberosum*),

mientras que PepMV es el responsable de una grave pandemia en el cultivo de tomate (*S. lycopersicum*). Ambos virus se transmiten eficientemente por contacto mecánico y mediante material vegetal contaminado. Además, se ha descrito una reducida gama de fuentes de resistencia para PVX y para PepMV no existen variedades resistentes disponibles en el mercado, lo que dificulta su control y lo limita a medidas preventivas, como el uso de material certificado libre de virus y la aplicación de buenas prácticas agrícolas, y el uso de protección cruzada (Hanssen & Thomma, 2010; Hernando & Aranda, 2024; Verchot, 2022).

Por todo ello, los desafíos actuales en el estudio de *Potexvirus* incluyen la comprensión de la evolución y diversificación genética dentro del género, así como la elucidación detallada de los mecanismos moleculares de interacción huésped-patógeno. Esto permitirá una mejora en el desarrollo de tecnologías para su control eficiente y uso biotecnológico. En este contexto, el patosistema PepMV-tomate resulta especialmente adecuado para su caracterización exhaustiva y extrapolación a otros patosistemas, dado que el género *Solanum* es uno de los más cultivados a nivel mundial, y PepMV constituye un modelo muy adecuado del género *Potexvirus* (Úbeda et al., 2025).

1.3. Virus del mosaico del pepino dulce (PepMV)

1.3.1. Origen, distribución e importancia económica

PepMV fue descrito en 1980 infectando cultivos de kachuma (*Solanum muricatum*) en Perú (Jones et al., 1980), y en 1999 se describió la primera infección natural en cultivos de tomate en los Países Bajos y Gran Bretaña (van der Vlugt et al., 2000; Wright & Mumford, 1999). Poco después de esta primera descripción, PepMV fue incluido en la Lista de Alerta de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (EPPO, *European and Mediterranean Plant Protection Organization*), al evidenciarse la rápida propagación en cultivos de tomate por toda

Europa (Cotillon et al., 2002; Efthimiou et al., 2010; Jordá et al., 2001; Lasemann et al., 2000; Roggero et al., 2001; Wright & Mumford, 1999). Las vías de diseminación que llevaron a la situación pandémica actual no están del todo claras. Actualmente, PepMV es el responsable de una pandemia en el cultivo de tomate, estando presente en más de 34 países a lo largo de los cinco continentes, con una especial incidencia en España, Italia, Marruecos, Perú, Turquía, Grecia y México (Figura 1.4) (Carmichael et al., 2011; Cho et al., 2022; EPPO, 2024; Forray et al., 2004; French et al., 2001; Hanssen et al., 2008; Ling & Zhang, 2011; Mumford & Metcalfe, 2001; Pospieszny & Borodynko, 2006).

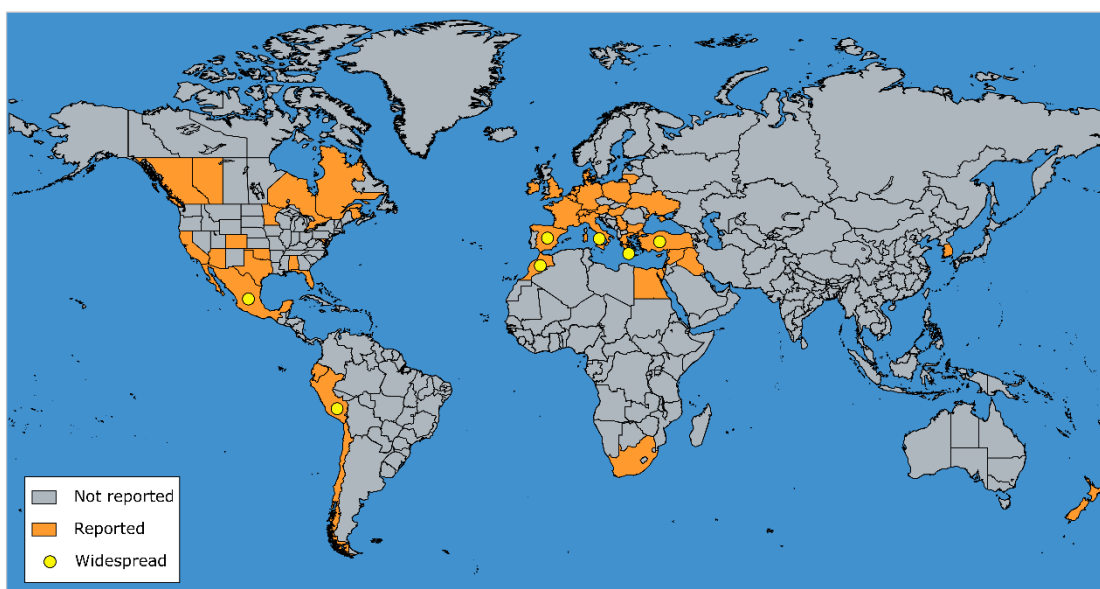


Figura 1.4. Distribución mundial de PepMV. Países / Estados (Regiones) donde PepMV está presente se encuentran coloreadas en naranja; y con un punto amarillo aquellos países donde presenta una distribución generalizada y alta incidencia. Fuente: EPPO (2024).

PepMV es el responsable de importantes pérdidas económicas en el cultivo de tomate, principalmente debido a los síntomas que causa en los frutos, reduciendo significativamente su valor comercial. La literatura científica recoge reportes dispares sobre la magnitud de estas pérdidas. No obstante, los estudios más sistemáticos describen una pérdida moderada en la producción, sin superar el 4%. Sin embargo, el impacto sobre la proporción de frutos de primera calidad puede alcanzar e incluso superar el 40% en determinadas variedades de tomate (Agüero et al., 2018; Peters et al., 2011; Spence et al., 2006). Por ello, la magnitud de las pérdidas económicas

reales de la infección por PepMV dependen en gran medida del mercado objetivo de la producción.

1.3.2. Diversidad genética

PepMV exhibe una considerable diversidad nucleotídica, que se manifiesta en diferentes tipos genéticos principales. En este punto es importante señalar que comúnmente se ha denominado a estos tipos genéticos como cepas. Sin embargo, esto es apropiado cuando los diferentes tipos genéticos presentan características biológicas distintivas, por lo que usar el término “cepa” basándose únicamente en la identidad nucleotídica o en la de aminoácidos puede generar confusión. Por tanto, en este trabajo utilizaré el término “tipo genético” o “tipos genéticos principales”.

Los primeros análisis comparativos de las secuencias de PepMV indicaron una alta homogeneidad, superior al 99%, en los aislados de tomate. Sin embargo, estos sólo compartían un 94-97% de identidad nucleotídica con los aislados originales de kachuma, además de presentar características biológicas distintivas (Mumford & Metcalfe, 2001; Van Der Vlugt et al., 2002; Verhoeven et al., 2003). En consecuencia, los aislados de PepMV procedentes de plantas de tomate fueron categorizados como una nueva cepa, la cepa europea (EU), distinta de la cepa original peruana (LP) de los aislados de kachuma (Mumford & Metcalfe, 2001; Verhoeven et al., 2003). Posteriormente, se secuenciaron dos aislados procedentes de plantas de tomate en América, que mostraron un 82% y 79% de identidad nucleotídica con los aislados de tipo EU. Por lo que fueron considerados representantes de dos nuevos tipos genéticos US1 y US2 (Maroon-Lango et al., 2005). Mas tarde se describió un nuevo aislado en Chile con un 79% de identidad nucleotídica con aislados de tipo LP y EU, y un 78% y 90% con los aislados US1 y US2 respectivamente, estableciendo un nuevo tipo genético chileno (CH2). El análisis filogenético entre aislados de los distintos tipos genéticos identificados sugirió que US2 es un recombinante entre US1 y CH2 (K. S. Ling, 2007). Un nuevo tipo genético (PES) fue aislado a partir de especies silvestres afines al tomate de Perú. Este nuevo aislado mostró un 86% de identidad

nucleotídica con US1, y entre un 78% y 82% con aislados del resto de tipos genéticos identificados (Moreno-Pérez et al., 2014). Por tanto, actualmente se reconocen seis tipos genéticos principales dentro de la especie *P. pepini*: LP, EU, US1, US2, CH2 y PES. Esta heterogeneidad genética es fundamental para entender la evolución, el comportamiento epidemiológico y el manejo del virus en cultivos comerciales.

1.3.3. Gama de huéspedes y sintomatología

Al igual que la mayoría de potexvirus, PepMV presenta una gama de huéspedes limitada, virtualmente restringida a solanáceas. En la actualidad solo se han reportado incidencias en cultivos de kachuma y tomate, además de dos descripciones aisladas en patata (*S. tuberosum*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) (Davino et al., 2009; DPV-PepMV, 2005). PepMV también ha sido identificado infectando de forma natural especies de tomate silvestre en Perú (Moreno-Pérez et al., 2014; Soler et al., 2002, 2005), así como en diferentes especies de plantas adventicias, muchas de ellas pertenecientes a familias distintas de las solanáceas, creciendo junto a zonas de cultivo (Córdoba et al., 2004; Jordá, Pérez, Culebras, et al., 2001; Matzrafi et al., 2023). Estos datos ponen de manifiesto la importancia de monitorizar no solo el cultivo de interés sino todo el ecosistema agrario, para un correcto diseño de estrategias de control y prevención.

La gama de huéspedes experimentales de PepMV incluye todas las solanáceas, aunque algunas no se infectan sistémicamente. Cabe señalar que la gama de huéspedes es una capacidad propia de cada aislado concreto, ya que se han descrito diferencias significativas en la capacidad de infectar determinados huéspedes incluso entre aislados pertenecientes al mismo tipo genético principal (Blystad et al., 2015; Jones et al., 1980; Jordá, Pérez, Culebras, et al., 2001; Moreno-Pérez et al., 2014; Papayiannis et al., 2012; Salomone & Roggero, 2002; Stobbs et al., 2009). Además, se han descrito coinfecciones en plantas de tomate de todos los tipos genéticos principales conocidos de PepMV, así como infecciones mixtas de estos con otros virus. Este tipo de infecciones podría ampliar la gama de huéspedes

e influir en otros aspectos de la biología del virus (Alcaide & Aranda, 2023; Gómez-Aix et al., 2019; González et al., 2021; Klap et al., 2020; Pagán et al., 2006).

La sintomatología que induce PepMV está condicionada por el aislado viral, la variedad vegetal, el tiempo de infección (Sempere et al., 2016; Spence et al., 2006) y condiciones ambientales como la temperatura o la intensidad lumínica (Blystad et al., 2015; Fakhro et al., 2011; Jordá, Pérez, Culebras, et al., 2001; Schwarz et al., 2010), lo que la hace muy variable, desde leves patrones en mosaico hasta deformaciones graves en hojas y frutos (Figura 1.5) (Alcaide et al., 2023; Hasiów-Jaroszewska & Borodynko, 2012; Sempere et al., 2016). Típicamente, el espectro de síntomas en tomate incluye mosaicos amarillos o verde oscuro, manchas foliares angulares amarillas, abullonado en las hojas, estrías verdes o necróticas en el tallo y distribución irregular de los pigmentos, malformaciones y agrietado de frutos (Figura 1.5) (Blystad et al., 2015; Hanssen et al., 2009; Jones et al., 1980; Roggero et al., 2001; Spence et al., 2006). Las plantas de tomate pueden permanecer asintomáticas hasta el momento de la fructificación, momento en el que pueden aparecer síntomas graves en frutos afectado significativamente al valor económico del cultivo (Gómez et al., 2009; Spence et al., 2006). PepMV también ha sido relacionado con la etiología de la enfermedad del decaimiento del tomate (*die-back disease*), caracterizada por un colapso repentino y marchitez total de la planta (Soler-Aleixandre et al., 2005), aunque su causa parece ser compleja incluyendo a otros agentes patógenos.

Es importante destacar que la gravedad de los síntomas no está necesariamente correlacionada con la cepa o el tipo genético principal del aislado, ya que puede estar asociada con sutiles diferencias a nivel nucleotídico entre los genomas de los distintos aislados (Alcaide et al., 2022; Hanssen et al., 2009; Verhoeven et al., 2003). Por ejemplo, ciertos análisis mutacionales han demostrado que una única sustitución de aminoácido en la posición 67 (K67E) de la TGB3 puede convertir una cepa de sintomatología leve en una variante inductora de necrosis (Hasiów-Jaroszewska et al., 2011; Hasiów-Jaroszewska & Borodynko, 2012). Esta sustitución modularía la acumulación viral, la cual depende de factores adicionales,



Figura 1.5. Sintomatología de PepMV en plantas de tomate. Mosaico amarillento; Malformaciones foliares / abullonado; Maduración irregular del fruto / *flaming*; Distribución irregular de los pigmentos / marmoleo (*marbling*).

incluyendo los niveles de acumulación del dominio RdRp de la replicasa, el cual es un elicitor de necrosis (Sempere et al., 2016). Otro ejemplo es el de los mosaicos foliares internerviales. Se ha demostrado que dos sustituciones puntuales en la CP, E155K y D166G, presentes en un aislado de tipo CH2 inductor de amarilleamiento, reproducen estos síntomas cuando se introducen de forma independiente en aislados de sintomatología leve con fondos genéticos de los tipos EU o CH2, independientemente (Hasiów-Jaroszewska et al., 2013; Minicka et al., 2017). Del mismo modo, la sustitución E236K en la CP, identificada originalmente en el aislado agresivo PepMV-H30, fue introducida en un aislado de sintomatología leve con fondo de tipo EU, el cual replicó los síntomas del aislado agresivo original. Este residuo, ubicado en el extremo C-terminal, está expuesto en el virión, lo que indica una posible

implicación en interacciones proteína-proteína (Alcaide et al., 2023). Además, las interacciones entre el virus y el huésped pueden generar respuestas opuestas en función del aislado específico involucrado (Sempere et al., 2016).

En especies distintas de tomate, la expresión de síntomas a causa de la infección por PepMV es variable, aunque suele ser leve. En kachuma se han descrito síntomas de amarilleamiento en hojas jóvenes, mosaicos y deformaciones foliares leves (Jones et al., 1980), mientras que en otras especies ensayadas la sintomatología incluye mosaicos, lesiones cloróticas y necróticas y diversas deformaciones foliares. Cabe señalar que, en muchas especies, especialmente en huéspedes silvestres, la infección por PepMV es asintomática a pesar de ser sistémica (Blystad et al., 2015; Córdoba et al., 2004; Fakhro et al., 2011; Jones et al., 1980; Jordá, Pérez, Culebras, et al., 2001; Moreno-Pérez et al., 2014; Papayiannis et al., 2012; Salomone & Roggero, 2002). Hasta la fecha, no se ha caracterizado la sintomatología de PepMV en frutos distintos al tomate.

1.3.4. Genoma y elementos *cís*-reguladores

Los datos de esta sección se basan en la secuencia de referencia (RefSeq) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de PepMV (NC_004067.1), correspondiente al aislado SP13, perteneciente al tipo genético EU. Por lo que diferencias menores pueden ser identificadas al comparar esta información con otros aislados de PepMV.

PepMV presenta un genoma (+)ssRNA de 6,45 kb, con 5 ORFs (Figura 1.6). Además, incluye dos pequeñas regiones intercistrónicas, así como UTRs en los extremos 5' y 3' de 86 y 64 nucleótidos, respectivamente (Figura 1.6) (Aguilar et al., 2002; Cotillon et al., 2002). El genoma de PepMV está poliadenilado en su extremo 3' (Aguilar et al., 2002; Cotillon et al., 2002) y se considera que contiene una estructura cap m7G en su extremo 5' (Figura 1.6).

La ORF1, situada en el extremo 5', codifica la replicasa, seguida de tres ORFs parcialmente solapantes que codifican las tres proteínas que conforman el TGB, y la ORF5 final que codifica la CP (Figura 1.6) (Adams et al., 2004; Aguilar et al., 2002). Se considera que PepMV sigue la estrategia de traducción de los miembros de su familia, traduciendo la replicasa directamente desde el ARN genómico mientras que las ORF aguas abajo se traducen a partir de sgRNAs 3'-coterminales con el genómico. Además, es aceptado que los tres sgRNAs de PepMV presentan estructura 5'cap y 3'poli(A), imitando al ARN genómico del virus (Figura 1.6). Los sgRNAs de PepMV no se encapsidan en el virión (Agirrezabala et al., 2015; Méndez-López & Aranda, 2023).

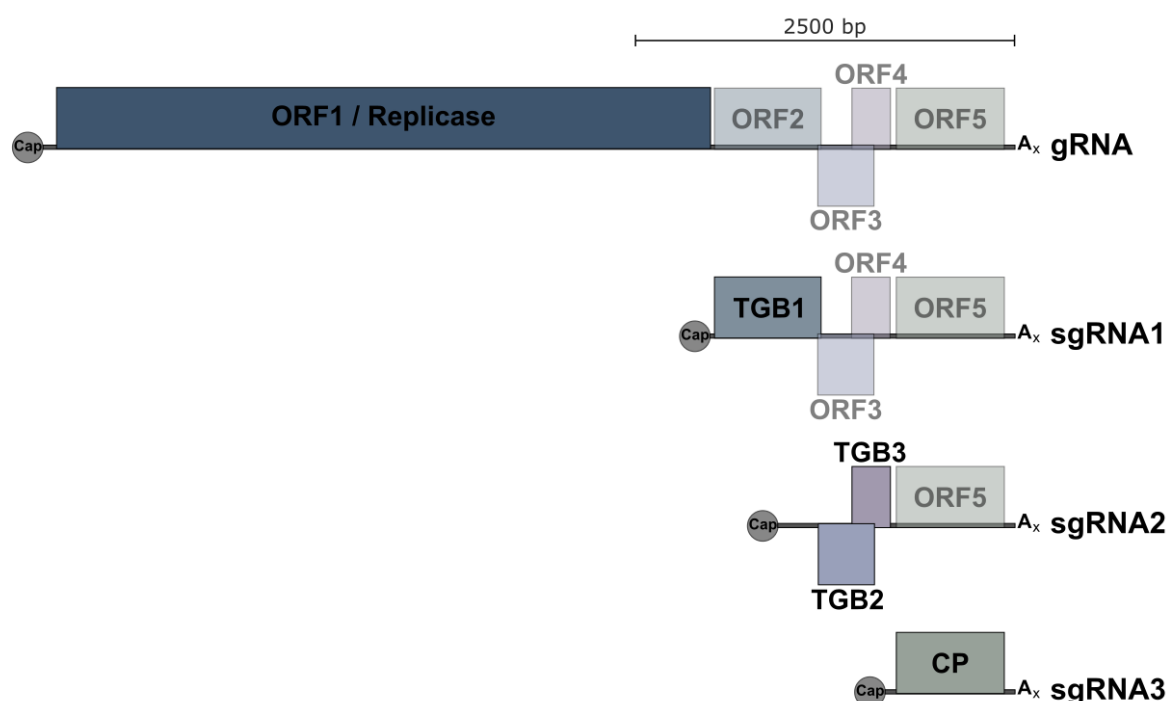


Figura 1.6. Estructura de los ARNs genómico y subgenómicos de PepMV. Representación esquemática del ARN genómico (gRNA) de 6,4 kb de PepMV y los tres ARNs subgenómicos (sgRNA). Las regiones no codificantes se representan con una línea negra. Se representan la estructura cap (Cap) y la cola poliadenilada (A_x) en las regiones no codificantes 5' y 3', respectivamente. Las 5 ORFs de PepMV se muestran como cajas, con los nombres de las proteínas codificadas sólo en las cadenas de ARN de las que se traducen, indicadas además en color sólido. TGB: *triple gene block* / proteínas del bloque de tres genes; CP: *coat protein* / proteína de la cápside. La barra de tamaño representa 2,5 kb.

El genoma de PepMV presenta numerosas estructuras y secuencias reguladoras en sus UTRs, con un alto grado de conservación entre los miembros del género *Potexvirus*. El genoma de PepMV comienza con la secuencia 5'GAAAACAAAA

(Figura 1.7), considerada un promotor de la replicación (Aguilar et al., 2002; Cotillon et al., 2002). El 5'UTR junto con parte de la ORF1 se pliegan en una estructura de tallo bucle (SL1, *stem loop* 1) quedando expuesta en el bucle la secuencia 5'GAAA (Figura 1.7). Esta secuencia es requerida para la replicación de PVX (Park et al., 2013; Úbeda et al., 2025). Para la acumulación de los sgRNAs de PVX es necesaria la interacción entre el octanucleótido 5'AACUAAAC localizado aguas arriba del SL1 en el 5'UTR y sus contrapartidas (5'GUUAAGUU) localizados en las regiones intercistronicas aguas arriba de las ORF del TGB y la CP (Kim & Hemenway, 1999, 1997). Sorprendentemente, en el caso de PepMV esta secuencia no está conservada en el 5'UTR (Figura 1.7), pero sus contrapartidas aguas abajo si lo están; la secuencia 5'(AC/G)GG**GUUAAGUU**UCC(7nt)GAAA, que incluye el octanucleótido (resaltado), corresponde a los 25 nt de la región intercistrónica entre las ORF1 y 2, así como aguas arriba de la ORF5 y dentro de la ORF4 (Úbeda et al., 2025).

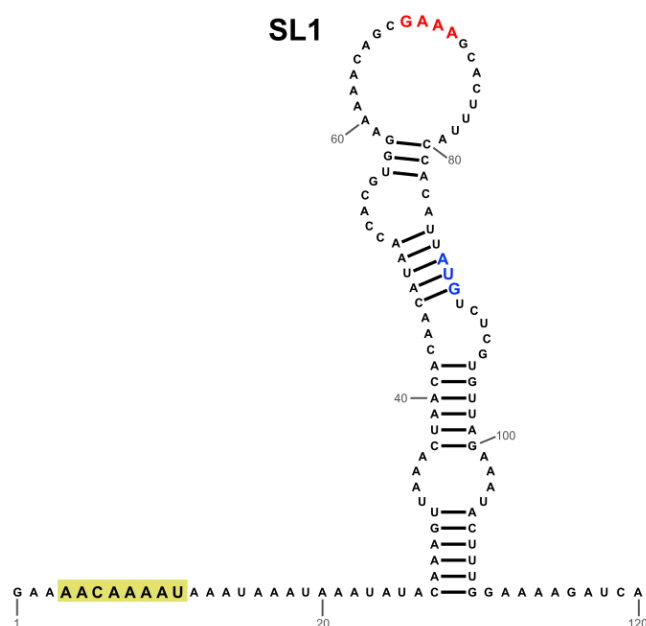


Figura 1.7. Estructura secundaria del extremo 5' de PepMV. Se representan los 120 primeros nucleótidos del genoma de PepMV-SP13 (NC_004067.1). La estructura secundaria del ARN fue predicha mediante el software UNAFold. Se puede diferenciar el SL1 (*Stem loop* / tallo bucle) descrito previamente para PVX. Se resalta en amarillo el octanucleótido necesario para la acumulación de los ARN subgenómicos. La secuencia 5'GAAA conservada en PepMV, y requerida para la replicación de PVX, está resaltada en rojo. El codón de inicio 5'AUG de la replicasa está resaltado en azul.

En cuanto a la región 3' UTR de PepMV, es capaz de plegarse en tres estructuras de horquilla (Figura 1.8): la horquilla (hp, *hairpin*) 1, la más 3'-terminal,

no es necesaria para la síntesis de cadena negativa; la hp2, está caracterizada por la presencia de un bucle rico en “U” y es necesaria para la síntesis de cadenas negativas; y la hp3, presenta el hexámero 5’ACUUA característico de los potexvirus que constituye un elemento de alta afinidad para la replicasa (Osman et al., 2014). A través de interacciones entre el hp2 y la cola poli(A), la región 3’UTR de PepMV puede adoptar una conformación de pseudonudo estabilizada por tripletes UAU (Figura 1.8), con un papel clave durante la replicación viral (Olsthoorn et al., 2022). El genoma de PepMV termina con la señal de poliadenilación 5’AAUAAA (Figura 1.8).

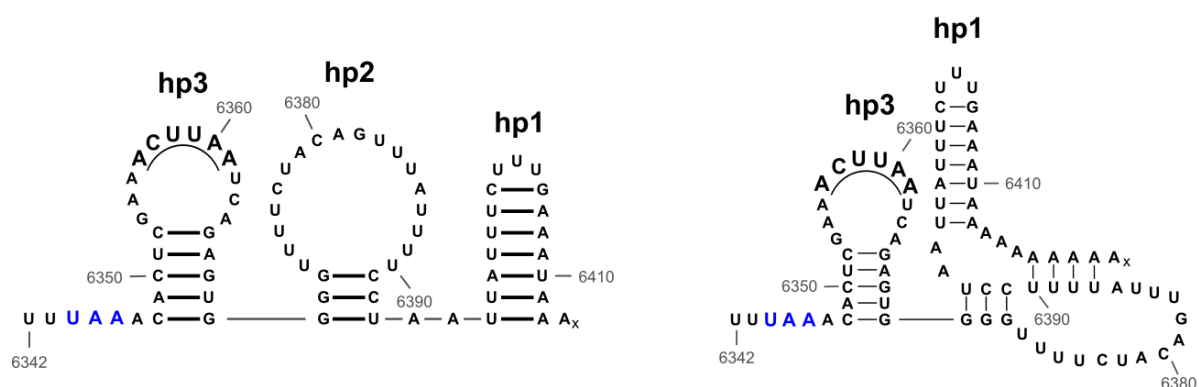


Figura 1.8. Estructuras secundarias posibles del extremo 3’ de PepMV. Se representan los 72 últimos nucleótidos del genoma de PepMV-SP13 (NC_004067.1). El extremo 3’ de PepMV puede plegarse formando tres estructuras en horquilla (hp), con la secuencia 5’ACUUA en la hp3, un elemento de alta afinidad por la replicasa característico de *Potexvirus*. Se indica en azul el codón de stop de la CP. Estructura generada con el software UNAFold. Mediante interacciones entre el hp2 y la cola polyadenilada (A_x), el extremo 3’ de PepMV puede adoptar una conformación de pseudonudo estabilizada por tripletes UAU. Modificado de Olsthoorn et al., 2022.

1.3.5. Funciones de las proteínas codificadas

La replicasa de PepMV es una proteína de 163,8 kDa (1439 aa) codificada en la ORF1, y está compuesta por tres dominios funcionales: un dominio metiltransferasa (MET), un dominio NTPasa/ARN helicasa-like (HEL) y el dominio RdRp. El dominio RdRp sería el responsable de la síntesis de las nuevas cadenas de ARN, mientras que los dominios MET y HEL concentrarían las funciones necesarias para unir el cap a los distintos ARNs (Decroly et al., 2011; Huang et al., 2005; Kadaré & Haenni, 1997; Y. I. Li et al., 2001; Y.-I. Li et al., 2001; Rozanov et al., 1992; Úbeda et al., 2025).

La proteína TGB1, codificada en la ORF2, tiene un peso molecular de 26,3 kDa (234 aa) y contiene un dominio NTPasa/helicasa putativo. La TGB1 de PepMV presenta los dominios conservados GIAGTGKT y CDIVDE, implicados en la unión e hidrólisis de NTPs, respectivamente (Kadaré & Haenni, 1997; Morozov & Solovyev, 2003). Sin embargo, la función biológica del dominio helicasa de las TGB1 de los potexvirus sigue sin estar clara. Una hipótesis propone que la adquisición de actividad como supresor del silenciamiento del dominio HEL de una replicasa viral condujo a la aparición de una segunda helicasa con esta actividad de supresor del silenciamiento y/o de proteína de movimiento mediante transferencia horizontal de genes (Morozov & Solovyev, 2015). Al igual que el resto de las TGB1 estudiadas de miembros del género *Potexvirus*, la TGB1 de PepMV presenta actividad como supresor del silenciamiento actuando de forma sistémica principalmente (Mathioudakis et al., 2014; Shahmir, 2006).

En cuanto a la TGB2, es una proteína de 13,9 kDa (123 aa) codificada en la ORF3 cuyo codón de inicio se encuentra dentro de la ORF1 y codón de stop dentro de la ORF4 (Figura 1.6). Presenta la estructura típica de la TGB2 de *Potexvirus* con dos dominios transmembrana que delimitan una región central y secuencias solubles en ambos extremos. La TGB2 de PepMV se asocia a las membranas del ER donde adquiere una conformación en “U” que sitúa la región hidrofílica central expuesta al lumen del ER y ambos extremos al citosol (Hsu et al., 2008; Mitra et al., 2003; Park et al., 2014).

La TGB3 es la más pequeña y variable de las proteínas codificadas por PepMV con un peso molecular de 9,3 kDa (84 aa). Presenta un único dominio transmembrana en su región central, a través del cual se asociaría con las membranas del ER con una topología predicha que sitúa la región N-terminal expuesta al lumen y la región C-terminal al citosol (Bamunusinghe et al., 2009; Chou et al., 2013).

Finalmente, la ORF5 codifica la CP, una proteína soluble de 25,1 kDa. Además de ser el único protómero encargado de la formación del virión de PepMV, la CP presenta actividad como supresor del silenciamiento (Mathioudakis et al., 2014), y es

estrictamente necesaria para el movimiento intercelular (Sempere et al., 2011). La CP de PepMV presenta una localización núcleo-citoplásmica y actúa en coordinación con las proteínas del TGB para reorganizar el sistema de endomembranas y generar el VRO (Méndez-López et al., 2023). Se ha demostrado que la CP de PepMV presenta un residuo de cisteína conservado dentro del bolsillo de unión al ARN, el cual es susceptible de sufrir modificaciones por oxidación, regulando así el cambio entre sus funciones (Méndez-López & Aranda, 2023). El modelo actual propone que dentro de los VRO la CP no tendría afinidad por el ARN, pero conservaría el resto de sus funciones, mientras que en la periferia y exterior del VRO su estado redox cambiaría pasando a tener una alta afinidad por el ARN, formando así los viriones y RNP de movimiento (Méndez-López & Aranda, 2023; Úbeda et al., 2025).

1.3.6. Control y resistencia genética

PepMV tiene una elevada eficiencia de transmisión mecánica (Jones et al., 1980) y, con frecuencia, causa infecciones asintomáticas, lo que facilita que pase inadvertido hasta que ha afectado a parcelas completas antes de la maduración del fruto, momento en el que aparecen los síntomas provocando importantes pérdidas económicas. Esta capacidad de PepMV junto a la ausencia de variedades resistentes de tomate pone de manifiesto la necesidad de una vigilancia continua en el campo y una inversión en el desarrollo de estrategias e identificación de dianas moleculares para la generación de variedades resistentes (Hanssen & Thomma, 2010).

La propagación secundaria de PepMV está impulsada por la frecuente manipulación (entutorado, poda y recolección) intrínseca al cultivo intensivo de tomate. Prueba de ello es el trabajo de Lacasa et al. (2001) donde demuestran que la manipulación de una planta infectada puede dar lugar a la contaminación de seis o más plantas manipuladas posteriormente durante las labores rutinarias de entutorado y poda; la transmisión de planta a planta puede producirse en menos de una semana (Lacasa et al., 2001). Además, existe una fuerte correlación entre la

acumulación de PepMV en las plantas fuente del inoculo y la eficiencia de la transmisión mecánica a plantas no infectadas (Alcaide & Aranda, 2021).

Por tanto, en la actualidad, la prevención de las infecciones primarias se basa en la aplicación de medidas profilácticas como el uso de semillas certificadas libres de virus, el mantenimiento de estrictas condiciones de higiene en el semillero y durante el manejo del cultivo, así como la monitorización de los cultivos y especies acompañantes para la eliminación temprana de plantas infectadas. Entre los desinfectantes para herramientas y superficies que han probado su eficacia frente a PepMV destacan el Virkon S al 2%, lejía doméstica al 10% y leche desnatada en polvo al 20% (R. Li et al., 2015). En lo referente a semillas, los tratamientos con calor seco (72-80 °C durante 48-72 h) o tratamientos químicos con hipoclorito de sodio al 0.5 – 10% o fosfato trisódico al 10 % han demostrado ser efectivos (Córdoba-Sellés et al., 2007; Ling, 2010).

Aunque estas estrategias son esenciales y recomendadas para todo virus transmitido mecánicamente (p. ej., Salem et al., 2023), por sí solas no bastan para prevenir completamente la diseminación de virus como PepMV. En el caso de PepMV, una estrategia que ha demostrado una gran eficacia es la protección cruzada (*cross-protection*). La protección cruzada consiste en la preinoculación de las plantas con aislados virales atenuados para prevenir el daño causado por aislados más agresivos (Ziebell & Carr, 2010). Los primeros aislados atenuados de PepMV útiles para este fin se describieron en 2010 (Hanssen et al., 2010; Schenk et al., 2010). Posteriormente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) ha aprobado diferentes aislados para su uso en campo como agentes de protección cruzada: 1906 (CH2) (“Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Pepino Mosaic Virus Strain CH2 Isolate 1906,” 2015), VX1 (LP) (Food Safety Authority, 2017b), VC1 (CH2) (Food Safety Authority, 2017a), y el uso combinado de los aislados SP13 (EU) y PS5 (CH2) para lograr una protección cruzada de amplio espectro (Agüero et al., 2018; Anastassiadou et al., 2021). En el caso de PepMV, la protección cruzada ha

demostrado ser altamente eficaz a la hora de reducir el daño en fruto durante más de una década en cultivos de tomate de Países Bajos, Bélgica, Marruecos y España. Sólo en España, desde julio del 2015, se han preinoculado con los aislados SP13 y PS5 más de 117 millones de plantas de tomate -cubriendo una superficie de cultivo de aproximadamente 11.700 hectáreas-, lo que representa cerca del 10% de la producción de tomate en invernadero de Andalucía y Murcia (España) (Hernando & Aranda, 2024). No obstante, la reciente aparición de ToBRFV (tomato brown rugose fruit virus) (Salem et al., 2023) ha suscitado preocupación por los posibles efectos sinérgicos con PepMV en cultivos bajo regímenes de protección cruzada (Klap et al., 2020).

Entre las estrategias desarrolladas para luchar contra PepMV se incluyen el uso de compuestos inductores de resistencia, como el benzotiadiazol, un inductor de resistencia sistémica adquirida (SAR, *systemic acquired resistance*), que reduce la expresión de síntomas en fruto, pero no impide la infección del cultivo (Kutek, 2009).

El cultivo de variedades resistentes constituye la estrategia más eficaz para el control de virus. Por lo que la comunidad investigadora ha hecho un importante esfuerzo en el desarrollo de fuentes de resistencia genética, tanto transgénicas como naturales. Entre los enfoques transgénicos, se utilizó el gen *Rx* de patata, el cual también proporcionaba resistencia frente a PepMV. Sin embargo, esta resistencia es muy efímera debido a la aparición de mutaciones en el gen de la CP (Candresse et al., 2010; Duff-Farrier et al., 2016). Cabe señalar que la capacidad de estas mutaciones para superar la resistencia mediada por *Rx* es fuertemente dependiente de huésped (Duff-Farrier et al., 2016). Otra estrategia transgénica empleada utiliza el ARN de interferencia (RNAi). Se transformaron plantas con una construcción para expresar en una horquilla secuencias derivadas de tres de los tipos genéticos principales de PepMV (US1, LP y CH2) consiguiendo una alta acumulación de pequeños ARNs de interferencia (siRNA, *small interference RNA*) en las plantas transgénicas, lo que confirió inmunidad frente a múltiples aislados de PepMV. Esta resistencia es

transmisible cuando las plantas transgénicas se utilizaron como injerto, pero no cuando se emplean como patrón (Leibman et al., 2021).

Se han identificado múltiples fuentes naturales de resistencia parcial en diferentes especies silvestres de tomate, *S. peruvianum*, *S. chilense* y *S. lycopersicoides* (Ling & Scott, 2007; Soler et al., 2011), mientras que *S. habrochaites* mostró una resistencia más amplia frente a diversos tipos genéticos de PepMV. Sin embargo, estas resistencias todavía no han sido introgresadas en variedades comerciales. Por otro lado, mediante diferentes técnicas de *screening* se han identificado candidatos muy interesantes para programas de mejora. El gen *GSTU38*, que codifica una glutatión S-transferasa, se identificó como un factor proviral durante la infección por PepMV; las plantas defectivas en este gen mostraron una reducción significativa en los títulos virales sin mostrar defectos fenotípicos o en el crecimiento (Méndez-López et al., 2023). Asimismo, se ha identificado el gen *OSCA4.1* de tomate como otro interesante factor de susceptibilidad de amplio espectro frente a PepMV. Las plantas defectivas en este gen no desarrollaron síntomas ante la infección y presentaron una reducción significativa en el título de PepMV (Ruiz-Ramón et al., 2023; *WO2022263602A1_Plantas*, n.d.). Ambas resistencias son específicas de PepMV y no afectan a virus relacionados como PVX (Méndez-López et al., 2023; Ruiz-Ramón et al., 2023).

1.3.7. Respuesta del huésped a la infección por PepMV

PepMV modifica significativamente los perfiles transcriptómicos de la planta de tomate de forma dependiente del tiempo, reprimiendo genes relacionados con fotosíntesis y metabolismo energético e induciendo genes relacionados con defensa y estrés (Alcaide et al., 2022; Hanssen et al., 2011). Los resultados obtenidos mediante RNA-seq (Alcaide et al., 2022) confirman resultados anteriores obtenidos mediante *microarrays*, pero mostraron discrepancias en cuanto a la regulación de genes implicados en el silenciamiento de ARN. Mientras que los datos de Hanssen et al. (2011) muestran que los aislados agresivos provocan las mismas alteraciones

cualitativas que los aislados de sintomatología leve, los datos de Alcaide et al. (2022) muestran que aislados del tipo EU inducen genes relaciones con el silenciamiento de ARN mientras que para aislado de tipo CH2 estos mismo genes permanecen sin alteraciones; esto sugiere diferencias significativas en la capacidad de supresión del silenciamiento entre los diferentes aislados de PepMV. Estas observaciones están respaldadas por trabajos que han demostrado que AGO2 y RDR6 juegan un papel clave en la defensa frente a PepMV, con otras proteínas relaciones con el silenciamiento de ARN contribuyendo a la restricción de la infección de forma jerárquica, y compensando la pérdida de AGO2 (Alcaide et al., 2022; Ludman et al., 2023). Además, Alcaide et al. (2022) observaron que las alteraciones transcriptómicas provocadas por la infección mixta de los aislados de tipo EU y CH2, correspondían a la suma de las alteraciones observadas en las infecciones simples únicamente en las primeras etapas de la infección, pero mostraban claras diferencias en las fases más avanzadas de la infección, lo que evidencia el carácter particular y complejo de las infecciones mixtas (Alcaide et al., 2022). En otros estudios, se ha observado que la inducción de genes relacionados con el ácido salicílico (SA) por PepMV se ve comprometida bajo estrés salino, provocando una reducción en la acumulación de PepMV a niveles moderados de salinidad. Estas observaciones podrían deberse al aumento de la inmunidad basal ante la situación de estrés (Zarrougui et al., 2022).

El uso de la secuenciación de la inmunoprecipitación de ARN metilado (MeRIP-seq) en plantas de *N. benthamiana* y *S. lycopersicum* infectadas con PepMV reveló una notable presencia de modificaciones m6A en el genoma de PepMV (He et al., 2024). Además, se ha descrito como la sobreexpresión de las enzimas responsables de añadir la modificación m6A (*writers*) como MTA o HAKAI, aumenta los niveles de esta modificación en el genoma de PepMV, resultando en una reducción de la acumulación viral (He et al., 2024; H. He et al., 2023). La replicasa de PepMV sería la encargada de secuestrar la vía de autofagia celular para degradar la proteína HAKAI al formar un complejo con Beclin1 (H. He et al., 2023; F. Li et al., 2018), interfiriendo

así con el complejo *writer* del huésped. Mientras que el huésped limitaría la infección de PepMV a través de proteínas que reconocen las modificaciones m6A (*readers*) como ECT2. Los *readers*, tras reconocer la modificación, reclutarían proteínas relacionadas con NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) degradando los ARNs de PepMV (He et al., 2024).

Por otro lado, se ha descrito un conjunto de interacciones proteína-proteína implicadas en la respuesta de la planta frente al estrés inducido por PepMV, así como en el secuestro de funciones celulares por parte del virus para asegurar una infección exitosa. La CP de PepMV interactúa con la proteína heat shock cognate 70.3 (Hsc70.3) en núcleo, citoplasma y floema. Además, su expresión se ve inducida por la infección de PepMV (Mathioudakis et al., 2012). Hsc70.1 también formaría parte del complejo CP-Hsc70.3. Se propone que este complejo sería clave en la replicación y/o traducción viral, aunque no puede descartarse su participación -o la de otras isoformas de Hsc70- en el movimiento viral (Mathioudakis et al., 2014). También se ha descrito la interacción de una glutatión-S-transferasa de clase Tau (GSTU38) con la CP de PepMV (Méndez-López et al., 2023), reforzando un papel de la CP en la modulación del estado redox del huésped. La GSTU38 actúa como un factor proviral específico de PepMV a través de dos posibles vías: (i) la GSTU38 sería reclutada por la CP a los VROs para generar unas condiciones redox óptimas para la actividad viral, por ejemplo, favoreciendo la separación espacial entre las funciones de la CP (Figura 1.3.d); (ii) manteniendo indirectamente la homeostasis redox en la célula y retrasando la detección de la infección al retrasar la explosión oxidativa. Tras un análisis transcriptómico de mutantes *gstu38* en tomate, se observó que la infección por PepMV no induce la expresión de esta proteína; y que la expresión de Hsc70.3 se encuentra reprimida en las plantas *gstu38*. La interacción CP-GSTU38 parece ser específica de PepMV, ya que PVX no reproduce el fenotipo de resistencia (Méndez-López et al., 2023). En línea con lo anterior, la TGB1, por su parte, interactúa con la catalasa 1 (CAT1) de tomate, la cual actúa como un factor proviral, potenciando la eliminación de ROS y reduciendo los niveles de H₂O₂ durante la infección. Estos

efectos se pueden observar en hojas de *N. benthamiana* que sobreexpresan únicamente la TGB1 de PepMV. Los datos sugieren que la TGB1 promueve indirectamente la reducción de H_2O_2 al aumentar la actividad y/o estabilidad de CAT1, sin alterar sus niveles del ARNm ni proteína, consiguiendo así retrasar la explosión oxidativa que activaría las defensas de la planta (Mathioudakis et al., 2013). También se ha descrito la interacción entre la TGB1 de PepMV con una proteína que contiene un dominio tioredoxina cuya expresión no se ve alterada por la infección (Mathioudakis et al., 2018). Esta proteína se localiza en ER y junto a los PDs, lo que sugeriría un papel en movimiento viral, de forma similar a lo descrito para tioredoxinas que interaccionan con la TGB2 de BaMV restringiendo su capacidad de movimiento (Chen et al., 2018; Mathioudakis et al., 2018). Por otro lado, se ha descrito que el canal de calcio OSCA4.1 es reclutado a los VRO de PepMV, y que su ausencia confiere un fenotipo de resistencia frente a PepMV, no reproducible en virus similares como PVX (Ruiz-Ramón et al., 2023). Se propone que OSCA4.1, una vez reclutado a los VROs, contribuiría a mantener la homeostasis local de Ca^{2+} , un proceso que se encuentra profundamente alterado en los mutantes *gstu38* (Méndez-López et al., 2023; Ruiz-Ramón et al., 2023).

Un vacío en el conocimiento de PepMV, y los virus de su familia, que se extrae de los resultados expuestos anteriormente es el papel biológico de TGB1 y CP en el interior del núcleo. Se asume para los miembros de la familia *Alphaflexiviridae*, en base a resultados obtenidos para algunos virus estudiados, que tanto TGB1 como CP tienen una localización núcleo-citoplásmica (Úbeda et al., 2025), aunque todos los eventos principales en el establecimiento y desarrollo de la infección parecen tener lugar en citoplasma, ER y PD. Esto plantea una pregunta clave: ¿por qué algunas proteínas de un virus citoplasmático tendrían localización nuclear? El núcleo es una estructura altamente regulada y el tráfico núcleo-citoplásmico está restringido por la barrera selectiva del complejo del poro nuclear (Zhang et al., 2025). Por tanto, estas proteínas virales habrían evolucionado para sortear dichas barreras, lo cual sugiere que su translocación nuclear cumple una función biológica esencial para el virus, ya

que esta capacidad ha sido conservada evolutivamente (Herranz et al., 2012). Basándose en esta hipótesis, esta tesis doctoral se enfoca en la identificación y caracterización de interactores putativos de la TGB1 de PepMV entre las proteínas nucleares de tomate. De entre las proteínas nucleares, la tesis se centra en las familias de TFs bZIP y ALOG (Dröge-Laser et al., 2018; Naramoto et al., 2020), dos grupos presentes desde el origen del clado *Viridiplantae* que han experimentado una notable diversificación funcional a lo largo de la evolución.

1.4. Familia de factores de transcripción ALOG

1.4.1. Origen y estructura

Los miembros de la familia ALOG [*Arabidopsis LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYL 1 (LSH1)* and *Oryza long sterile lemma 1 (GL)*] (Yoshida et al., 2009) constituyen una familia de TFs específicos de plantas con roles fundamentales en la regulación del desarrollo y la morfogénesis vegetal. Se caracterizan por la presencia de un dominio ALOG, central en la proteína, altamente conservado de aproximadamente 125 aa al que se le han asociado funciones de unión a ácidos nucleicos y regulación transcripcional (Rieu et al., 2024; Upadhyaya et al., 2025).

Estudios filogenéticos han revelado la presencia de estos genes en todas las ramas filogenéticas de las plantas terrestres, así como algunas algas carofíceas, lo que sugiere un origen anterior o, al menos, paralelo a la colonización del medio terrestre (Figura 1.9) (Naramoto et al., 2019, 2020). La historia evolutiva de la familia ALOG parece estar marcada por extensos eventos de duplicación génica independientes en eudicotiledóneas, monocotiledóneas y briófitas, según sugieren los diferentes linajes filogenéticos que se pueden identificar. Esto habría contribuido a su diversificación funcional, gracias a la evolución independiente de elementos regulatorios en *cís* y en las regiones no codificantes de los genes ALOG (Xiao et al.,

2018), así como en las regiones codificantes de los extremos N y C terminales, fuera del dominio ALOG, permitiendo su neofuncionalización (Huang et al., 2022).

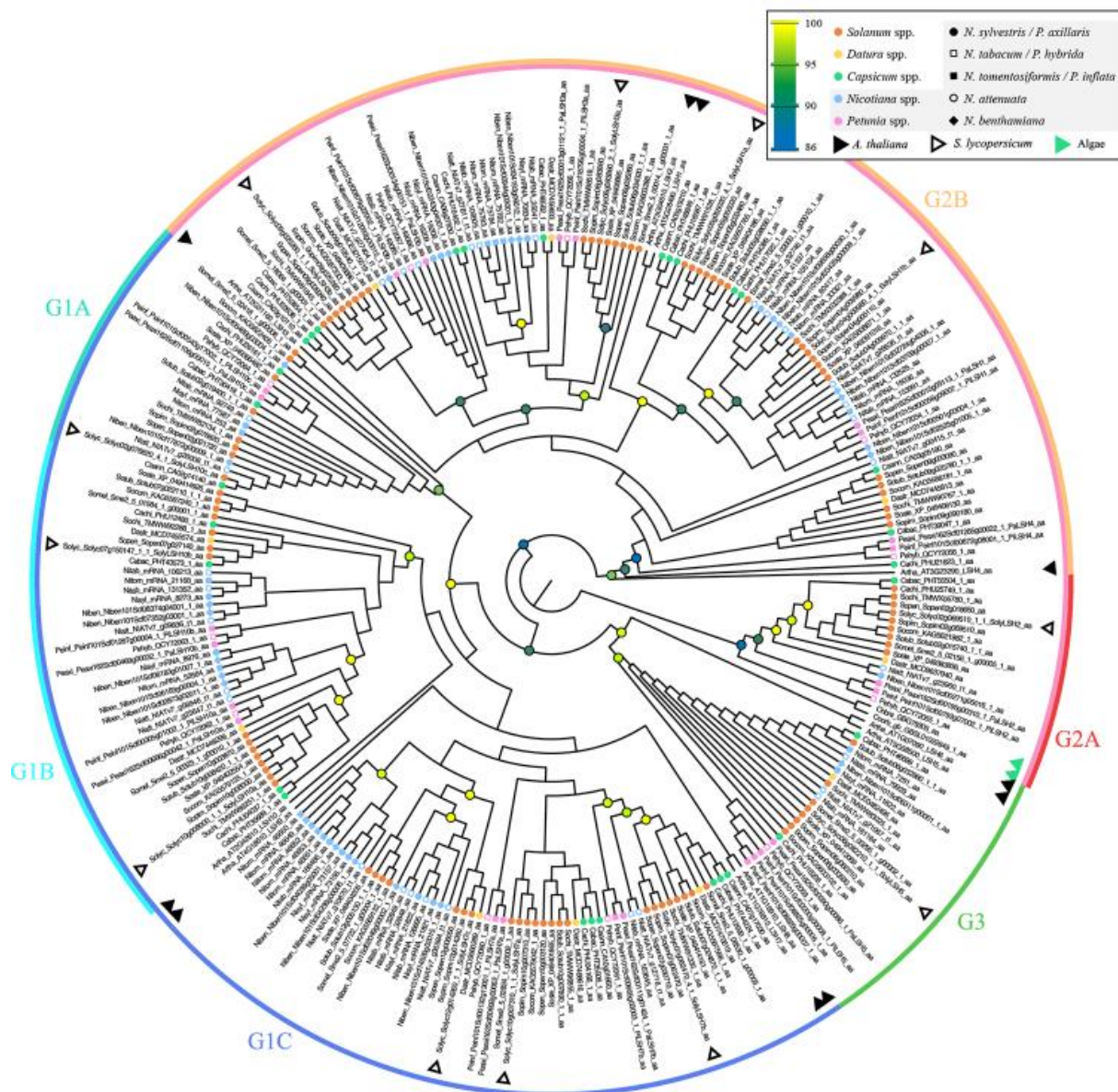


Figura 1.9. Árbol filogenético de los genes ALOG en la familia *Solanaceae*. Filogenia por máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood) de las proteínas ALOG de solanáceas. Los círculos en los nodos representan valores de soporte *ultrafast bootstrap* iguales o superiores a 86. Los círculos de colores al final de las ramas representan los principales clados taxonómicos. Tomado de Turchetto et al., 2023.

Estructuralmente, el dominio ALOG parece derivar del dominio de unión a ADN del extremo N-terminal de las recombinasas tipo XerC/D, una clase nueva de retrotransposones de tipo DIRS-1. Sin embargo, el dominio ALOG se distingue de estos por la inserción de una “cinta” de zinc (*zinc ribbon*) adicional en el dominio de unión a ácidos nucleicos (Iyer & Aravind, 2012) (Figura 1.10). Esta relación sugiere

que el dominio ALOG podría haber evolucionado a partir de elementos móviles, siendo reclutado posteriormente como TF específico en el linaje *Streptophyta*. Notablemente, el dominio ALOG también se ha encontrado en ciertas proteínas de defensa, donde se hipotetiza que tendrían una función como sensores de ácidos nucleicos extraños (Iyer & Aravind, 2012).

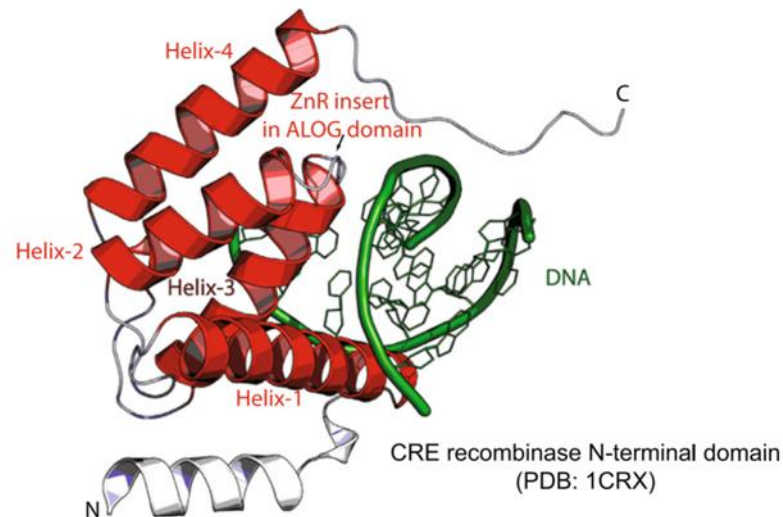


Figura 1.10. Representación esquemática del dominio N-terminal de unión a ADN (DBD) de la recombinasa CRE (*catalytic tyrosine recombinase domain*) en complejo con ADN. Se ilustra la posición de la inserción del *zinc ribbon* predicha en el dominio ALOG. Las hélices alfa de DBD que se conservan en el dominio ALOG se ilustran en rojo. *Tomada de Iyer and Aravind 2012.*

1.4.2. Funciones biológicas

Los miembros de la familia ALOG han sido involucrados en diferentes procesos del desarrollo. En *A. thaliana*, se ha identificado el gen *LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYL 1* (*LSH1*) y *LSH2* implicado en la regulación de la longitud del hipocótilo en respuesta a la luz (Lee et al., 2020; Zhao et al., 2004), y los factores *LSH3* y *LSH4* como supresores de la diferenciación de órganos en las regiones fronterizas de los meristemos aguas abajo de los TF *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*) (Takeda et al., 2011). Además, se ha descrito un papel redundante de estos tres TFs (*LSH1,3,4*) en el desarrollo de la inflorescencia de *A. thaliana* dentro de la red de *LEAFY*, *BLADE-ON-PETIOLE* y *PUCHI* en el control de la floración (Rieu et al., 2024). Por otro lado, se ha descrito el papel de *LSH8* como regulador positivo de la señalización mediada por ABA. Tratamientos con ABA exógeno aumentan la acumulación tanto a nivel de

ARNm como de proteína; y las líneas mutantes *lsh8* presentan insensibilidad a ABA con afección en procesos como la germinación y el crecimiento radicular. LSH8 juega un papel clave en la modulación del patrón de acumulación de proteínas de respuesta a ABA, aguas arriba de TFs como ABI3 o ABI5 (Zou et al., 2021). En *O. sativa*, se han descrito diferentes miembros de la familia ALOG implicados en el desarrollo de la espiguilla y la regulación de la estructura de la panícula. El gen *LONG STERILE LEMMA 1 (G1)* se ha descrito como regulador homeótico de la identidad de órgano del lema estéril (Yoshida et al., 2009). *TRIANGULAR HULL 1 (TH1)*, otro miembro de la familia ALOG, está implicado en la regulación de la expansión celular durante el desarrollo lateral de las espiguillas (Peng et al., 2017); y *TAWAWA 1 (TAW1)* está implicado en la arquitectura de la panícula promoviendo el estado de meristemo de inflorescencia y retrasando la fase de meristemo de espiguilla (Yoshida et al., 2013). En *Physcomitrium patens*, miembros de la familia ALOG juegan un papel clave en la determinación de la identidad celular, al diferenciar el merófito y ser excluidos de la célula apical (gametóforo) por acción de las citoquinas (Hata et al., 2024). Por otro lado, se han realizado estudios en la hepática *Marchantia polymorpha*, en la que la familia ALOG está compuesta por dos miembros, *MpLOS1* y *MpLOS2*, con funciones no redundantes (Naramoto et al., 2020). *MpLOS1* es un factor clave en el mantenimiento del meristemo apical y el desarrollo de órganos laterales a través del control de la proliferación celular (Naramoto et al., 2019). Además, se ha descrito cierta homología funcional en la familia ALOG entre diferentes organismos, como es el caso de *MpLOS1*, capaz de recuperar el fenotipo silvestre en mutantes de arroz en el gen *G1*, sugiriendo que la familia ALOG regula el desarrollo de órganos laterales tanto en gametófitos como en esporófitos (Naramoto et al., 2020). Sin embargo, las proteínas de arroz OsTAW1 y OsG1 no son capaces de recuperar el fenotipo mutante *mplos1*, sugiriendo una conservación y divergencia parcial entre las funciones de la familia ALOG entre ambos clados. En *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula* se ha demostrado la implicación de la familia ALOG en el control de la nodulación (Lee et al., 2024; Lei et al., 2019).

En tomate se han identificado, al menos, doce miembros de la familia ALOG, denominados *TMF FAMILY MEMBERS (TFAMs)*. Uno de los miembros más estudiados, y que da nombre a la familia en tomate, es el gen *TERMINATING FLOWER (TMF)*, que actúa como un represor de la floración e identidad de órgano (MacAlister et al., 2012) y estaría implicado en la determinación del patrón proximodistal de la axila foliar y el desarrollo de la zona de abscisión (Izhaki et al., 2018). Otros miembros de la familia TFAM, como TFAM1, TFAM2 y TFAM3, tienen patrones de expresión con ligeras variaciones al de TMF y cierta redundancia o complementación funcional (Huang et al., 2018, 2022; Xu et al., 2016). Aunque en estudios previos se han denominado a estas proteínas como TFAM, en este trabajo adoptaremos una nomenclatura más descriptiva y sistemática basada en la posición relativa de cada uno de los genes de la familia ALOG en el genoma de tomate. Por ello, nos referiremos al gen objeto de estudio como *SI ALOG1*, en lugar de *TFAM1*, lo que refleja tanto su pertenencia a la familia ALOG como su posición relativa dentro del repertorio genético de tomate.

Los miembros de la familia ALOG tienen la capacidad de formar condensados transcripcionales heterotípicos en el núcleo mediante interacciones proteína-proteína, lo que reforzaría la prevención de la activación precoz de genes como *ANANTHA*, asegurando una transición floral robusta y sincronizada (Huang et al., 2022). La capacidad de formar condensados biomoleculares estaría mediada por las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) presentes en ambos extremos de las proteínas ALOG; a pesar de la gran variabilidad a nivel de secuencia en los extremos de las proteínas ALOG, estas corresponden a IDRs y conservan su capacidad de formar condensados biomoleculares. Se ha observado que los residuos de cisteína de estas proteínas son capaces de percibir el estado redox y formar enlaces disulfuro que concatenan múltiples moléculas, aumentando así la cantidad de IDRs, lo que promueve el cambio de fase. Este cambio de fase inducido por oxidación permitiría secuestrar promotores de genes como *ANANTHA* reprimiendo la floración (Huang et al., 2021).

El papel de las proteínas ALOG en la regulación del crecimiento, el desarrollo y la organogénesis ha sido ampliamente estudiado tanto en especies modelo como cultivadas. Sin embargo, su implicación en la respuesta a estrés apenas comienza a esclarecerse y solo pueden encontrarse en la literatura unos pocos ejemplos. Como se mencionó anteriormente, *LSH8* es un regulador positivo de la señalización por ABA (Zou et al., 2021). Además, el análisis de las regiones promotoras de los genes ALOG ha mostrado un enriquecimiento en elementos *cis*-reguladores sensibles a diferentes hormonas de estrés como ABA y JA, así como elementos de respuesta a sequia (Liu et al., 2024; Upadhyaya et al., 2025). Adicionalmente, la mayoría de las proteínas ALOG de *O. sativa* muestran una represión en su expresión tras tratamientos con ABA exógeno o sequia (Liu et al., 2024). En cuanto al estrés biótico, no se ha demostrado ningún papel para esta familia génica, sin embargo, la presencia de elementos *cis*-reguladores relacionados con el SA y de respuesta a estrés sugiere un posible papel de estos TFs en la respuesta a patógenos (Upadhyaya et al., 2025).

1.5. Familia de factores de transcripción bZIP

1.5.1. Origen y clasificación

Los TFs bZIP [basic (region) leucine zipper] constituyen una de las familias más antiguas, diversificadas y funcionalmente versátiles de la regulación génica en eucariotas. Esta familia se ha conservado en los distintos linajes evolutivos desde su origen en el ancestro común eucariota, sin embargo, es en plantas donde esta familia de TFs ha experimentado una expansión y diversificación funcional particularmente notable (Dröge-Laser et al., 2018). Mientras que en el genoma humano se han identificado 53 genes de la familia bZIP (Rodríguez-Martínez et al., 2017), *Arabidopsis thaliana* codifica 78 (Dröge-Laser et al., 2018), *Oryza sativa* 89 (Nijhawan et al., 2008) y 69 tomate (Figura 1.9) (D. Li et al., 2015). Esta expansión se atribuye a sucesivos eventos de duplicación génica -como refleja su distribución en el genoma

y filogenia- seguidos de procesos de subfuncionalización y neofuncionalización, ampliando así las funciones de esta familia génica y contribuyendo a la capacidad adaptativa y robustez del organismo (Figura 1.11) (Dröge-Laser et al., 2018; Guedes Corrêa et al., 2008; Nijhawan et al., 2008).

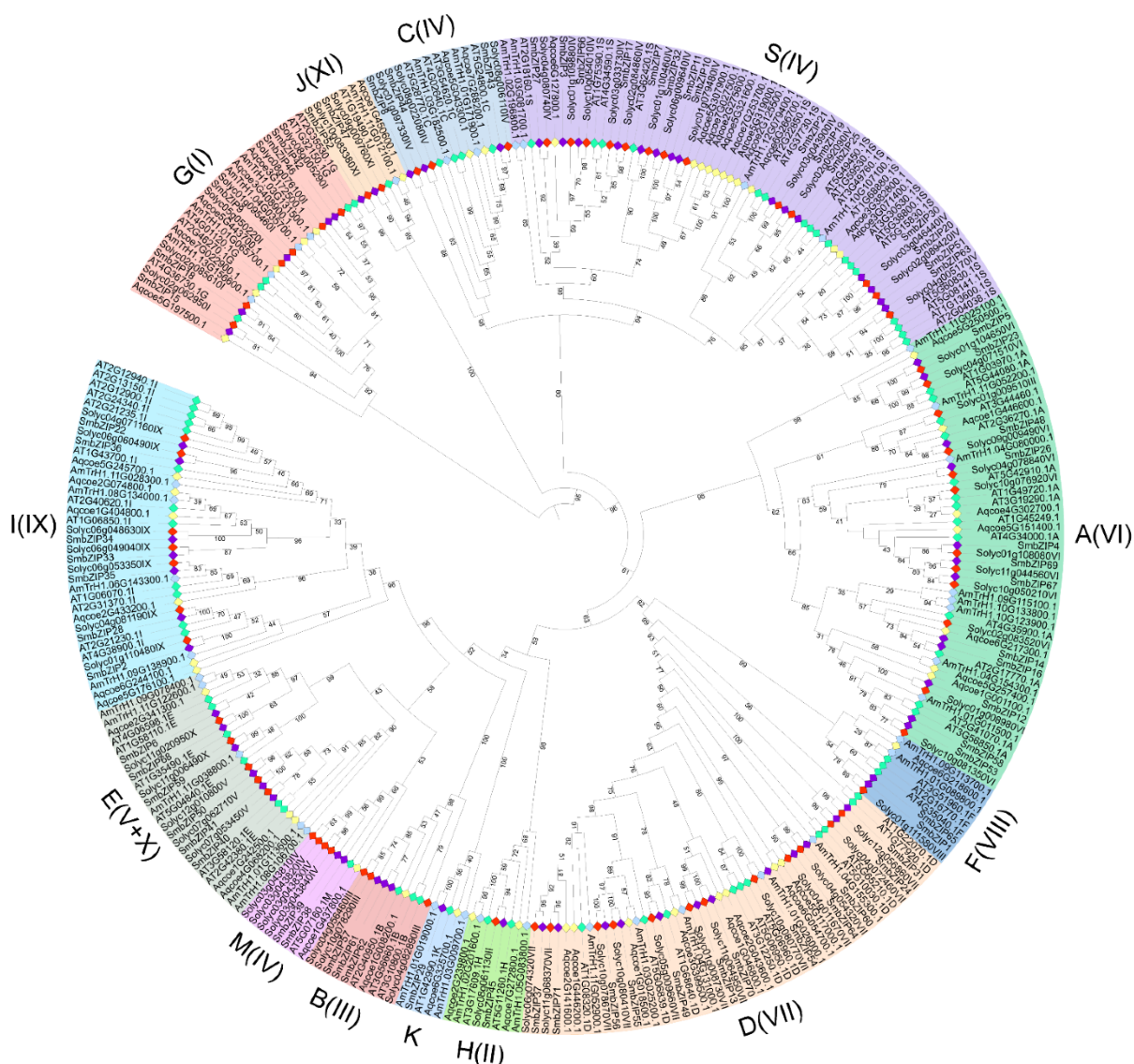


Figura 1.11. Análisis filogenético de las proteínas bZIP de *Solanum lycopersicum*, *S. melongena*, *Arabidopsis thaliana*, *Aquilegia caerulea* y *Amborella trichopoda*. El árbol filogenético fue construido usando IQ-TREE con un valor de *bootstrap* de 5000, a partir de 306 secuencias del dominio bZIP. Las letras o números romanos que siguen a los nombres de los genes bZIP denotan la categorización en estudios previos en *S. lycopersicum* o *A. thaliana*. El color del rombo en cada hoja del árbol indica la especie a la que pertenece, siendo rojo para *S. lycopersicum*, morado para *S. melongena*, verde para *A. thaliana*, azul para *A. trichopoda* y amarillo para *A. caerulea*. Figura tomada de Li et al., 2022.

Estudios filogenéticos en angiospermas subdividen la familia bZIP en 13 subfamilias designadas como A-K, M y S (Figura 1.11), de acuerdo con la homología en su región básica, su posición relativa en la proteína y la presencia de otros motivos conservados; sin embargo, no todas ellas están presentes en todos los organismos (Dröge-Laser et al., 2018). Además, los miembros de la familia bZIP se pueden organizar en 34 posibles grupos de ortólogos (PoGOs, *possible groups of orthologues*). Este conjunto de PoGOs representaría el repertorio completo de los genes bZIP ancestrales a partir de los cuales, tras eventos de especiación, surgieron los miembros actuales de la familia en las diferentes especies. El ancestro al clado *Viridiplantae* habría codificado cuatro genes con funciones en la respuesta al estrés oxidativo, respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein responses*), en la regulación dependiente de luz y un cuarto bZIP ancestral de función desconocida. Los grupos asociados a procesos relacionados con la semilla y la respuesta a estrés mediada por ácido abscísico (ABA) surgieron en el ancestro común de las angiospermas, mientras que tres grupos adicionales, uno de ellos implicado en la optimización energética, surgieron posteriormente en la línea evolutiva de angiospermas (Guedes Corrêa et al., 2008).

1.5.2. Estructura y función

Los miembros de la familia bZIP se caracterizan, y son nombrados, por la presencia de un dominio bZIP de 60-80 aa, consistente en una hélice alfa en la que se pueden diferenciar dos motivos estructurales (Figura 1.12): una región N-terminal básica que contacta con el surco mayor de la cadena de ADN y una región de dimerización tipo cremallera de leucina (*leucine zipper*) en la región C-terminal de la hélice. La región de cremallera de leucinas está formada por la repetición de heptámeros (ZIP) del tipo abcdefg, donde la leucina ocupa típicamente la posición “d”. Esta disposición permite la dimerización entre los miembros de la familia, ya que las leucinas de dos hélices alfa se emparejan de forma antiparalela, formando una estructura de tipo cremallera; estas leucinas forman un núcleo hidrofóbico continuo

que estabiliza el dímero (Figura 1.12). Adicionalmente, se puede diferenciar una región espaciadora de seis residuos localizada entre las dos regiones previamente descritas (Figura 1.12) (Dröge-Laser et al., 2018; D. Li et al., 2015; Li et al., 2019). Los TFs bZIP además de ser capaces de formar homodímeros (Ellenberger et al., 1992), también forman heterodímeros (Rodríguez-Martínez et al., 2017), lo que resulta en un incremento exponencial de su flexibilidad reguladora, no solo en cuanto a su especificidad y plasticidad por la región de ADN diana, sino también su capacidad para formar distintos complejos proteicos (Dröge-Laser et al., 2018).

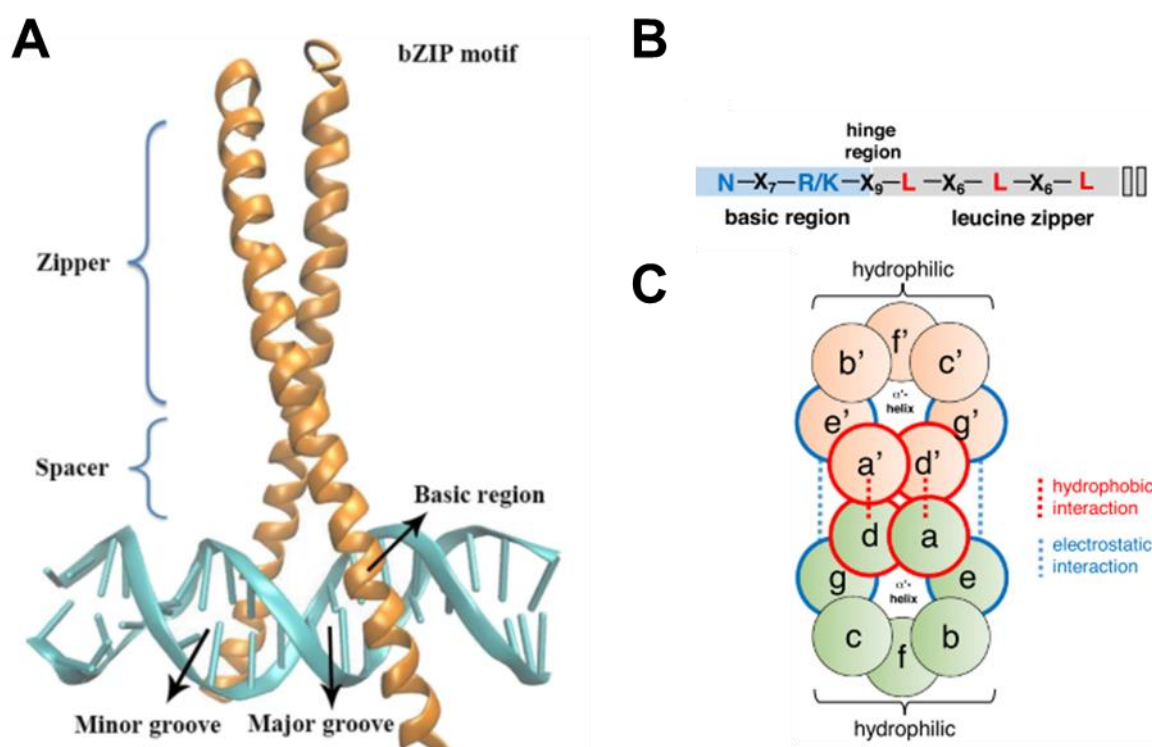


Figura 1.12. Aspectos estructurales de los factores de transcripción bZIP. **A.** Representación de un dímero entre los dominios bZIP unido a la doble cadena de ADN según el “modelo de la tijera”. **B.** Representación esquemática del dominio bZIP, señalando la región básica de unión al ADN (azul) y el dominio *leucine zipper* (gris). El dominio *leucine zipper* consiste en repeticiones de leucina (L) cada siete aminoácidos. **C.** Vista esquemática de la interfaz de dimerización bZIP. El dominio *leucine zipper* anfipático dimeriza para formar coiled-coils. Los siete aminoácidos de cada heptámero, etiquetados a-g, se disponen en dos giros. Las posiciones a y d son hidrofóbicas (típicamente leucina) facilitando la interacción molecular mediante sus cadenas laterales, mientras que los aminoácidos de las posiciones g y e suelen formar interacciones electrostáticas cruzadas entre las dos hélices. *Modificado de Li et al., 2019 y Dröge-Laser et al., 2018.*

Desde un punto de vista funcional, los bZIP regulan diferentes procesos fundamentales en plantas, como la diferenciación de órganos y tejidos (p. ej., Silveira

et al., 2007), la elongación celular (p. ej., Fukazawa et al., 2000), el control del balance nitrógeno/carbono (p. ej., Weltmeier et al., 2006), el metabolismo energético (p. ej., Baena-González et al., 2007), diferentes mecanismos de UPR (p. ej., Adhikari et al., 2025), la señalización mediada por hormonas y azúcares (p. ej., Finkelstein & Lynch, 2000), la respuesta a la luz (p. ej., Ulm et al., 2004), el control osmótico (p. ej., Satoh et al., 2004), la regulación de la acumulación de reservas en semilla (p. ej., Lara et al., 2003), y la defensa frente a patógenos (p. ej., Song et al., 2022). Esto pone de relevancia su importancia en la biología y adaptación de las plantas, especialmente en el contexto de la colonización del medio terrestre. Los miembros de la familia bZIP tienen mecanismos de acción complejos y diversos, pero parece que la fosforilación de serinas conservadas dentro del dominio de unión a ADN sería un mecanismo general de control fino de la actividad de los miembros de esta familia de TFs (Kirchler et al., 2010).

1.5.3. Respuesta a estrés biótico

Las respuestas de defensa de las plantas se activan tras el reconocimiento del patógeno, a través de dos vías: (i) la inmunidad desencadenada por patrones moleculares asociados a patógenos (PTI, *pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity*) a través de un sistema de reconocimiento basado en receptores, y (ii) la inmunidad desencadenada por efectores (ETI, *effector triggered immunity*) a través de la interacción directa o indirecta entre los productos de los genes de resistencia (R) y las proteínas efectoras producidas por el patógeno (Jones & Dangl, 2006). Tras el reconocimiento se activa una cascada de señalización mediada por fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) a través de complejas interacciones en sus redes de señalización, muchas veces interconectadas (Alves et al., 2013; Loake & Grant, 2007). Las rutas de señalización mediadas por SA se activan principalmente ante patógenos biotrofos y hemibiotrofos estableciendo la resistencia sistémica adquirida (Shah, 2003). Las cascadas de

señalización mediadas por JA y ET, por su parte, responden al ataque de patógenos necrotróficos, insectos, herbívoros y daño mecánico (Howe & Jander, 2008).

La clase TGA (TGACGTCA *cis-element-binding proteins*) de proteínas bZIP pertenece a la subfamilia D y juega un papel clave en la señalización mediada por SA en respuesta a estrés biótico, además de participar en desarrollo (Alves et al., 2013). Ante el ataque de un patógeno, se sintetiza SA y se induce un cambio en el estado redox celular mediante la acumulación de ROS. Las ROS promueven la monomerización de NPR1 (*Non-expresser of pathogenesis-related genes 1*) y su translocación a núcleo. En el núcleo, NPR1 forma complejo con los TFs de clase TGA, y adquieren afinidad por las regiones promotoras de genes regulados por SA (Alves et al., 2013). También se ha demostrado la interacción de los factores TGA con miembros de la familia de TFs WRKY (Van Verk et al., 2011).

En cuanto a la relación con patógenos, se ha demostrado que el factor bZIP59 de *A. thaliana* juega un papel clave en la regulación de la apertura estomática en respuesta a patógenos. bZIP59 se expresa de forma constitutiva en las células guarda donde actúa aguas arriba de ROS y aguas abajo del SA en el cierre estomático inducido por flg22. Sin embargo, en las células del mesófilo, bZIP59 activaría la señalización por SA, facilitando la infección mediada por virus como TMV (Tobacco mosaic virus) (Song et al., 2022). Por otro lado, estudios en vid (*Vitis vinífera*) han mostrado como *Plasmopara viticola* secreta una serie de efectores durante la colonización del huésped encargados de bloquear la capacidad de unión a ADN de distintos TFs de la familia bZIP, entre los que destaca VvHY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5); esto suprime la producción de ROS, la deposición de calosa y la muerte celular (Liu et al., 2025).

En tomate, se han caracterizado dos proteínas de la familia bZIP pertenecientes al subgrupo AREB/ABF (*ABA-responsive element-binding factors*). Estos TFs son inducidos por sequía y salinidad, y su sobreexpresión otorga una gran tolerancia a estos estreses. Notablemente, diferentes proteínas asociadas a estrés biótico también son inducidas en el mutante de sobreexpresión. Esto sugiere que los

factores bZIP-AREB/ABF estarían involucrados en la señalización por ABA como respuesta a estrés abiótico y posiblemente también en respuesta a patógenos a través de una interconexión entre las respuestas a estrés biótico y abiótico (Orellana et al., 2010; Xu et al., 2022). Estos TFs también tienen un papel clave en la maduración de los frutos de tomate (Y. He et al., 2023).

Un factor bien caracterizado en tomate es SlbZIP60, en su papel como vía principal de UPR y su relación con la infección viral. SlbZIP60 se encuentra anclado a las membranas del ER y se activa mediante un proceso de *splicing* no canónico mediado por IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*) -una de las proteínas sensoras de este estrés en ER- en el ARNm de bZIP60. Este *splicing* del ARNm provoca un cambio en la pauta de lectura que elimina el fragmento transmembrana de la proteína SlbZIP60. El TF funcional se transloca a núcleo donde activa genes implicados en la homeostasis proteica y mitigación del estrés en el ER (Herath et al., 2020; Zhang et al., 2015). La proteína SlbZIP60 con el fragmento transmembrana sería degradada por el proteosoma en una renovación continua, aunque también podría sufrir proteólisis liberando el TF para mantener una respuesta basal (Parra-Rojas et al., 2015). La proteína TGB3 de PVX induce estrés en el ER lo que activa la UPR, elevando la expresión de SlbZIP60 y chaperonas como BiP. La mitigación del estrés en el ER facilita la infección viral al reducir el daño citotóxico y la activación de rutas de señalización. Además, la señalización mediada por SlbZIP60 regula proteínas implicadas en la degradación proteica, como SKP1, modulando así la homeostasis proteica asociada a la infección viral (Adhikari et al., 2025b; Herath et al., 2020; Ye et al., 2011). También se ha caracterizado una ruta paralela de UPR mediada por los TFs bZIP17/bZIP28, aunque, en principio, no juega un papel detectable durante la infección viral (Zhang et al., 2015). Sin embargo, en estudios posteriores se observó un papel complejo de ambas rutas de UPR mediadas por bZIP ante la infección viral. Mientras que bZIP17 y bZIP60 participan en la reducción de la infección por potexvirus como; bZIP28 y bZIP60 juegan un papel en la infección por potyvirus

como TuMV (Turnip mosaic virus) (Gayral et al., 2020).

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido estudiar las funciones de la proteína TGB1 de PepMV, con el fin de aumentar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la infección. La TGB1 de potexvirus es una proteína multifuncional con papeles clave en diferentes estadios de la infección, y la única soluble del TGB, que es un módulo génico esencial para el movimiento viral y prescindible para la replicación, traducción y encapsidación del genoma del virus. De las diferentes funciones descritas para la TGB1 de potexvirus, para PepMV sólo se ha demostrado su papel como supresor del silenciamiento de ARN, mientras que el resto de funciones y propiedades han sido asumidas por homología con proteínas mejor caracterizadas. Además, de entre las diferentes funciones de la TGB1, el papel que esta proteína pueda tener en el núcleo no ha sido caracterizado para PepMV ni para otros virus relacionados. Por ello, la principal pregunta que ha intentado responder esta tesis doctoral ha sido ¿Cuál es el sentido biológico de la localización nuclear de la TGB1 de un virus citoplasmático? Para darle respuesta se emplearon dos enfoques: 1) Desde el virus, caracterizando la TGB1 de PepMV, con un énfasis especial en el análisis de su localización subcelular y 2), desde el huésped, identificando y caracterizando interactores nucleares de la TGB1. Por tanto, los objetivos específicos de esta tesis doctoral han sido:

1- Estudiar la TGB1 de PepMV con un interés principal en su localización nuclear.

- a. Estudio in silico de la secuencia de aminoácidos.
- b. Estudio de su localización subcelular.

2- Identificación y caracterización de interactores nucleares de la TGB1 de PepMV.

- a. Identificación de interactores putativos mediante Y2H.
- b. Validación de la interacción entre la TGB1 e interactores de localización nuclear del huésped.
- c. Caracterización funcional de los interactores identificados.

Materiales y Métodos

3.1. Material biológico

3.1.1. Inóculo viral

El aislado de PepMV utilizado a lo largo de esta tesis doctoral fue PepMV Sp13 (Aguilar et al., 2002), perteneciente al tipo genético mayoritario EU y depositado en la base de datos del NCBI (*National center for biotechnology information*) bajo el número de acceso RefSeq NC 004067.1.

Como iniciador de las infecciones en plantas de *Nicotiana benthamiana* D. se utilizaron los clones agroinfectivos PepMV-WT, previamente nombrado pJL89-PepMV (Méndez-López & Aranda, 2023), que expresa una copia silvestre de PepMV Sp13, PepMV-TagRFP (Alcaide & Aranda, 2023) y PepMV-GFP, previamente nombrado PepGFPm2 (Alcaide & Aranda, 2023; Ruiz-Ramón et al., 2019), que expresan la CP del virus fusionada a la proteína fluorescente TagRFP y GFP, respectivamente.

Como fuente de inóculo en los ensayos de susceptibilidad en plantas de tomate se utilizó virión purificado de plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con el clon PepMV-WT.

3.1.2. Material vegetal

Las plantas de *N. benthamiana* y tomate cv MicroTom empleadas a lo largo de esta tesis doctoral se cultivaron en cámaras de cultivo con condiciones controladas de aproximadamente 25 °C día y 18 °C noche, en un ciclo día/noche de 16/8 h, y humedad relativa de aproximadamente 60%. Las semillas de tomate fueron pregerminadas en placas de Petri con papel de filtro humedecido a 28 °C durante 72 horas en agitación suave. Las semillas de *N. benthamiana* fueron pregerminadas en semilleros directamente sobre sustrato durante una semana. Posteriormente, las

plántulas tanto de tomate como de *N. benthamiana* fueron trasplantadas a macetas individuales (9x9x10 cm) con sustrato suplementado con vermiculita en proporción 3:1.

3.1.3. Bacterias

La multiplicación de las diferentes construcciones de ADN se realizó en la cepa TOP10 de *Escherichia coli*. Para la transformación estable de plantas de *Solanum lycopersicum* L. cv MicroTom se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, mientras que para la transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana* se optó por la cepa C58C1. La cepa de *A. tumefaciens* GV3101 suplementada con el plásmido pSOUP se transformó con los plásmidos generados por Greengate.

3.2. Construcciones de ADN

Para clonar las secuencias codificantes (CDS, *coding sequence*) de transcritos de tomate, se extrajo ARN total de hojas de tomate cv MicroTom con el reactivo TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.). Estas preparaciones se emplearon como molde en reacciones de transcripción reversa (RT) con la enzima Expand Reverse Transcriptase (Roche Applied Science) y un oligodT. El cDNA resultante se utilizó para amplificar los genes específicos mediante PCR con la polimerasa CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara®) y oligonucleótidos específicos para cada uno de los CDS. Para la amplificación de secuencias virales se utilizó el plásmido PepMV-WT como molde y la polimerasa CloneAmp HiFi PCR Premix (Takara®). Todas las reacciones mencionadas se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los distintos oligonucleótidos utilizados a lo largo de esta tesis doctoral se describen en el Anexo I.

Todos los productos de PCR se fraccionaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7-2%. La banda de interés se escindió del gel y se purificó mediante

columnas NZY Gelpure (NZYtech®). Todos los plásmidos fueron multiplicados en *E. coli* y se purificaron mediante columnas NZYSpeedy Miniprep (NZYtech®). Previamente a la transformación de *A. tumefaciens*, todos los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la correcta inserción de la CDS de interés.

3.2.1. Construcciones generadas para el escrutinio de Y2H

El plásmido pLexA-TGB1 generado para el escrutinio de la genoteca de cDNA por doble híbrido de levadura (Y2H) se generó mediante clonaje clásico mediado por enzimas de restricción. La CDS de la TGB1 se amplificó con una pareja de oligonucleótidos específica (Anexo 1) a partir del clon PepMV-WT. Los oligonucleótidos diseñados incluían un sitio de corte para la enzima *KpnI* en el extremo 5'. Tanto el plásmido pLexA-N como el amplicón de TGB1 fueron digeridos con la enzima *KpnI*. A continuación, el plásmido pLexA-N digerido se desfosforiló con la enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Thermo Fisher Scientific). La ligación entre el plásmido y el amplicón se llevó a cabo utilizando la enzima T4 ligasa (Promega); el plásmido resultante se multiplicó en *E. coli*. Tras confirmar la correcta secuencia y posición del inserto en el plásmido, se envió a la empresa Dualsystems Biotech (Zúrich, Suiza) para el escrutinio de Y2H.

3.2.2. Construcciones CRISPR/Cas9 para la transformación de explantos de tomate

Para la edición de los genes SIALOG1 y SlbZIP42 de las plantas de tomate cv. MicroTom mediante la tecnología CRISPR/Cas9 se generaron los plásmidos pA60-SIALOG1 y pA60-SlbZIP42, de acuerdo con el protocolo publicado anteriormente (Pechar et al., 2022); brevemente: Se diseñaron guías de ARN (gRNA) específicas y complementarias a la región diana de cada uno de los genes de tomate con ayuda de la aplicación Breaking Cas (Oliveros et al., 2016). Las guías fueron seleccionadas en base a múltiples criterios. Se seleccionaron de forma preferente las guías i) próximas al extremo 5' del CDS del gen, ii) que no presentaran dianas fuera del gen de interés

(*offtargets*), y iii) aquellas en que el gRNA fusionado al RNA *scaffold*, que une a la nucleasa Cas9, tuviera un plegamiento óptimo de acuerdo a lo descrito en la bibliografía (Liang et al., 2016). La predicción de la estructura secundaria del gRNA junto al RNA *scaffold* se llevó a cabo mediante el software MFold (Zuker, 2003).

Una vez seleccionada la secuencia guía óptima, se diseñó una pareja de oligonucleótidos solapantes con la secuencia de la guía (Anexo I), que al hibridar dejan en ambos extremos el sitio de corte *BbsI*, una enzima que deja extremos cohesivos tras digerir. Ambos oligonucleótidos de cada pareja se incubaron a 95 °C durante 5 min, y pasado el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente permitiendo la formación de dúplex de ADN. Seguidamente, los dúplex fueron digeridos con *BbsI* y clonados en el plásmido pA59 (pBS_KS_gRNA_BbsI, Abiopep SL) (Pechar et al., 2022), que incluye la secuencia *scaffold*, obteniendo así los plásmidos pA59-SIALOG1 y pA59-SlbZIP42. Los plásmidos pA59 creados y el plásmido binario pA60 (pK7_CAS9-TPC_MCS, Abiopep SL) (Pechar et al., 2022), que incluye la nucleasa Cas9 y el gen de resistencia en planta, fueron digeridos con *SpeI* y *KpnI*, obteniendo los plásmidos binarios pA60-SIALOG1 y pA60-SlbZIP42. Finalmente, alícuotas de *A. tumefaciens* GV3101 fueron transformadas con los plásmidos pA60 generados para la posterior transformación de explantos de tomate.

3.2.3. Construcciones generadas mediante el sistema Gateway

Los oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación de los distintos amplicones se diseñaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, quedando los amplicones con extremos compatibles con el plásmido donador (pDONR). Los amplicones fueron clonados mediante reacción Gateway BP Clonase II (Invitrogen) en el plásmido donador pDONR/Zeo (Invitrogen) obteniendo los diferentes clones de entrada (*Entry clone*). Posteriormente, los plásmidos de entrada se combinaron con el plásmido de destino (*Destination Vector*) para obtener los diferentes plásmidos de expresión (*Expression Clone*), mediante reacción Gateway

LR Clonase II (Invitrogen). Los oligonucleótidos utilizados y las construcciones generadas se resumen en el Anexo I.

Los distintos vectores binarios pGWBs empleados como plásmidos de destino se describen en detalle en la bibliografía (Nakagawa, Kurose, et al., 2007; Nakagawa, Suzuki, et al., 2007). *A. tumefaciens* C58C1 fue transformado con los plásmidos de expresión generados para la posterior transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana*.

3.2.4. Construcciones generadas mediante el sistema GreenGate

El sistema de clonaje GreenGate (Lampropoulos et al., 2013) fue empleado para la generación de las construcciones para los ensayos de BiFC. Este sistema se basa en la enzima *Bsa*I y la recombinación direccionada de fragmentos modulares de ADN, permitiendo la generación de construcciones multigénicas en una sola reacción de ligación de forma eficiente y económica. Brevemente: el cDNA de los genes de interés fue amplificado por PCR con unos oligonucleótidos que incluían extremos compatibles con los sitios de corte de la enzima, y posteriormente clonado en vectores de entrada GreenGate específicos utilizando la T4 ADN Ligase (Thermo Fisher Scientific). *E. coli* Top10 fue transformada con los plásmidos resultantes; se plaquearon en medio selectivo y se validó por digestión enzimática el clonaje. Finalmente se clonó en los vectores de destino combinando en una única reacción todos los módulos necesarios (promotor, N-fusión, gen de interés, C-fusión, terminador) junto con las enzimas *Bsa*I-HFv2 y la T4 DNA Ligase en un único paso de digestión-ligación cíclico (50 ciclos de 2 min a 37 °C y 5 min a 16 °C, seguido de 5 min a 50 °C y 5 min a 80 °C para la inactivación final). *E. coli* TOP10 fue transformada con el productor obtenido y se plaquearon en medio selectivo. Las colonias positivas se rescataron y se confirmó el correcto clonaje mediante el patrón tras digerir con enzimas de restricción y secuenciación. Finalmente, se transformó *A. tumefaciens* GV3101, suplementada con el plásmido pSOUP, con el plásmido final obtenido.

3.3. Análisis *in silico*

Las propiedades físicoquímicas de las proteínas y su composición de aminoácidos se predijeron con ProtParam (ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics), y los motivos de fosforilación mediante el *software* NetPhos 3.1. La identificación de dominios conservados se realizó mediante i-TASSER, InterProScan y la base de datos *Conserved Domain Database* (CDD-NCBI). Los posibles dominios de unión a ácidos nucleicos se predijeron mediante Pprint2 (*Prediction of Protein RNA-Interaction*).

La predicción de la localización subcelular de las proteínas, así como la identificación de péptidos señal, se llevó a cabo mediante DeepLoc2.0, LocNES y NoD (*Nucleolar localization sequence Detector*). Las posibles regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) se identificaron con el algoritmo PONDR VL-XT, que predice residuos desordenados a través de redes neuronales entrenadas con proteínas caracterizadas experimentalmente. Las predicciones estructurales tridimensionales se realizaron mediante AlphaFold-Server.

Se emplearon las bases de datos Sol Genomics Network, GenBank, Ensembl-Plants y TomExpress. Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaron con Clustal-Omega.

Los alineamientos múltiples para los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el algoritmo MUSCLE. El modelo de sustitución óptimo se determinó mediante MEGA11. Los distintos árboles filogenéticos se construyeron mediante el método de máxima verosimilitud con el software RAxML-NG, empleando el modelo de sustitución óptimo. La robustez estadística de las ramas de los árboles se estimó mediante remuestreo (*bootstrap*); los valores de *bootstrap* fueron calculados en base a 1000 réplicas.

Los programas utilizados incluyeron R, para el análisis estadístico, SnapGene, para la gestión y edición de secuencias, Inkscape y OMERO, para la generación y edición de figuras. Los gráficos a escala de los diferentes mutantes de SIALOG1 se

generaron con R gracias al paquete “drawProteins” y “ggplot2”, el cual también fue utilizado para la generación de gráficos.

3.4. Purificación de PepMV

La purificación del virus se realizó a partir de material vegetal de *N. benthamiana* infectado con PepMV; la infección se inició con el clon agroinfectivo PepMV-WT. A los 14 dpi se recolectó todo el material vegetal infectado sistémicamente y se procedió a la purificación de viriones de PepMV de acuerdo a la metodología descrita previamente (AbouHaidar et al., 1998) con leves modificaciones. El material infectado se trituró en un mortero con nitrógeno líquido y 2 mL de tampón de homogeneización (Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0; 2-mercaptoetanol 0,2%; tioglicolato sódico 0,01 M) por gramo de material vegetal. El homogeneizado se filtró a través de varias capas de gasa, se añadió Triton-X-100 (1% v/v) y se incubó en agitación constante a 4 °C durante 15 min. Tras la incubación, se añadió cloroformo hasta una concentración final del 25% del volumen y se incubó a 4 °C en agitación constante. Transcurridos 30 min de incubación, se centrifugó la muestra a 12.000 xg durante 15 min a 4 °C, se recuperó la fase acuosa y se le añadió PEG 6.000 hasta alcanzar una concentración final del 5% (p/v). La muestra se incubó durante 60 min a 4 °C en agitación constante y posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y el concentrado resultante se resuspendió en Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0 con Triton-X-100 1%. La muestra se sometió a ultracentrifugación a 86.500 x g durante 3 h a 4 °C, sobre colchones de sacarosa al 30%. El concentrado final se resuspendió en Tris-ácido cítrico 0,1 M pH 8,0 previamente filtrado. La concentración de partículas virales se estimó mediante densitometría a 260 nm empleando el coeficiente de extinción $\epsilon_{0,1\%} = 2,9$ (AbouHaidar et al., 1998). Los viriones purificados se conservaron en el tampón de resuspensión a 4 °C.

3.5. Genoteca de cDNA y escrutinio de doble híbrido en levadura

La genoteca normalizada de cDNA de plantas de tomate sanas e infectadas por PepMV fue construida por Evrogen (Moscú, Rusia), y el escrutinio de doble híbrido en levadura (Y2H) llevado a cabo por Dualsystems Biotech (Zúrich, Suiza) siguiendo sus protocolos internos.

La genoteca de cDNA normalizada empleada en el escrutinio de Y2H se realizó a partir de plantas de tomate (CV. Money Maker) inoculadas en estadio de cuatro hojas verdaderas totalmente expandidas. A 1 dpi, se recolectaron las hojas inoculadas de 6 plantas y las equivalentes de plantas sanas. Este mismo procedimiento se repitió a 3 y 15 dpi. Adicionalmente, a 15 dpi, se recolectaron las hojas superiores de 12 plantas sanas y 12 infectadas. Se extrajo el RNA total del material vegetal recolectado empleando TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.). Las muestras de RNA fueron enviadas a Evrogen (Moscú, Rusia) para la generación de las genotecas de acuerdo a sus protocolos internos. Tras la transcripción reversa, el cDNA de longitud completa se normalizó mediante nucleasas específicas de dúplex (Zhulidov et al., 2004), para reducir la redundancia de transcritos altamente expresados. La librería normalizada de cDNA fue enviada a las instalaciones de Dualsystems Biotech (Zurich, Switzerland) donde se insertó en los plásmidos presa pGAD-HA de expresión en levadura que confieren prototrofia a leucina.

En paralelo, levaduras de la cepa NMY51 fueron transformadas con las construcciones pLexA-TGB1 que confieren la prototrofia al triptófano. Estos fueron cultivados en medio *synthetic defined* (SD) carente de leucina, triptófano e histidina (SD-leu/-trp/-his) con diferentes concentraciones de 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) para establecer el medio de escrutinio óptimo sin autoactivación de los genes reporteros mediada por las construcciones cebo. Se determinó como medio óptimo de escrutinio el medio SD-leu/-trp/-his + 1 mM 3-AT.

El plásmido pLexA-TGB1 y alícuotas de la librería normalizada de cDNA insertada en los pGAD-HA se usaron para cotransformar levaduras NMY51 (protocolo interno Dualsystems Biotech). Estos cultivos fueron incubados en medio SD-leu/-trp/-his + 1 mM de 3-AT en placas de escrutinio. Se escutaron unos $3,7 \times 10^6$ cotransformantes, de los cuales se obtuvieron 83 clones primarios protótrofos para la histidina. Estos clones positivos fueron transferidos a medio de escrutinio líquido y sometidos a 5 pases de subcultivo para desechar posibles escapes. Así, se obtuvieron 50 clones secundarios protótrofos para la histidina y beta-galactosidasa positivos. De estos 50, 34 de los plásmidos presa fueron aislados, multiplicados en *E. coli* y secuenciados.

3.6. Purificación de núcleos

El aislamiento de núcleos a partir de material foliar de *N. benthamiana* se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente (Sikorskaite et al., 2013) con leves modificaciones. Brevemente: 4-5 g de material vegetal fresco se machacó con un mortero en presencia de nitrógeno líquido (N_2) hasta obtener un polvo muy fino, que se resuspendió en 10 volúmenes de NIB (MES-KOH 50 mM pH 5,4; NaCl 50 mM; KCl 50 mM; EDTA 12,5 mM; sacarosa 1,25 M; DTT 1 mM; cóctel inhibidor de proteasas) + 1% PVP. El homogeneizado se filtró a través de varias capas de gasa humedecidas en NIB. Al filtrado se le añadió Triton X-100 al 10% gota a gota hasta una concentración final de 0,5% y se mantuvo en agitación suave a 4 °C durante 20 min. Pasado el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó a 1.000 xg durante 10 min y se resuspendió el pellet resultante en 10 mL de NIB. La muestra resultante se cargó sobre un gradiente de densidad formado por 5 mL de Percoll 60% sobre 5 mL de sacarosa 2,5 M. El gradiente se sometió a centrifugación a 1.000 xg a 4 °C durante 30 min en un rotor basculante con frenado suave. Tras este paso se recuperó la fase enriquecida en la fracción nuclear. La suspensión de Percoll diluido se resuspendió en cinco volúmenes de NIB + 0,5 % de Triton X-100 y se incubó en agitación suave durante 10 min. La muestra se centrifugó a 1.000 xg durante 10 min y el pellet

resultante se resuspendió en 5 mL de NIB, los cuales se cargaron sobre 5 mL de Percoll 35% y se sometió a centrifugación a 1.000 xg durante 10 min. Finalmente, el pellet de núcleos obtenido se lavó con 5 mL de NIB y se almacenó a -70 °C en storage buffer (Glicerol 20%; HEPES-KOH 20 mM pH 7,2; MgCl₂ 5 mM; DTT 1 mM) hasta su uso. Las soluciones de Percoll se realizaron en tampón NIB, no en agua.

3.7. SDS-PAGE y Western blot

Las muestras se mezclaron con tampón Laemmli 5x (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM; Glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,01%; 2-mercaptoetanol 5%) y se cargaron 20 µL en un SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protran 0,45 µm NC (GE Healthcare Life Sciences) mediante transferencia semi-seca. Las membranas: i) se bloquearon incubándolas durante 3 horas en una suspensión de leche en polvo desnatada al 5%, ii) se incubaron con el anticuerpo primario específico para la etiqueta molecular; anti-GFP y anti-mRFP (ChromoTek[®]), iii) se lavaron varias veces, iv) se incubaron con anticuerpo secundario (anti-IgG) específico del organismo en el que se generó el primario conjugados con la peroxidasa de rábano (Promega), v) se incubaron con el sustrato quimioluminiscente (ECL) (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). La señal de quimioluminiscencia se obtuvo mediante un equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

3.8. Transformación de plantas

3.8.1. Transformación transitoria de plantas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración

Los clones de *A. tumefaciens* criopreservados en glycerol a -80 °C que contenían cada una de las construcciones de interés se refrescaron en placas de

medio Luria-Bertani (LB) agar con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28 °C durante 48 h. El cultivo crecido en placa se inoculó en 10 mL de LB líquido con los antibióticos correspondientes y se incubó a 28 °C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,6 y 0,9. Una vez alcanzada la DO_{600} óptima, el cultivo se centrifugó a 2.500 xg 10 min y el pellet resultante se resuspendió en la mitad del volumen original de tampón de agroinfiltración (MES 10 mM pH 5,5; $MgCl_2$ 10 mM; acetosiringona 100 mM). La suspensión de bacterias se incubó a 25 °C en agitación constante durante 3-4 h para inducir la expresión de los genes *vir*.

Finalmente, hojas totalmente expandidas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad fueron agroinfiltradas con los distintos cultivos de *A. tumefaciens* que contenían cada una de las construcciones de interés, ajustando la DO_{600} final según el tipo de proteína: proteínas de tomate o virales ($DO_{600} = 0.2$), y clones virales o la proteína P19 ($DO_{600} = 0.1$). La proteína P19 del virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV, tomato bushy stunt virus; especie *Tombusvirus lycopersici*) se empleó como supresor del silenciamiento en agroinfiltraciones desprovistas de clones virales agroinfectivos. En los casos en los que se utilizó una mezcla de cultivos de *A. tumefaciens* se ajustaron las DO_{600} para no superar una DO_{600} final de 0,5. Para la infiltración de las hojas se emplearon jeringuillas sin aguja y se infiltraron las hojas aplicando presión sobre el envés de las mismas.

3.8.2. Transformación estable de tomate cv. MicroTom y obtención de plantas editadas por CRISPR/Cas9

La generación de mutantes CRISPR/Cas9 para los genes *SIALOG1* y *SibZIP42* en tomate cv. MicroTom se hizo de acuerdo al protocolo de transformación descrito previamente (Van Eck et al., 2006). Brevemente, semillas esterilizadas de MicroTom fueron pregerminadas y posteriormente transferidas a medio de germinación sólido (Murashige y Skoog basalt salt (MS) 4,3 g/L; sacarosa 10 g/L; agar 5 g/L) ajustando el

pH final a 5,7 e incubadas a 26 °C con un ciclo luz/oscuridad de 16/8 h y humedad relativa del 50% durante 72 h.

El cultivo de *A. tumefaciens*, cepa GV3101 transformada con el plásmido pA60-SIALOG1 o pA60-SlbZIP42, que expresan el gRNA y la nucleoproteína Cas9, crecieron hasta una DO₆₀₀ de 0,4. El cultivo bacteriano fue precipitado a 2.500 xg durante 10 min y resuspendido en el mismo volumen del cultivo inicial de tampón SIM (citrato sódico 20 mM; sacarosa 2%) ajustando el pH final a 5,5. El cultivo se incubó durante 3 h a 25 °C en agitación constante para inducir el cultivo.

Secciones de cotiledones de las plántulas de 6 días preincubadas en medio de cocultivo (MS 4.3 g/L; sacarosa 30 g/L; KH₂PO₄ 200 mg/L; mio-inositol 100 mg/L; tiamina-HCl 1,3 mg/L; ácido indolacético 0,5 mg/L; kinetina 0,1 mg/L; acetosiringona 100 µM) ajustando el pH final a 5,5, durante 48 h a 28 °C en oscuridad. Tras las 48 h, las secciones de cotiledón se incubaron en medio de cocultivo junto a la suspensión de *A. tumefaciens* previamente descrita, durante 10 min. Transcurrido este tiempo, las secciones de cotiledón se secaron en papel de filtro estéril, y se mantuvieron en medio de cocultivo sólido (medio de cocultivo; agar 5 g/L) durante 48 h a 26 °C en oscuridad. A continuación, las células de *A. tumefaciens* se eliminaron de las secciones de cotiledón con sucesivos lavados con medio de cocultivo con timentina (Duchefa Biochemie), y se transfirieron a medio de regeneración/selección sólido (MS 4,3 g/L; sacarosa 30 g/L; Mio-inositol 100 mg/L; vitaminas Nitsch (1.000x) 1 mL/L; ácido indolacético 0,1 mg/L; Zeatina 2 mg/L; Timentina 400 mg/L; Kanamicina 100 mg/L) ajustando el pH final a 6,0, donde se incubaron a 26 °C con ciclo luz/oscuridad de 16/8 h. Tras dos semanas de cultivo en medio de regeneración aparecieron las primeras yemas, las cuales fueron subcultivadas en medio de regeneración/selección sólido y zeatina. Este proceso se repitió cada tres semanas con la mitad de la concentración de zeatina que en el pase anterior. Cuando las yemas alcanzaron un tamaño aproximado de 15 mm, fueron transferidas a medio de enraizamiento selectivo sólido (MS 4,3 g/L; sacarosa 20 g/L; mio-inositol 100 mg/L; Tiamina HCl 1 mg/L; ácido indolacético 0,1 mg/L; Timentina 300 mg/L; Kanamicina 100 mg/L)

ajustando el pH final a 5,7. Las plántulas regeneradas fueron subcultivadas cada tres semanas cortando los tallos y nudos y sembrándolos en medio de enraizamiento selectivo nuevo. Tras repetir este proceso de subcultivo 3 veces, 4 plántulas con fenotipo silvestre fueron rescatadas y transferidas a macetas con sustrato, donde se aclimataron en una cámara de cultivo.

La edición del gen *SLALOG1* o *SlbZIP42* se verificó en la generación T1 mediante PCR directa de tejido con la polimerasa Phire Tissue direct PCR (Thermo Scientific) y posterior secuenciación del amplicón. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas en los genotipados están listadas en el Anexo I. Se seleccionaron plantas con la edición deseada en homocigosis de las cuales se obtuvo la generación T2. Se recogieron las semillas de los frutos T2 autofecundados para obtener la generación T3 y posteriores. Se obtuvieron líneas editadas *transgene-free* mediante segregación.

3.9. Ensayos de susceptibilidad a PepMV

Para los experimentos de susceptibilidad a PepMV se emplearon plántulas de tomate cv. MicroTom de 3 semanas de edad, germinadas y cultivadas como se indicó previamente. Para estos experimentos se emplearon los genotipos mutantes *slalog1* y *slbzip42* de generación T3 o superior -para asegurar la estabilidad del genoma- y el genotipo silvestre de mismo fondo genético. Para cada uno de los ensayos se emplearon al menos 10 plantas de cada genotipo, las cuales fueron genotipadas individualmente. Las plantas de tomate fueron inoculadas mecánicamente con una suspensión de virión purificado a 0,1 mg/mL en tampón fosfato 10 mM pH 8,0. Para la inoculación mecánica se espolvorearon las dos primeras hojas verdaderas totalmente expandidas de plantas con un tamaño de 3-4 hojas con carborundum como agente abrasivo y se frotaron con 10 µL/hoja de la suspensión de virión. Este procedimiento se repitió en las plantas mock inoculadas empleando el tampón de inoculación sin virión.

A 14 dpi se recolectó todo el material foliar evitando las hojas inoculadas de cada planta de forma individual, así como el material equivalente de tres plantas control mock-inoculadas por genotipo. El material vegetal se congeló en N₂ y se procedió a la extracción de ARN total mediante TRI reagent (Molecular Research Center, Inc). El ARN, se purificó con fenol:cloroformo seguido de una precipitación etanólica. Una alícuota de las muestras fue tratada con DNase I (Sigma-Aldrich). Para comprobar la cantidad e integridad de los ARNs se emplearon geles de agarosa. Los RNAs fueron normalizados con ayuda de un NanoDrop One (Thermo Scientific). Estas muestras fueron empleadas para la cuantificación viral mediante RT-qPCR con el kit One-step NZYSpeedy RT-qPCR Green, ROX plus (NZYTech®). La reacción final de RT-qPCR se realizó en 10 µL de volumen final, con 2 µL de RNA total a una concentración de 10 ng/µL y los oligonucleótidos a una concentración final de 5 µM. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un equipo StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para la cuantificación relativa se empleó la subunidad 25S del ARN ribosómico como gen endógeno de referencia cuando se cuantificó ARN viral, mientras que cuando la cuantificación se realizó sobre ARN propio de la planta huésped se empleó el factor de elongación eucariota 1-alfa (eEF1A) como gen endógeno de referencia. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo se listan en el Anexo I.

3.10. Microscopía laser confocal de células vivas

Para estudiar las localizaciones de las diferentes proteínas estudiadas se empleó el huésped experimental *N. benthamiana*. Diferentes alícuotas de *A. tumefaciens* fueron transformadas con las distintas construcciones generadas para expresar las proteínas de interés fusionadas a proteínas fluorescentes, y se agroinfiltraron en las plantas de *N. benthamiana* tal y como se indicó previamente. 3 días tras la agroinfiltración se visualizaron las muestras vegetales mediante el equipo STELLARIS Confocal Microscope Platform (Leica®). Las muestras observadas se prepararon de la siguiente forma: Se seccionó un fragmento de 1 x 1 cm

aproximadamente de la parte agroinfiltrada de la hoja utilizando la punta de un bisturí. Este fragmento se incubó durante 5 min en PFD (Octadecafluorodecahydronaphthalene) (Sigma-Aldrich), una sustancia sin tensión superficial que se infiltra en el tejido eliminando cualquier burbuja de aire que haya en el tejido, además el índice de refracción de esta sustancia es cercano al de los tejidos biológicos reduciendo la dispersión y reflexión de la luz en la muestra y mejorando así la imagen. El PFD es una sustancia químicamente inerte, no tóxica y no miscible en agua, por lo que presenta unas características que la hacen óptima para cubrir el tejido vegetal sin deshidratarlo ni alterarlo.

Los portaobjetos se prepararon con un fragmento de cinta de doble cara en la base y dos fragmentos más pequeños a los lados, dejando un espacio entre estos aproximadamente del mismo tamaño que la muestra. Tras 5 min, la muestra se colocó entre los dos fragmentos pequeños de cinta de doble cara fijada con el fragmento de cinta de doble cara que se colocó en la base. Se añadió una pequeña gota de PFD y se colocó el cubreobjetos #1.5 sobre la muestra con cuidado de no generar burbujas.

Para confirmar la identidad de las estructuras subcelulares observadas, se emplearon marcadores específicos. La CP de PepMV fue empleada como marcador de los VROs, ya que su reclutamiento a estas estructuras durante la infección ha sido ampliamente descrito en la bibliografía (Alcaide et al., 2023; Alcaide & Aranda, 2023; Méndez-López et al., 2023; Ruiz-Ramón et al., 2023). Los PD se identificaron de forma indirecta mediante la tinción específica de los depósitos de calosa con el tinte azul de anilina (0,05% en tampón fosfato, pH 8).

Las muestras fueron visualizadas con el objetivo de inmersión 63X Gly. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron: 405 nm para azul de anilina; 488 nm para GFP; 514 nm para EYFP; 561 nm para mRFP. Los rangos de emisión fueron optimizados para cada una de las proteínas fluorescentes. Las imágenes fueron tomadas con un barrido secuencial en todos los casos donde se visualizó más de una proteína para evitar posibles contaminaciones entre canales. Las imágenes se

tomaron empleando el software LasX (Leica) y las figuras de imágenes de confocal se construyeron gracias al software Open Microscopy Environment Remote Objects (OMERO)

3.11. FRET-FLIM

Para la técnica FRET-FLIM (*Förster resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy*) se empleó la proteína verde fluorescente (GFP) como donador y la proteína roja monomérica fluorescente (mRFP) como aceptor. Las construcciones utilizadas fueron TGB1-GFP, SIALOG1-mRFP, SlbZIP42-mRFP y el clon agroinfectivo PepMV-WT. Las construcciones fueron expresadas de forma transitoria en células epidérmicas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración. A 3 dpa se procedió al análisis de imágenes. La adquisición de imágenes FLIM se realizó mediante conteo de fotones individuales correlacionados en el tiempo (TCSPC) utilizando un microscopio confocal equipado con láser pulsado. El tiempo de vida de fluorescencia del donador se determinó mediante ajuste exponencial de curvas de decaimiento de fluorescencia. Se incluyeron los controles negativos TGB1-GFP, GFP-EV y TGB1-GFP+mRFP-EV en células tanto sanas como infectadas. Se realizaron mediciones múltiples ($n > 20$) para cada combinación experimental. El análisis se realizó mediante el software SymPhoTime (PicoQuant).

3.12. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de un factor (*one-way* ANOVA) para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Los datos fueron sometidos previamente a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas para confirmar el cumplimiento de los supuestos de ANOVA. Tras la identificación de diferencias significativas ($pval < 0,05$) se aplicó un test post-hoc Tukey para comparaciones pareadas entre grupos. Los análisis se realizaron con el software R.

3.13. RNA-seq

Se extrajo el RNA total de doce plantas individuales sanas e infectadas con PepMV de los genotipos silvestre (WT) y mutantes (*slalog1* y *slbzip42*), a 7 dpi con TRI reagent (Molecular Research Center, Inc). Se generaron tres librerías independientes para cada tratamiento combinando material proveniente de tres extracciones independientes de plantas individuales. Con esta estrategia experimental se pretende obtener un perfil transcriptómico representativo y, al mismo tiempo, minimizar la variabilidad biológica inherente al sistema experimental. A partir de estas muestras agrupadas se construyeron las librerías y se realizó el experimento de RNA-seq.

Las tres librerías independientes por cada tratamiento se construyeron utilizando el kit True Seq Stranded Total RNA with plant rRNA depletion kit (Macrogen) y fueron secuenciadas mediante la plataforma Illumina NovaSeq6000 (Macrogen) para obtener lecturas de 150 pb de extremos pareados (paired-end), con un rendimiento de entre 107 y 226 millones de lecturas por muestra. Las secuencias obtenidas de la plataforma de secuenciación fueron filtradas por calidad y posteriormente se mapearon contra el genoma de referencia de *S. lycopersicum* (ITAG2.3). De las secuencias obtenidas se conservó más del 99% tras el filtrado por calidad, y de estas del 31 al 50% mapearon de forma única contra el genoma.

La calidad de las lecturas crudas se evaluó utilizando FastQC (Andrews, 2010), considerando lecturas de baja calidad aquellas con un QC < 30 y longitud < 70 pb. Los adaptadores y las lecturas de baja calidad se eliminaron con Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Un segundo control de calidad de las lecturas filtradas se llevó a cabo con FastQC y la reconstitución de las lecturas pareadas fue llevada a cabo con BMAP. Las lecturas filtradas fueron alineadas contra el genoma de tomate (ITAG2.4) utilizando el algoritmo MEM del software BWA (Li & Durbin, 2009) permitiendo ningún desajuste (Langmead et al., 2009). La calidad del mapeo se analizó con Qualimap bamqc (García-Alcalde et al., 2012). Para todas las comparaciones, el número de lecturas fue normalizado a FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads)

usando el paquete DESeq2 de R, implementado en la sRNAtoolbox (Aparicio-Puerta et al., 2019) con un $p_{adj} < 0,05$. El nivel de expresión génica, número de lecturas, fue normalizado mediante el método de fragmentos por kilobase por millón de lecturas alineadas (FPKMs). Se consideraron como genes expresados aquellos con valores de FPKM superiores a 1 en al menos uno de los tratamientos analizados. Las lecturas que mapearon sobre los mRNAs del tomate se cuantificaron utilizando la función FeatureCounts del paquete Rsubread. Se generaron diagramas de Venn para los diferentes tratamientos utilizando el paquete VennDiagram de R.

El análisis de la ontología génica (términos GO) se llevó a cabo mediante el paquete Goseq de R. Los análisis de componentes principales (PCA) se realizaron utilizando funciones básicas de R y se graficaron con el paquete factoextra de R, a partir de los conteos normalizados en lecturas por millón de lecturas mapeadas (RPMs). El agrupamiento de las muestras en grupos jerárquicos se efectuó con la función hclust de R empleando las correlaciones de Pearson. Una vez definidos los clusters de genes, se analizó el enriquecimiento en términos GO de cada uno de ellos mediante el paquete Goseq de R. Los distintos heatmaps se construyeron con el paquete pheatmap de R.

Resultados

4.1. Estudio de la TGB1 de PepMV

La TGB1 es una proteína representativa de la familia *Alphaflexiviridae*. La localización subcelular de la TGB1 de PepMV se ha supuesto principalmente a partir de estudios realizados con otros miembros del género *Potexvirus*, como PVX. Con el fin de estudiar este aspecto para PepMV, se hizo un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de esta proteína, y se determinó su distribución subcelular mediante microscopía láser confocal de barrido (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*).

4.1.1. Análisis in silico de la secuencia de aminoácidos de la TGB1 de PepMV

Con el objetivo de contextualizar evolutivamente la TGB1 de PepMV dentro del género *Potexvirus*, se recopilaron las secuencias correspondientes al ORF2 de las 52 especies de potexvirus reconocidas en la actualidad por el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) y se estudiaron sus relaciones filogenéticas; se utilizó la secuencia del ORF2 de lolium latent virus (LoLV, especie *Lolavirus latensloli*) como miembro externo al grupo, ya que, de acuerdo con estudios previos en la familia *Alphaflexiviridae*, LoLV representa a la especie que codifica el TGB filogenéticamente más próximo al del género *Potexvirus* (Úbeda et al., 2025).

El árbol filogenético resultante situó la TGB1 de PepMV junto con las de potato aucuba mosaic virus (PAMV, especie *Potexvirus marmoraucuba*), cymbidium mosaic virus (CymMV, especie *Potexvirus cymbidii*), lettuce virus X (LeVX, especie *Potexvirus ecslactucae*), alstroemeria virus X (AlsVX, especie *Potexvirus ecsalstroemeriae*), narcissus mosaic virus (NMV, especie *Potexvirus narcissi*), malva mosaic virus (MaMV, especie *Potexvirus malvae*), plantain virus X (PLVX, *Potexvirus ecsplantagonis*) y asparagus virus 3 (AV3, *Potexvirus triasparagi*), con un valor de *bootstrap* del 96% (Figura 4.1). Por su parte, la TGB1 de PVX formó parte de un linaje independiente del resto de las TGB1s del género *Potexvirus* (Figura 4.1). La topología

obtenida es coherente con análisis previos de la familia *Alphaflexiviridae* basados tanto en la replicasa como la CP (Úbeda et al., 2025).

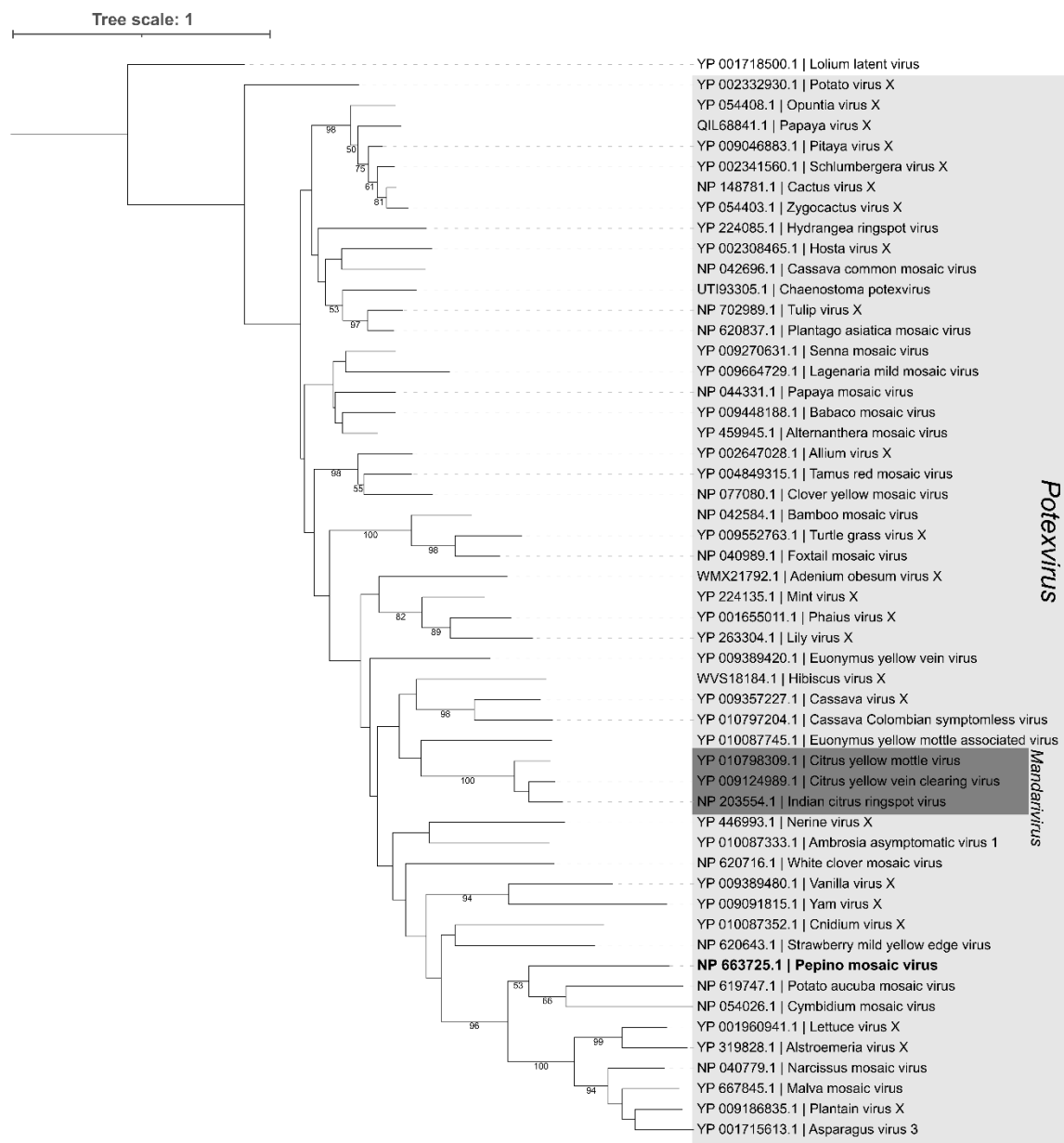


Figura 4.1. Análisis filogenético de la TGB1 del género *Potexvirus*. Los alineamientos múltiples de las 52 secuencias de aminoácidos correspondientes a la TGB1 de todas las especies de potexvirus reconocidas por ICTV en la actualidad se realizaron utilizando el algoritmo MUSCLE. El modelo de sustitución de aminoácidos óptimo fue determinado con MEGA 11. Los árboles filogenéticos se construyeron mediante el método de máxima verosimilitud (ML) y se generaron con el software RAXML-NG, empleando el modelo LG e incorporando la proporción de sitios invariables (+I) y la variación en la tasa de sustitución entre sitios según una distribución gamma (+G). Se muestra el árbol con mayor verosimilitud, indicando los valores de *bootstrap* (1000 réplicas); únicamente se representan los valores superiores al 50%. La TGB1 del miembro tipo de la especie *Lolavirus latensloli* (YP_001718500.1) fue utilizada como externa al grupo para enraizar el árbol.

La TGB1 de PepMV consta de 234 aa (Figura 4.2 A), con un peso molecular predicho de 26,27 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5,25, por lo que a pH fisiológico presentaría una carga neta negativa. Esto sugiere una potencial interacción con componentes celulares cargados positivamente, tales como elementos del citoesqueleto o las membranas.

En un análisis en busca de dominios conservados se identificó un único dominio correspondiente a la superfamilia 1 (SF1) de helicasas virales de ARN viral (IPR027351), localizado entre los aminoácidos 25 y 225 (marcado con una barra morada en la Figura 4.2 A). Además, por homología con otras secuencias mejor caracterizadas se identificaron diferentes motivos canónicos característicos de NTPasas: El motivo I o Walker A (GXXXXGKT/S, donde X representa cualquier aminoácido), responsable de la unión a nucleótidos trifosfato; el motivo Ia (T/SXXPXXI/L/V), implicado en la unión y especificidad por ácidos nucleicos monocatenarios; y el motivo II o Walker B (hhhhDEAD/H, donde h representa aminoácidos hidrofóbicos) (Figura 4.2 A). Tanto PepMV como otros virus relacionados conservan el motivo canónico Walker A y el motivo Ia. Sin embargo, presentan desviaciones en el motivo Walker B respecto al consenso de la SF1, aunque conservan la secuencia DE crítica para la coordinación de Mg^{2+} para la hidrólisis de ATP (Figura 4.2 A). Por su parte, los motivos III, IV, V y VI, característicos de helicasas canónicas, no se conservan a nivel de secuencia tal y como se describen en la bibliografía (Figura 4.2 A) (Morozov & Solovyev, 2003; Nam et al., 2013). No obstante, las estructuras secundaria y terciaria, características del dominio helicasa, sí estarían conservadas (Figura 4.2 B).

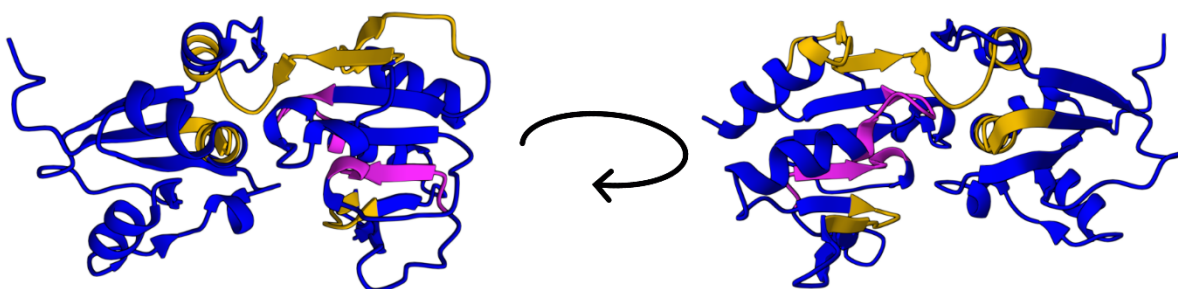
Mediante análisis predictivos, se identificaron cinco regiones potenciales de unión a ARN en la TGB1 de PepMV (marcadas en rosa en la Figura 4.2 C). Una de estas regiones se localiza en el extremo N-terminal de la proteína, fuera del dominio helicasa predicho. El resto se sitúa dentro del dominio helicasa y, dada su posición relativa en la secuencia, podrían corresponder funcionalmente a los motivos Walker

A, Ia, IV y VI (comparar Figuras 4.2 A y C), sugiriendo que estos motivos, aunque divergentes a nivel de secuencia, conservarían su capacidad de interacción con ARN.

A

[illegible]

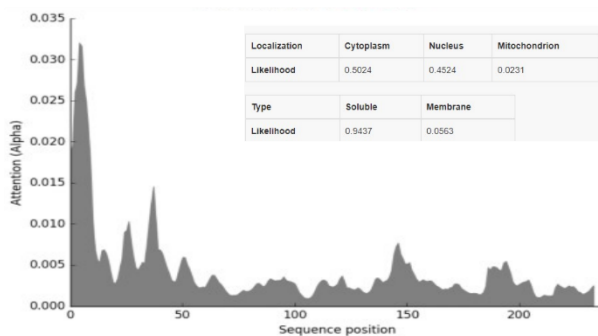
B



C

[illegible]

D



E

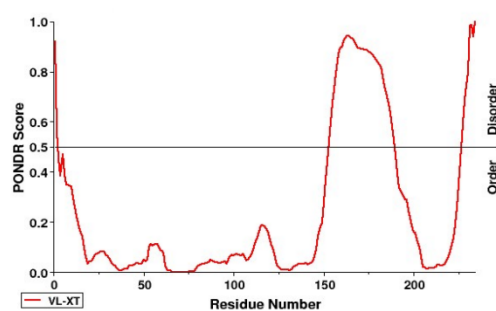


Figura 4.2. Análisis *in silico* de la TGB1 de PepMV: **A.** Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de potexvirus seleccionados. El alineamiento se generó con la aplicación ClustalOmega. Se destaca el dominio Helicasa viral de ARN de la superfamilia 1 con una barra morada sobre las secuencias; y los motivos Walker A (GXXXXGKT/S), Ia (T/SXXPXXI/L/V), Walker B (hhhhDEAD/H, donde h representa aminoácidos hidrofóbicos), III, IV, V y VI de N a C terminal resaltados en gris. PVX – potato virus X, YP_002332930.1; BaMV – bamboo mosaic virus, YP_002332930.1; PepMV – pepino mosaic virus, NP_663725.1; CymMV – cymbidium mosaic virus, NP_054026.1; PAMV – potato aucuba mosaic virus, NP_619747.1; AlsVX – alstroemeria virus X, YP_319828.1; LeVX – lettuce virus X, YP_001960941.1; NMV – narcissus mosaic virus, NP_040779.1; MaMV – malva mosaic virus, YP_667845.1; AV3 – asparagus virus 3, YP_001715613.1; PLVX – plantain virus X, YP_009186835.1. **B.** Predicción de la estructura terciaria de la TGB1 de PepMV. La estructura fue generada mediante el software AlphaFoldServer (DeepMind). Los motivos Walker A y B están coloreados en rosa, y los cuatro motivos identificados en la secuencia de aminoácidos con función putativa en la unión a ácidos nucleicos se destacan en amarillo. **C.** Alineamiento múltiple de las TGB1s de los miembros tipo de los diferentes tipos genéticos mayoritarios de PepMV. El alineamiento fue generado mediante ClustalOmega. Se destacan en rosa los diferentes motivos predichos con capacidad de unión a ARN, en gris las dos regiones predichas como señales de exportación nuclear, en azul se indica la región predicha como intrínsecamente desordenada y las cabezas de flecha señalan los distintos aminoácidos predichos como susceptibles de fosforilación en la secuencia del tipo genético EU. Acciones de Genbank utilizadas para cada tipo genético mayoritario: AJ438767 (EU), AJ606361 (LP), DQ000985 (CH2), AY509926 (US1), AY509927 (US2) y HG313805 (PES). **D.** Localización subcelular de la TGB1 de PepMV. Predicción de la localización subcelular de la proteína mediante DeepLoc2.0. Se muestra la probabilidad predicha de localización citoplasmática (50%) y nuclear (45%), así como el perfil del peso predictivo de cada región de la proteína, representado como un gráfico de densidad. **E.** Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR). Análisis mediante el software PONDR VL-XT. El eje X indica la posición de los residuos de aminoácidos, mientras que el eje Y indica la propensión al desorden. La línea horizontal en Y=0,5 marca el umbral de predicción: valores superiores indican regiones con propensión al desorden, mientras que los inferiores indican regiones estructuradas. Se predice una IDR significativa entre los aminoácidos 153 y 189 de la TGB1 de PepMV.

La TGB1 de PepMV se predijo como una proteína soluble con una probabilidad del 94%, con probabilidades comparables para una localización citoplasmática (50%) y nuclear (45%), sugiriendo una potencial localización dual. Además, el análisis otorgó a los primeros 50 aminoácidos de la secuencia mayor peso predictivo para la localización subcelular (Figura 4.2 D), sugiriendo la presencia de una posible señal de localización nuclear (NLS) o señal de exportación nuclear (NES). Se realizaron análisis adicionales con otros programas, que predijeron dos regiones como NES canónicas mediadas por CRM1 (marcadas en gris en la Figura 4.2 C). Ningún programa empleado identificó señales de localización nucleolar.

Adicionalmente, se identificó una región intrínsecamente desordenada (IDR, *intrinsically disordered region*) entre los aminoácidos 153 y 189 (marcada en azul en la Figura 4.2 C), con una puntuación de desorden notablemente superior al umbral establecido (Figura 4.2 E). Los IDR son regiones flexibles de la proteína que median interacciones multivalentes con diferentes proteínas y en ciertos casos han sido relacionadas con funciones de NLS y/o NES (Wubben et al., 2020).

En cuanto a la composición de aminoácidos, destaca una notable abundancia de residuos de serina (8,12%) y treonina (9,40%), que junto a tirosina representan el 20,09% de la proteína. De ellos, se predijeron distintos residuos susceptibles de fosforilación mediante análisis *in silico* (Figura 4.2 C); entre ellos, diferentes motivos consenso para CK2 [ST]XX[DE] y PKA/PKC [RK]XX[ST].

Para los análisis anteriores se utilizó la secuencia del miembro tipo de la especie *Potexvirus pepini*. La comparación de secuencias entre aislados de los tipos genéticos mayoritarios de PepMV mostró una identidad en aminoácidos superior al 81% en la TGB1 (Tabla 4.1). Este valor de identidad no es especialmente alto teniendo en cuenta que son aislados de una misma especie viral. Sin embargo, los dominios predichos en el aislado de tipo EU se encuentran en gran medida conservados en el resto de aislados (Figura 4.2 C).

Tabla 4.1. Porcentaje de identidad de nucleótidos (y aminoácidos) entre las secuencias de aislados de los diferentes tipos genéticos mayoritarios de PepMV.

Tipo 1 ^a	EU	EU	EU	EU	EU	LP	LP	LP	LP	CH2	CH2	CH2	US1	US1	US2
Tipo 2 ^a	LP	CH2	US1	US2	PES	CH2	US1	US2	PES	US1	US2	PES	US2	PES	PES
	96	78	83	79	81	79	83	80	82	78	90	76	87	86	79
	(99)	(85)	(89)	(87)	(89)	(84)	(88)	(87)	(89)	(83)	(92)	(81)	(89)	(95)	(87)

^a Acciones de Genbank utilizadas para cada tipo genético mayoritario: AJ438767 (EU), AJ606361 (LP), DQ000985 (CH2), AY509926 (US1), AY509927 (US2) y HG313805 (PES)

4.1.2. La TGB1 de PepMV presenta una localización núcleo-citoplásmica en células sanas

Para caracterizar experimentalmente la localización subcelular de la TGB1 de PepMV, se generó una construcción de ADN que expresa la TGB1 fusionada

traduccionalmente por su extremo C-terminal a la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*).

La proteína TGB1-GFP mostró una localización dual núcleo-citoplásmica, con una distribución homogénea entre ambos compartimentos celulares (Figura 4.3 A), consistente con la predicción *in silico* (Figura 4.2 D). En el núcleo, la señal de fluorescencia se detectó principalmente en el nucleoplasma, mientras que en el nucleolo fue considerablemente más débil (Figura 4.3 A), sugiriendo una exclusión selectiva de este orgánulo. No se observaron patrones de acumulación de la señal de fluorescencia en regiones específicas del núcleo, tales como cuerpos de Cajal, o cuerpos nucleares PML, sugiriendo que la TGB1 adopta una distribución difusa en el nucleoplasma en lugar de asociarse a estructuras específicas.

La distribución subcelular observada para la proteína de fusión TGB1-GFP presentó un patrón muy similar al observado para la GFP (Figura 4.3 A). Para confirmar que la señal nuclear detectada correspondía específicamente a la proteína de fusión TGB1-GFP y no a GFP derivada de procesos de proteólisis, se analizaron fracciones enriquecidas en núcleos de *N. benthamiana* que expresaban de forma transitoria TGB1-GFP o GFP, junto con la proteína nuclear SLALOG1-mRFP (factor de transcripción de la familia ALOG residente en núcleo, ver más adelante) como control de la técnica de purificación.

Las fracciones nucleares de las diferentes muestras fueron analizadas mediante *Western blot SDS-PAGE* empleando anticuerpos específicos (Figura 4.3 B). La banda correspondiente a SLALOG1-mRFP (47 kDa) fue detectada con una intensidad homogénea en todas las muestras, validando así la calidad uniforme de la purificación nuclear entre tratamientos y réplicas. Las fracciones nucleares de plantas que expresaban GFP contenían una única banda de 27 kDa, mientras que en las fracciones nucleares de plantas que expresaban TGB1-GFP (55 kDa) se observó una banda predominante con intensidad notablemente superior (Figura 4.3 B). Estos resultados confirman experimentalmente que la TGB1 de PepMV se encuentra en el

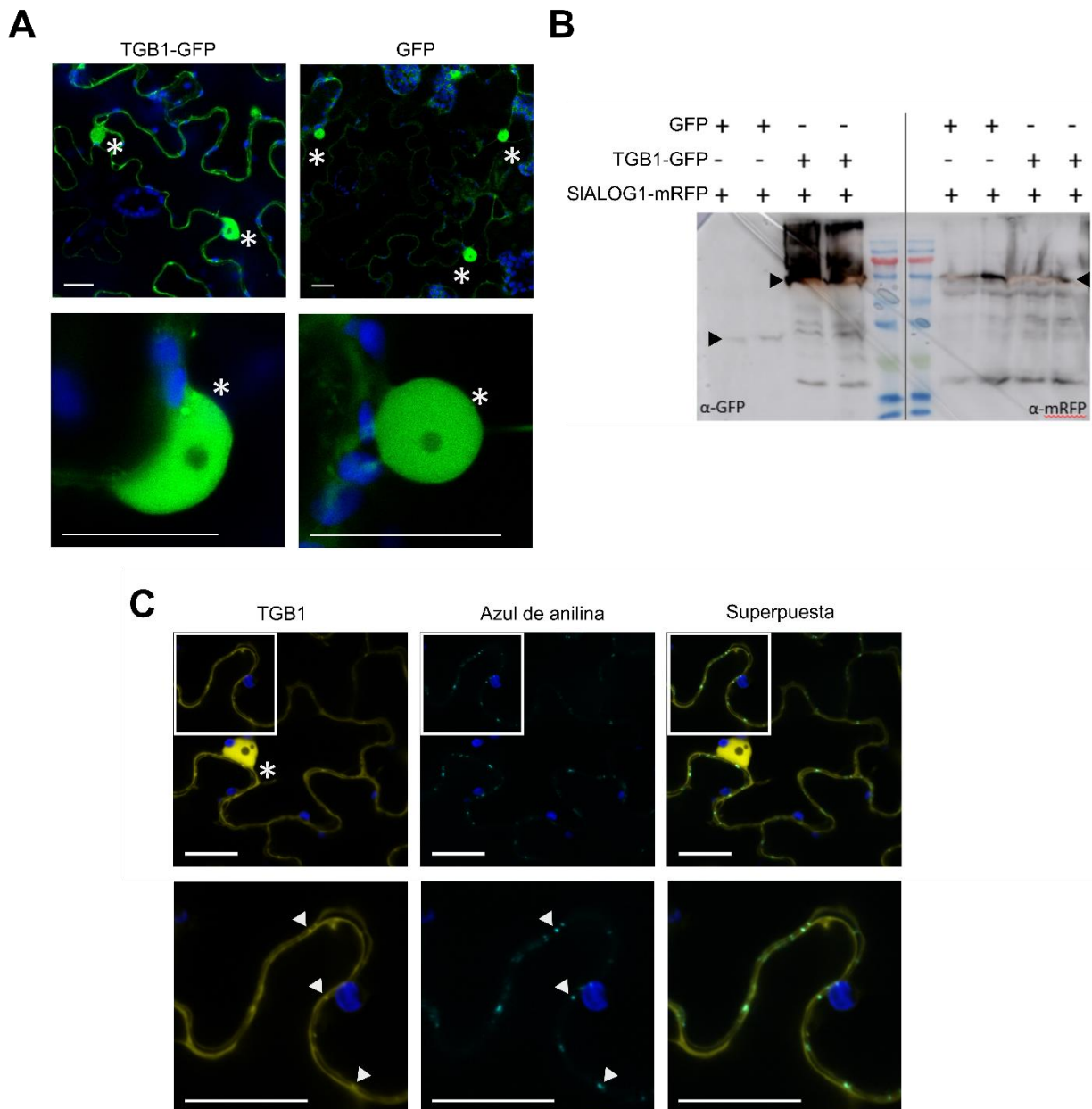


Figura 4.3. Localización subcelular de la TGB1 de PepMV en células sanas de *N. benthamiana*. **A. Localización subcelular de TGB1-GFP y GFP.** Los paneles de la izquierda muestran las imágenes correspondientes a TGB1-GFP, mientras que los de la derecha las de GFP. Los paneles inferiores muestran imágenes ampliadas de la localización en el núcleo. Los núcleos se indican con asteriscos. La barra de tamaño corresponde a 20 μ m. **B. Análisis mediante *Western blot* de fracciones nucleares purificadas.** Las fracciones nucleares obtenidas de hojas de *N. benthamiana* que expresaban TGB1-GFP o GFP se incubaron con anticuerpos anti-GFP (α -GFP) ChromoTek® para detectar ambas proteínas. Se muestran dos réplicas biológicas independientes para cada tratamiento. Como control interno de la purificación nuclear se expresó en todas las muestras la proteína nuclear SIALOG1-mRFP, detectada empleando el anticuerpo anti-RFP (α -RFP) ChromoTek®. Los pesos moleculares esperados fueron: TGB1-GFP~55kDa, GFP~27kDa, SIALOG1-mRFP~47kDa. Las bandas de interés se indican con una cabeza de flecha. El marcador de tamaño molecular utilizado fue CozyHI™ Prestained Protein Ladder (highQu). **C. Localización en plasmodesmos (PD) de la TGB1 de PepMV en células sanas.** Se muestra la localización de la proteína de fusión TGB1-

EYFP (canal amarillo) y el marcador de PD azul de anilina (canal cian), así como la imagen superpuesta de los dos canales. Los núcleos se indican con asteriscos. La barra de tamaño corresponde a 20 μm .

núcleo, siendo la señal de fluorescencia nuclear observada mediante CLSM principalmente atribuible a la proteína de fusión TGB1-GFP íntegra, más que a GFP derivada de procesos de proteólisis. Adicionalmente a la banda de interés, se observaron bandas de menor tamaño para TGB1-GFP y SIALOG1-mRFP, coherentes con productos de proteólisis parcial.

Con respecto al citoplasma, la localización de TGB1-GFP fue igualmente difusa, salvo pequeños acúmulos cerca de la membrana celular que podrían representar plasmodesmos (PD) (Figura 4.3 A). Para confirmar la identidad de estas estructuras se empleó azul de anilina, que tiñe de forma específica los depósitos de calosa, junto con la TGB1, en este caso marcada con EYFP para evitar contaminación entre canales. Las imágenes de CLSM muestran la colocalización entre las señales de TGB1 y el marcador de PDs (Figura 4.3 C). No se observaron alteraciones ultraestructurales a causa de la sobreexpresión de la TGB1 de PepMV (Figura 4.3 A y C).

4.1.3. La TGB1 de PepMV localiza en plasmodesmos y orgánulos de replicación viral durante la infección

Para determinar si la infección por PepMV modifica la distribución subcelular de la TGB1, se estudió la localización de la proteína de fusión TGB1-GFP en células epidérmicas de *N. benthamiana* infectadas con PepMV.

Durante la infección por PepMV, la TGB1 mantuvo una localización nuclear y citoplásmica (Figura 4.4 A). En el núcleo, la señal se detectó en el carioplasma con exclusión del nucleolo (Figura 4.4 B). En el citoplasma, la infección indujo la acumulación selectiva de TGB1-GFP en forma de pequeños gránulos discretos en la periferia celular compatibles con PD (Figura 4.4 A y B), así como en agregados discretos formando una estructura mayor en la periferia del núcleo, compatible con

un VRO (Figura 4.4 C). La identidad de los PDs se confirmó mediante el tinte azul de anilina y la de los VROs mediante la señal de la CP de PepMV (Figura 4.4 D).

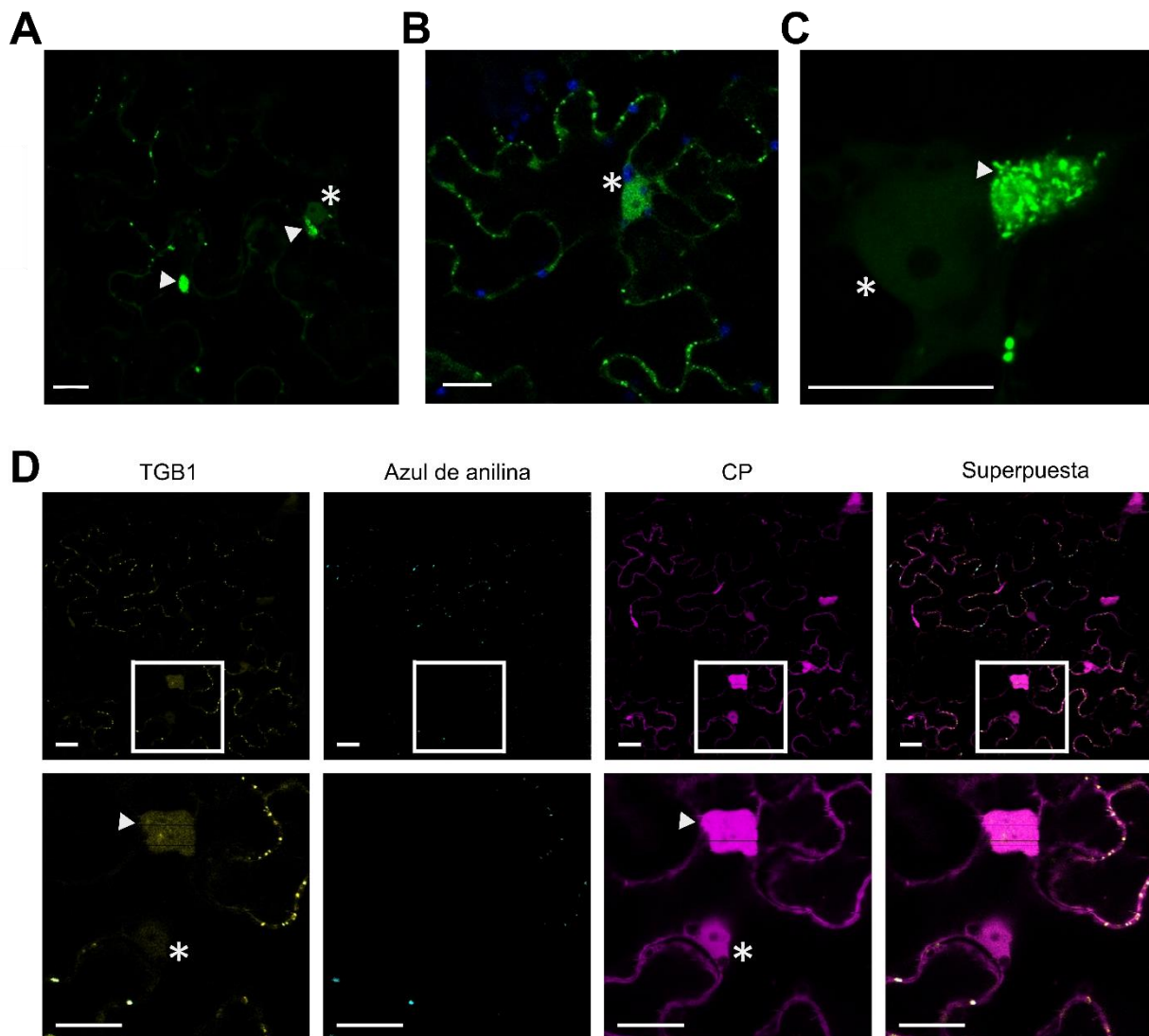


Figura 4.4. Localización subcelular de la TGB1 de PepMV en células infectadas de *N. benthamiana*. **A. B. C.** Imágenes representativas de la localización subcelular de la proteína de fusión TGB1-GFP en células infectadas con el clon agroinfectivo PepMV-WT. **D. Localización de la TGB1 de PepMV en plasmodesmos y orgánulos de replicación viral (VROs) en células infectadas.** Se muestran imágenes correspondientes a los canales de la proteína de fusión TGB1-EYFP (canal amarillo), el marcador de PD azul de anilina (canal cian), la CP de PepMV como marcador de VROs (canal magenta) y la imagen superpuesta de los tres canales. La CP se expresó a partir del clon agroinfectivo PepMV-TagRFP. Se señalan los núcleos con un asterisco y los orgánulos de replicación viral (VROs) con una cabeza de flecha. Las imágenes del canal correspondiente a la autofluorescencia de los cloroplastos se muestra en azul. La barra de tamaño corresponde a 20 μ m.

4.2. Identificación de proteínas nucleares de tomate interactoras de la TGB1 mediante escrutinio de doble híbrido en levadura

Como aproximación para identificar proteínas interactoras de la TGB1 en núcleo se realizó un escrutinio de doble híbrido en levadura (*yeast two-hybrid*, Y2H) en una genoteca de cDNA de plantas de tomate. Inicialmente se obtuvieron 34 clones positivos en el escrutinio (Figura 4.5 A). Los clones fueron identificados mediante la herramienta BLAST contra la base de datos del genoma de tomate ITAG v2.4. Como criterio de confianza, se seleccionaron aquellos candidatos identificados con al menos dos clones independientes. Mediante este análisis, se identificaron un total de 7 candidatos *bona fide* no redundantes de la TGB1 (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Interactores putativos de la TGB1 identificados mediante Y2H.

Identificador	Homología
Solyc03g093650	<i>Ethylene response factor 5</i>
Solyc01g008110	<i>Obtusifolius 14alpha-demethylase</i>
Solyc02g069510	<i>Light-dependent short hypocotyls 1</i>
Solyc02g087130	<i>Phosphoglycerate mutase</i>
Solyc01g008060	<i>Putative Rnase H domain-containing protein</i>
Solyc06g071490	<i>Putative Serine/threonine-protein kinase</i>
Solyc06g053350	<i>Probable transcription factor</i>

De los siete interactores putativos identificados, se seleccionaron dos para un análisis funcional más detallado. La selección se basó en su localización subcelular predicha, que les asignó una probabilidad superior al 80% para una localización nuclear (Figura 4.5 B, C). Los interactores nucleares putativos de la TGB1 de PepMV seleccionados corresponden a los genes anotados como *Solyc02g069510*, para el que se obtuvieron dos clones independientes en el escrutinio de Y2H (Figura 4.5 D), y *Solyc06g053350*, que se identificó en cuatro clones independientes (Figura 4.5 E).

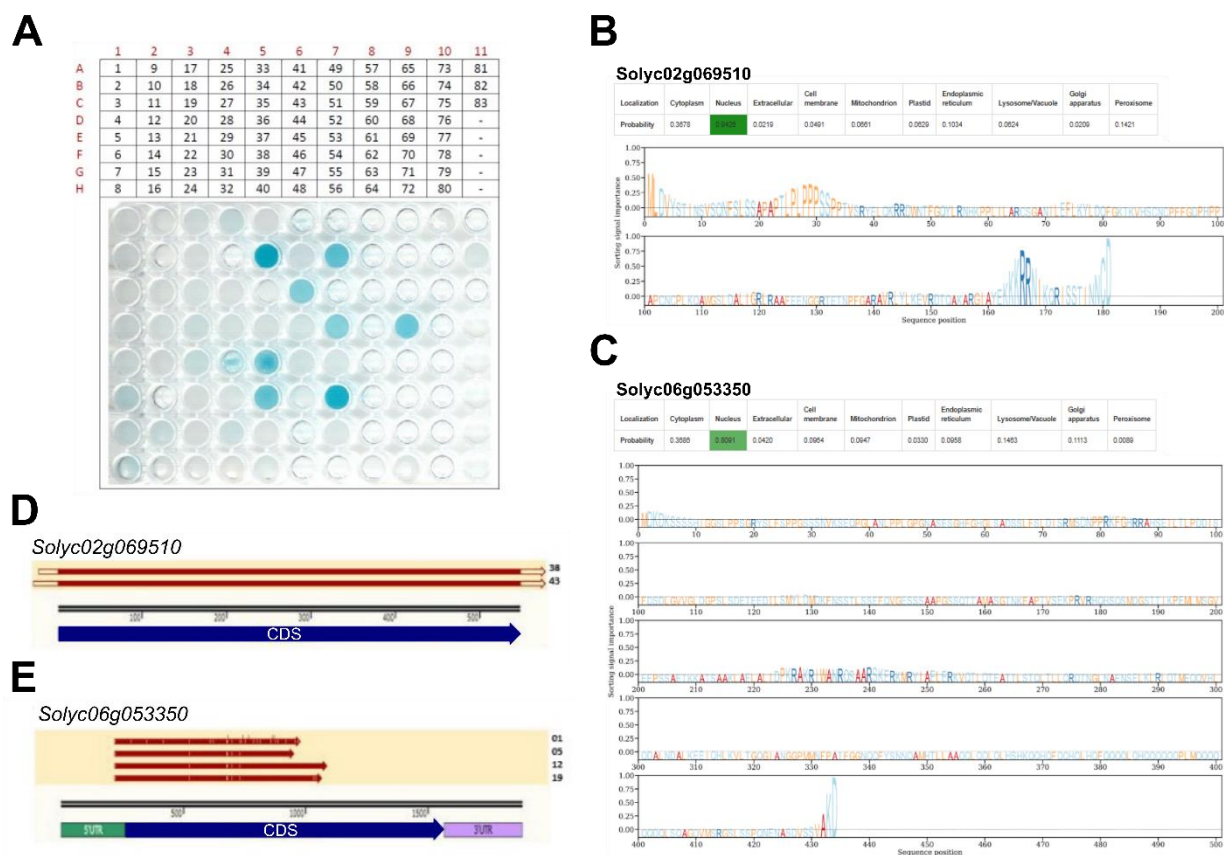


Figura 4.5. Escrutinio de doble híbrido en levadura (Y2H) de una genoteca de cDNA de tomate y la TGB1 de PepMV. A. Escrutinio de doble híbrido en levadura. Se muestra un ejemplo de colonias crecidas en medio selectivo suplementado con X-α-Gal, donde la coloración azul indica activación del gen delator lacZ, reflejando interacción positiva entre la TGB1 (cebo) y las proteínas codificadas en los clones de la librería. **B y C.** Predicción de la localización subcelular de los candidatos seleccionados. Software empleado DeepLoc2.0. Se muestran **(B)** *Solyc02g069510* con una probabilidad de 94% de localización nuclear y **(C)** *Solyc06g053350* con una probabilidad de 80% de localización nuclear. Para cada proteína se representa el gráfico de densidad de predicción por residuo. **D y E.** Candidatos *bona fide* del escrutinio de Y2H. Se muestran **(D)** *Solyc02g069510* y **(E)** *Solyc06g053350*. En rojo se muestran las secuencias obtenidas en los clones presa positivos. En azul se muestra la secuencia codificante anotada para el gen. En verde y lila se representan los extremos 5' y 3' anotados. En negro se representa la barra de tamaño en pares de bases.

4.3. Caracterización de SIALOG1

El gen anotado como *Solyc02g069510* se localiza en la cadena negativa del cromosoma 2 del genoma de tomate y presenta una estructura sencilla, compuesta por un único exón de 546 nucleótidos.

El análisis de homología mediante BLASTP contra la base de datos Sol Genomics Network (SGN) reveló la existencia de once proteínas homólogas en

tomate con identidad de secuencia superior al 63% (Figura 4.6 A), y sin una anotación funcional específica. Una búsqueda de homología extendida contra la base de datos NCBI, así como un análisis de dominios funcionales, identificaron una alta similitud con proteínas mejor caracterizadas de las familias LIGHT-DEPENDENT SHORT HYPOCOTYLS (LSH) de *A. thaliana* y G1 de *O. sativa*, así como la presencia del dominio ALOG (IPR006936). Estos resultados permiten concluir que *Solyc02g069510* codifica una proteína de la familia ALOG de factores de transcripción ampliamente conservada en plantas y relacionada con funciones de desarrollo y diferenciación celular (Iyer & Aravind, 2012; Rieu et al., 2024; Turchetto et al., 2023). Sin embargo, su papel en respuesta a estrés biótico no ha sido caracterizado.

A



B



Figura 4.6. Análisis de homología de *Solyc02g069510* con la familia ALOG. A. BLASTP de los clones candidatos frente a la base de datos Sol Genomics Network. Se muestran los 12 genes identificados con su porcentaje de identidad (ID%) con la secuencia determinada para los clones Y2H. B. Alineamiento múltiple de los 12 miembros de la familia ALOG en tomate. Se indica el dominio ALOG resaltado en morado con su secuencia LOGO [modificado de

(Turchetto et al., 2023)]. Los extremos altamente variables se representan con una línea negra. Alineamiento realizado usando ClustalOmega.

El análisis de las doce proteínas identificadas mediante BLASTP codificadas en el genoma de tomate (Figura 4.6 A) permitió concluir que todas ellas pertenecen a la familia ALOG, basándose en i) un alineamiento de secuencias aminoacídicas con miembros caracterizados de *A. thaliana* y *O. sativa*, y ii) la identificación del dominio conservado ALOG (IPR006936) en todos los miembros (Figura 4.6 B). Estructuralmente, todos los miembros presentan la organización modular típica descrita para proteínas ALOG, un dominio central altamente conservado flanqueado por regiones N- y C-terminales altamente variables entre los miembros (Figura 4.6 B).

La familia ALOG en tomate fue inicialmente nombrada como *TMF FAMILY MEMBERS* (*TFAMs*) (Huang et al., 2022; Xu et al., 2016) en base al gen regulador de la floración *TERMINATING FLOWER* (*TMF*), previamente caracterizado (MacAlister et al., 2012). Sin embargo, esta nomenclatura funcional presenta limitaciones en familias extensas o poco caracterizadas. Por ello, en este trabajo se adoptó una nomenclatura sistemática y neutral basada en la posición genómica, usando el prefijo *Sl*ALOG (*Solanum lycopersicum* ALOG) seguido de números correlativos. Así, el gen *Solyc02g069510* se ha denominado *SlALOG1* y los 11 miembros adicionales se han designado *SlALOG2-SlALOG12*.

Se realizó un análisis filogenético incluyendo los 12 miembros de la familia ALOG identificados en tomate, las 10 secuencias descritas en *A. thaliana*, y las 2 secuencias descritas en *Marchantia polymorpha*. Las secuencias de *M. polymorpha* se utilizaron como externas al grupo para enraizar el árbol dada su posición basal en la filogenia de plantas terrestres (Figura 4.7 A). El árbol obtenido mostró dos ramas principales. El Clado I con un alto soporte estadístico (*bootstrap* 99%) compuesto por 5 miembros de tomate y 4 de *A. thaliana* y el Clado II subdividido en el subclado IIa compuesto por 5 miembros de tomate junto a 4 de *A. thaliana* y el IIb donde *SlALOG1*, objeto de esta tesis doctoral, se agrupa con *SlALOG5*, y las proteínas de *A. thaliana* LSH5 y 6 (Figura 4.7 A). Esta topología permite concluir que la proteína ALOG más

cercana en tomate a SIALOG1 es SIALOG5 y que sus ortólogos más probables en *A. thaliana* son LSH5 y LSH6 (Figura 4.7 A).

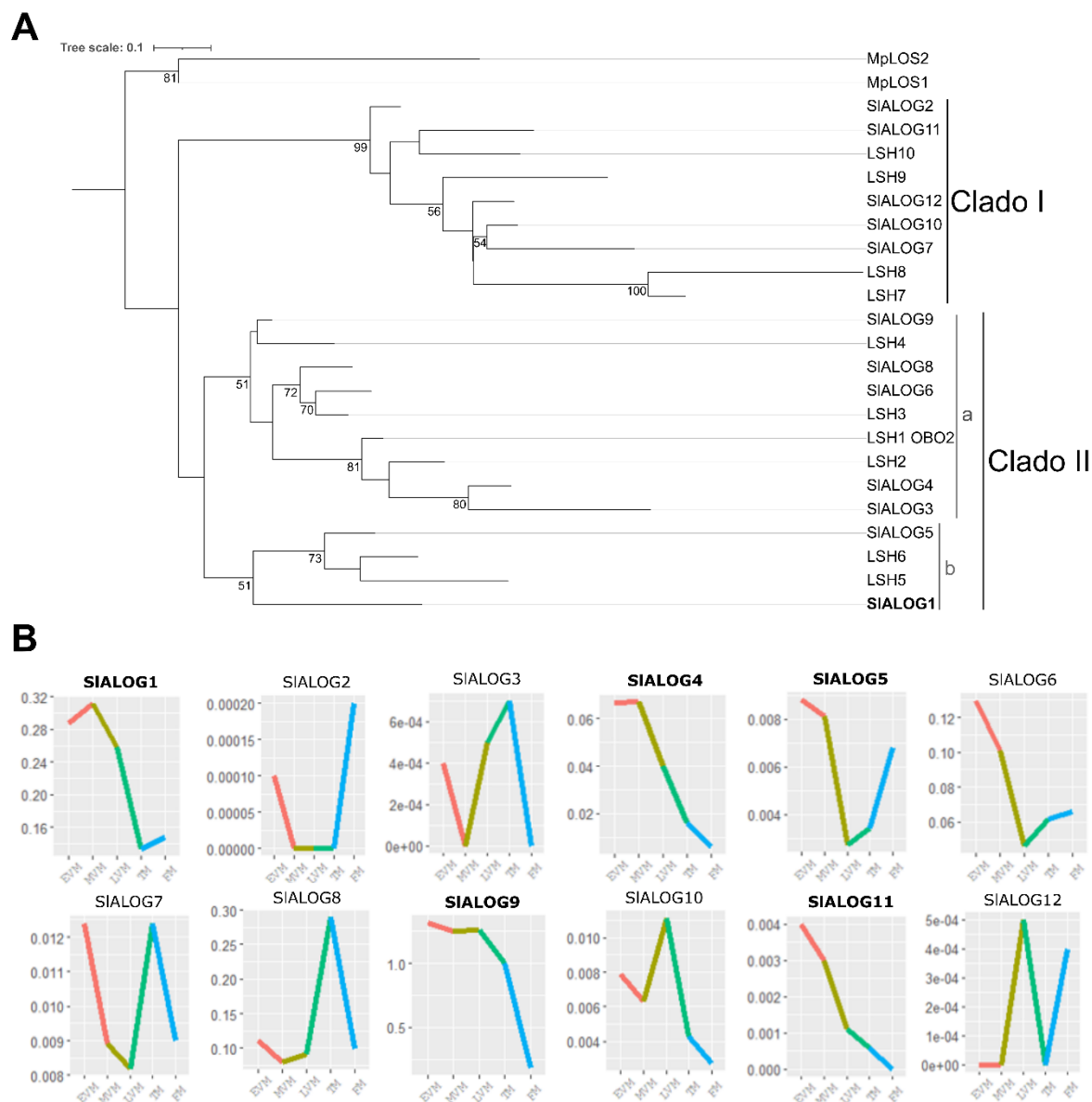


Figura 4.7. Relación filogenética y perfil de expresión de las proteínas ALOG de *S. lycopersicum*. **A.** Reconstrucción filogenética de la familia ALOG. Se incluyen: 12 proteínas ALOG de *Solanum lycopersicum* (SIALOG), 10 proteínas LSH de *Arabidopsis thaliana* y 2 de *Marchantia polymorpha* (MpLOS). Las secuencias de *M. polymorpha* fueron empleadas como externas al grupo debido a su posición basal en la filogenia de plantas terrestres. La filogenia fue inferida mediante el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo JTT+G, con 1000 iteraciones para el cálculo de *bootstrap*; se indican los valores $\geq 50\%$ y la escala del árbol. El análisis se realizó con el software MEGA7. Se muestra resaltado SIALOG1 codificada por el gen *Solyc02g069510*. **B.** Perfil de expresión temporal de los genes ALOG de tomate durante el desarrollo. Los datos se obtuvieron de la plataforma TomExpress. Se muestran los estadios EVM (early vegetative meristem), MVM (middle vegetative meristem), LVM (late vegetative meristem), TM (transition meristem), y FM (floral meristem). Se resalta el nombre de los SIALOG analizados en esta tesis doctoral.

En una familia génica suelen existir distintos grados de redundancia/especialización entre sus miembros. Por ello, como aproximación para inferir posibles redundancias funcionales entre los miembros de la familia ALOG se estudio su perfil de expresión de los distintos miembros durante el desarrollo. Este análisis se llevó a cabo gracias a los resultados depositados en la base de datos TomExpress. De este análisis destaca la similitud en los perfiles de expresión de SIALOG4, 5, 6, 9 y 11 con el de SIALOG1 (Figura 4.7 B).

SIALOG1, al igual que el resto de miembros de la familia (Iyer & Aravind, 2012), presenta un dominio ALOG central con estructura tridimensional estable (Figura 4.8 A) flanqueado por regiones N- y C-terminales flexibles y desordenadas según una predicción *in silico* (Figura 4.8 B). En conjunto, esta organización confiere a la proteína una estructura modular (Figura 4.8 C).

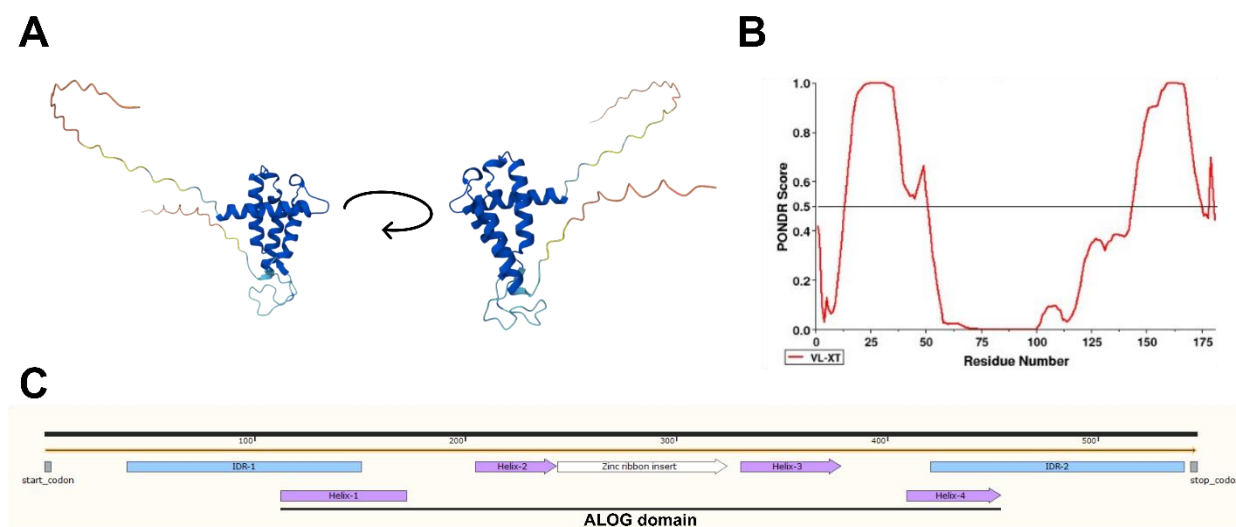


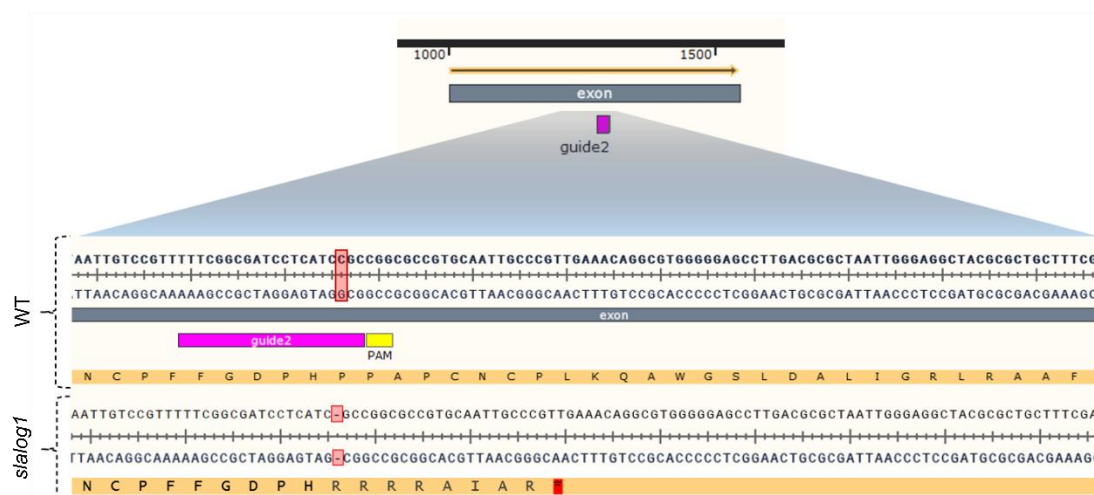
Figura 4.8. Estructura de SIALOG1. **A.** Estructura tridimensional de SIALOG1. Modelo estructural obtenido mediante Alphafold. Se observa el dominio ALOG central, compuesto por cuatro hélices α (azul oscuro), y el motivo *zinc ribbon* (azul claro) insertado entre ellas. Las regiones terminales no se resuelven en la predicción, acorde a su naturaleza flexible. **B.** Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas (IDR). El análisis mediante el algoritmo PONDR VL-XT identifica dos IDRs. El eje X indica la posición de los residuos de aminoácidos, y el eje Y la propensión al desorden. La línea horizontal en $Y=0,5$ marca el umbral de predicción. **C.** Distribución de dominios en SIALOG1. Se muestran las secuencias intrínsecamente desordenadas (IDR), así como las cuatro α -hélices (morado) y el *zinc ribbon* (blanco) que conforman el dominio ALOG de unión a ácidos nucleicos.

4.3.1. Evaluación de la susceptibilidad de la línea *slalog1* a PepMV

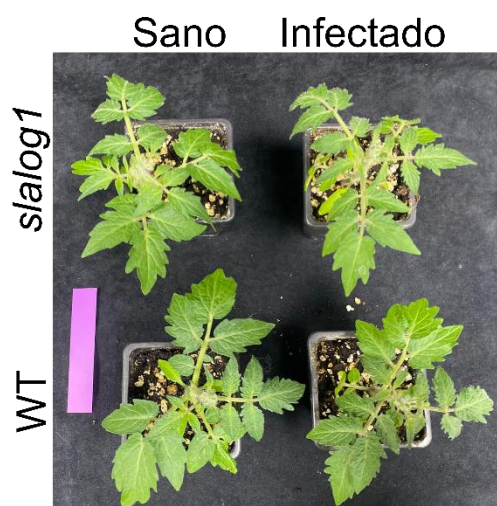
Para evaluar el papel de *SLALOG1* durante la infección por PepMV, se generaron líneas de mutantes nulos del gen en tomate cv. MicroTom utilizando la tecnología CRISPR/Cas9.

Para los ensayos de susceptibilidad a PepMV, se seleccionó la línea mutante *slalog1* caracterizada por un codón de stop prematuro resultante de la delección de una citosina en posición 296, tres nucleótidos aguas arriba de la región PAM (Figura 4.9 A). Esta delección provoca un cambio en la pauta de lectura, generando una proteína truncada de 106 aa en lugar de los 181 de la proteína silvestre (Figura 4.9 A). Dado que el dominio ALOG de unión a ácidos nucleicos se encuentra truncado, se espera una pérdida de función total de la proteína mutante. Una vez fijada la mutación en homocigosis y eliminado el transgén por segregación, la línea *slalog1* no mostró

A



B



C

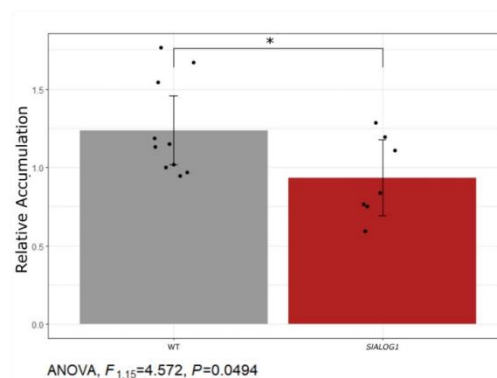


Figura 4.9. Caracterización de la línea mutante *slalog1* en MicroTom. **A.** Esquema de la edición mediante CRISPR/Cas9 del gen *SIALOG1*. Se muestra la representación de la secuencia codificante de *SIALOG1* y la posición del ARN guía (gRNA). La ampliación muestra: la secuencia silvestre (WT) del gen con la posición del gRNA y la secuencia PAM, así como la secuencia mutante (*slalog1*) resultante de la delección de un nucleótido en la región diana (sombreado en rojo), que genera un codón de *stop* prematuro en la secuencia mutante, indicado con un asterisco. **B.** Inoculación de plantas de la línea *slalog1*. Se muestran plantas representativas de la línea mutante *slalog1* sanas e infectadas con PepMV a 14 dpi, junto con plantas de genotipo silvestre del mismo fondo genético. La barra morada representa 10 cm. **C.** Ensayo de susceptibilidad a PepMV en plantas *slalog1*. Se muestra la acumulación viral relativa a 14 días post inoculación en plantas infectadas mecánicamente con una suspensión de viriones de PepMV, comparando plantas de genotipo silvestre (WT, gris) y mutante (*slalog1*, rojo). La acumulación viral fue cuantificada mediante RT-qPCR relativa a partir de ARN total extraído individualmente de toda la parte aérea de la planta. Como gen de referencia para la normalización de la expresión se utilizó la subunidad 25S del ARN ribosomal. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos calculada mediante un test *one-way* ANOVA (p -valor = 0.0494).

alteraciones fenotípicas apreciables en condiciones normales de cultivo ni tras la infección con PepMV, en comparación con plantas de genotipo silvestre, a los tiempos de muestreo empleados para los ensayos de susceptibilidad (Figura 4.9 B).

La acumulación de PepMV se cuantificó para cada planta individual mediante RT-qPCR relativa, utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos de la CP de PepMV y de la subunidad 25S del ARN ribosomal, empleado como gen de referencia para la normalización (Anexo I). Los resultados obtenidos fueron consistentes en los distintos ensayos independientes realizados ($n > 3$), y revelaron una reducción estadísticamente significativa de la acumulación viral en plantas *slalog1* en comparación con las de genotipo silvestre a 14 dpi (Figura 4.9 C).

4.3.2. La localización subcelular de *SIALOG1* se ve alterada durante la infección por PepMV

Se estudió la distribución subcelular de *SIALOG1* mediante CLSM empleando la proteína de fusión *SIALOG1*-EYFP. En células sanas, se observó una localización exclusivamente nuclear (Figura 4.10), consistente con su localización subcelular predicha (Figura 4.5 B). La señal de fluorescencia observada fue homogénea en el carioplasma, y enriquecida en el nucleolo (Figura 4.10). Durante la infección por

PepMV, la fluorescencia de SIALOG1-EYFP se acumuló principalmente en los VROs formados en la periferia del núcleo, identificados mediante la expresión de TagRFP-CP a partir del clon agroinfectivo PepMV-TagRFP (Figura 4.10, columna CP). Además de esta acumulación preferente en VROs, se detectó señal de fluorescencia dispersa en el citoplasma y carioplasma (Figura 4.10). Este cambio en el patrón de localización subcelular sugiere una relocalización de SIALOG1 a los VROs de PepMV.

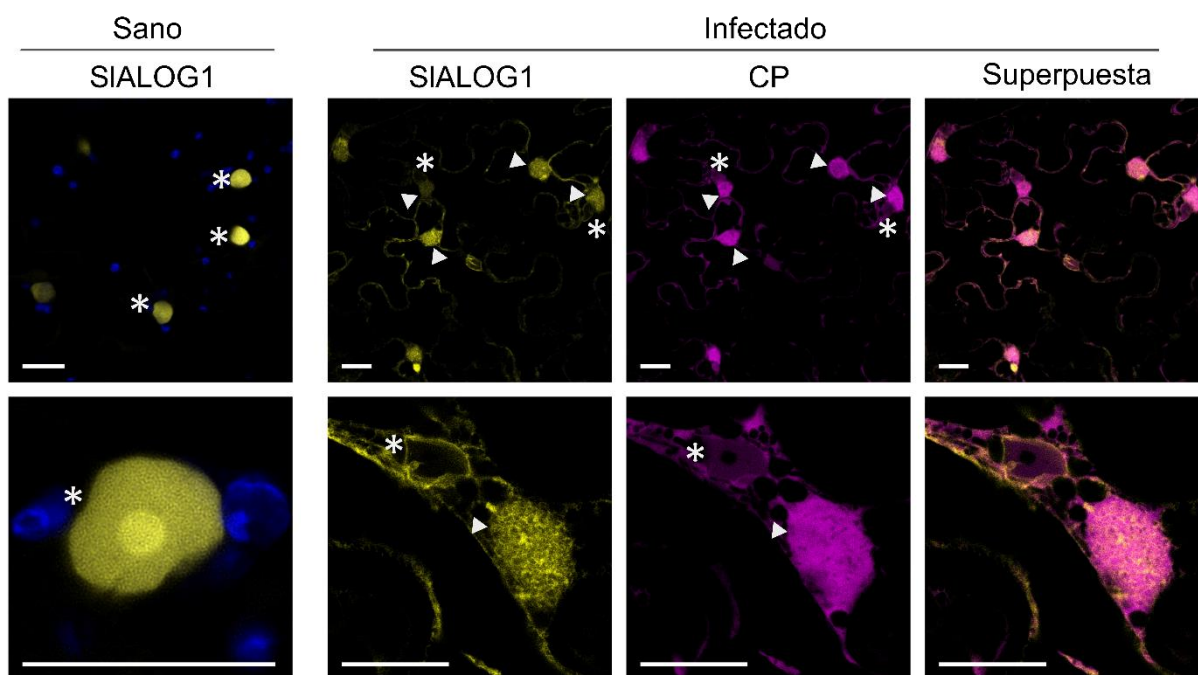


Figura 4.10. Localización subcelular de SIALOG1 en células sanas e infectadas por PepMV. Se muestran imágenes correspondientes a SIALOG1-EYFP (canal amarillo) en células sanas (izquierda) e infectadas por PepMV (derecha). Adicionalmente, para las células infectadas, se muestran imágenes del canal de TagRFP-CP (canal magenta) expresada a partir del clon agroinfectivo PepMV-TagRFP (Alcaide & Aranda, 2023) y la superposición de las imágenes de ambos canales. Las imágenes del canal correspondiente a la autofluorescencia de los cloroplastos se muestran en azul. Los núcleos se indican con asteriscos y los orgánulos de replicación viral (VROs) con cabezas de flecha. Las barras de tamaño representan 20 μm .

4.3.3. Análisis de la interacción entre SIALOG1 y TGB1

Dado que la interacción entre SIALOG1 y TGB1 fue identificada mediante un sistema heterólogo que no proporciona información sobre la localización subcelular donde ocurre la interacción, se procedió a caracterizar la co-localización de ambas proteínas mediante CLSM como paso previo a la validación de la interacción

identificada. Para minimizar posibles interferencias espectrales entre los distintos canales se emplearon SIALOG1-mRFP y TGB1-GFP.

En células sanas, ambas proteínas mostraron coincidencia espacial únicamente en el núcleo (Figura 4.11 A), mientras que en células infectadas con PepMV, el patrón de co-localización cambió de acuerdo a lo observado con las proteínas individuales, y la co-localización de las señales se observó en VROs, núcleos y, en menor medida, en el citoplasma (Figura 4.11 A). Esta co-localización espacial durante el ciclo infectivo es consistente con la hipótesis de una interacción funcional entre ambas proteínas *in vivo*.

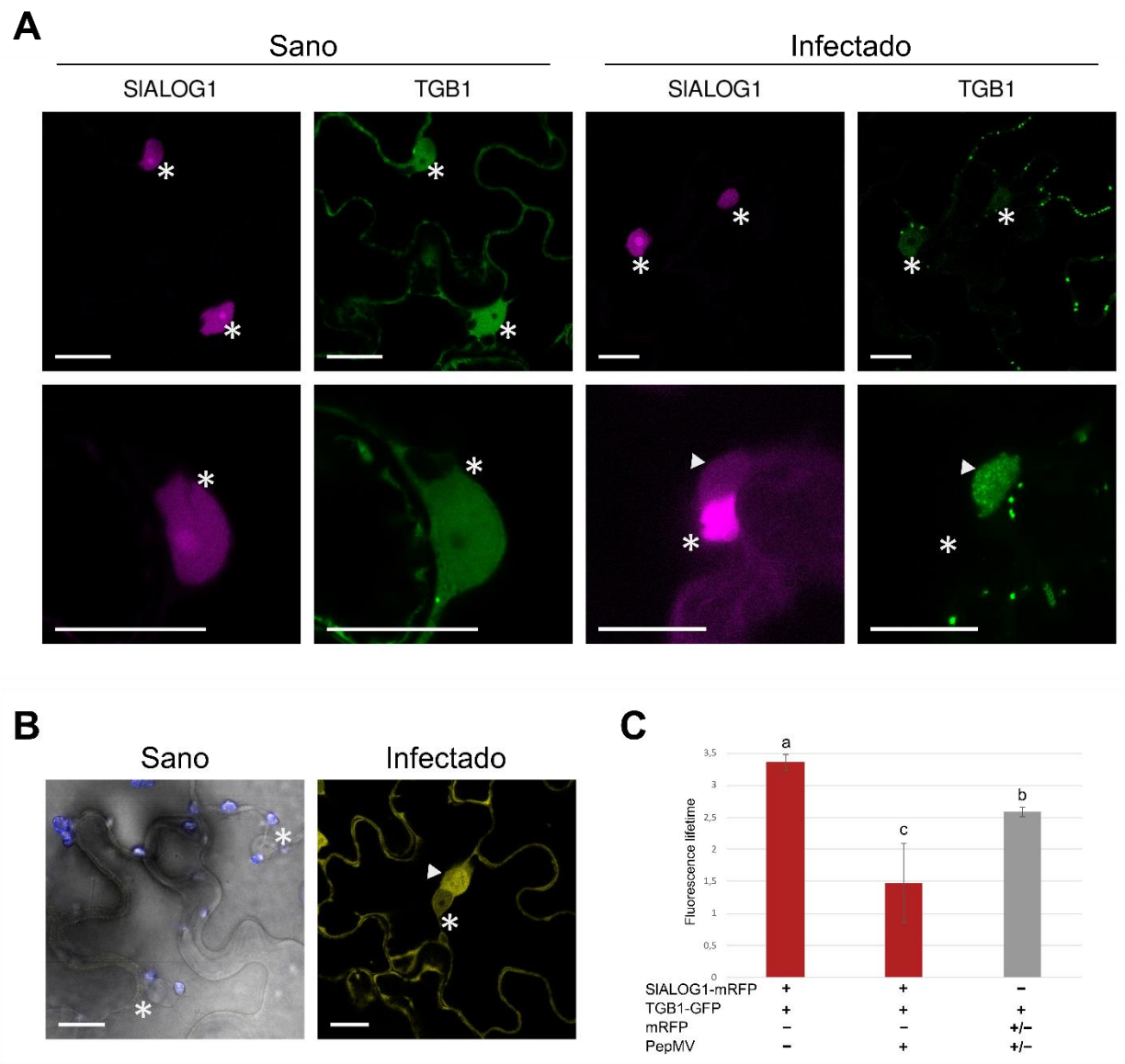


Figura 4.11. Análisis espacial de la interacción SIALOG1-TGB1. **A.** Co-localización de SIALOG1 y TGB1 en células sanas e infectadas. En magenta se muestra SIALOG1-mRFP (canal magenta) y TGB1-GFP (canal verde). **B.** Estudio de la interacción SIALOG1-TGB1 mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC). Se muestra la reconstitución de fluorescencia YFP en células sanas e infectadas que expresan SIALOG1-nYFP y TGB1-cYFP. En la imagen correspondiente a células sanas se muestra la superposición del campo claro. Las imágenes del canal correspondiente a la autofluorescencia de los cloroplastos se muestra en azul. Los núcleos se indican con asteriscos y los orgánulos de replicación viral (VROs) con cabezas de flecha. La barra de tamaño representa 20 μm . **C.** Cuantificación de la interacción mediante transferencia de energía por resonancia de Förster medida por tiempo de vida de fluorescencia (FRET-FLIM). Se empleó TGB1-GFP como donador y SIALOG1-mRFP como aceptor. Se cuantificó la vida media de fluorescencia de la GFP en núcleos de células de *N. benthamiana* sanas e infectadas por PepMV. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas mediante análisis *one-way* ANOVA seguido de test post-hoc Tukey, $p < 0,05$.

Para confirmar la interacción entre las dos proteínas, se realizaron análisis complementarios *in planta* basados en microscopía confocal: complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC), y transferencia de energía por resonancia de Förster medida por microscopía de tiempo de vida de fluorescencia (FRET-FLIM).

El análisis mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) reveló una reconstitución de la señal de fluorescencia únicamente en células infectadas por PepMV, mientras que, en células sanas, pese a la co-localización nuclear descrita previamente, no se observó reconstitución de fluorescencia (Figura 4.11 B). En células infectadas, la señal de fluorescencia se registró en núcleo, citoplasma y VROs (Figura 4.11 B), coincidiendo con la co-localización descrita en los apartados previos. Este resultado demuestra que la interacción SIALOG1-TGB1 es dependiente de la infección.

De forma complementaria, se empleó la técnica FRET-FLIM. En los núcleos de células infectadas, se observó una reducción estadísticamente significativa del tiempo de vida medio (τ) de GFP con respecto a los controles, que incluían las mediciones de τ de TGB1-GFP en ausencia de aceptor, así como en presencia del aceptor mRFP no fusionado a SIALOG1, tanto en células sanas como infectadas (Figura 4.11 C). Esta reducción en el tiempo de vida confirma la interacción entre SIALOG1 y TGB1 en núcleos de células infectadas. En los núcleos de células sanas, no se detectó una reducción en las medidas de τ de GFP en comparación con los

controles (Figura 4.11 C). Estos resultados corroboran los obtenidos mediante BiFC, confirmando que la interacción entre SIALOG1 y TGB1 en núcleo es dependiente de la infección.

4.3.4. Evaluación del fenotipo de otros miembros de la familia ALOG ante la infección por PepMV

Dada la elevada similitud en la secuencia de aminoácidos (Figura 4.6 B) y el perfil de expresión durante el desarrollo (Figura 4.7 B) entre los distintos miembros de la familia ALOG de tomate, se seleccionaron cuatro miembros adicionales a SIALOG1 para caracterizar su localización subcelular en respuesta a la infección por PepMV, con el objetivo de comprobar si el fenotipo de localización de SIALOG1 durante la infección es específico o genérico de la familia ALOG. La selección se basó en dos criterios complementarios: i) se seleccionaron candidatos representativos de cada uno de los clados definidos en el análisis filogenético (Figura 4.7 A), y ii) se priorizaron aquellos genes cuyo perfil de expresión durante el desarrollo presentaba mayor similitud con el de *SIALOG1* (Figura 4.7 B). Los genes seleccionados fueron *SIALOG4*, *SIALOG5*, *SIALOG9* y *SIALOG11*.

En células sanas, las cuatro proteínas SIALOG analizadas se localizaron exclusivamente en el núcleo (Figura 4.12). SIALOG5 mostró una distribución homogénea entre carioplasma y nucleolo, mientras SIALOG4 y 11 presentaron exclusión parcial del nucleolo. Por el contrario, SIALOG9 se concentro en nucleolo. Durante la infección por PepMV, las cuatro proteínas SIALOG estudiadas, adicionales a SIALOG1, permanecieron confinadas en el núcleo (Figura 4.12); sin embargo, se detectaron alteraciones en su patrón de localización, caracterizadas por una pérdida generalizada de su localización nucleolar. Estos cambios podrían reflejar una remodelación de la arquitectura nuclear en respuesta a la infección. En conjunto estos resultados indican que el reclutamiento a VROs constituye un fenotipo específico de SIALOG1 entre los SIALOG analizados.

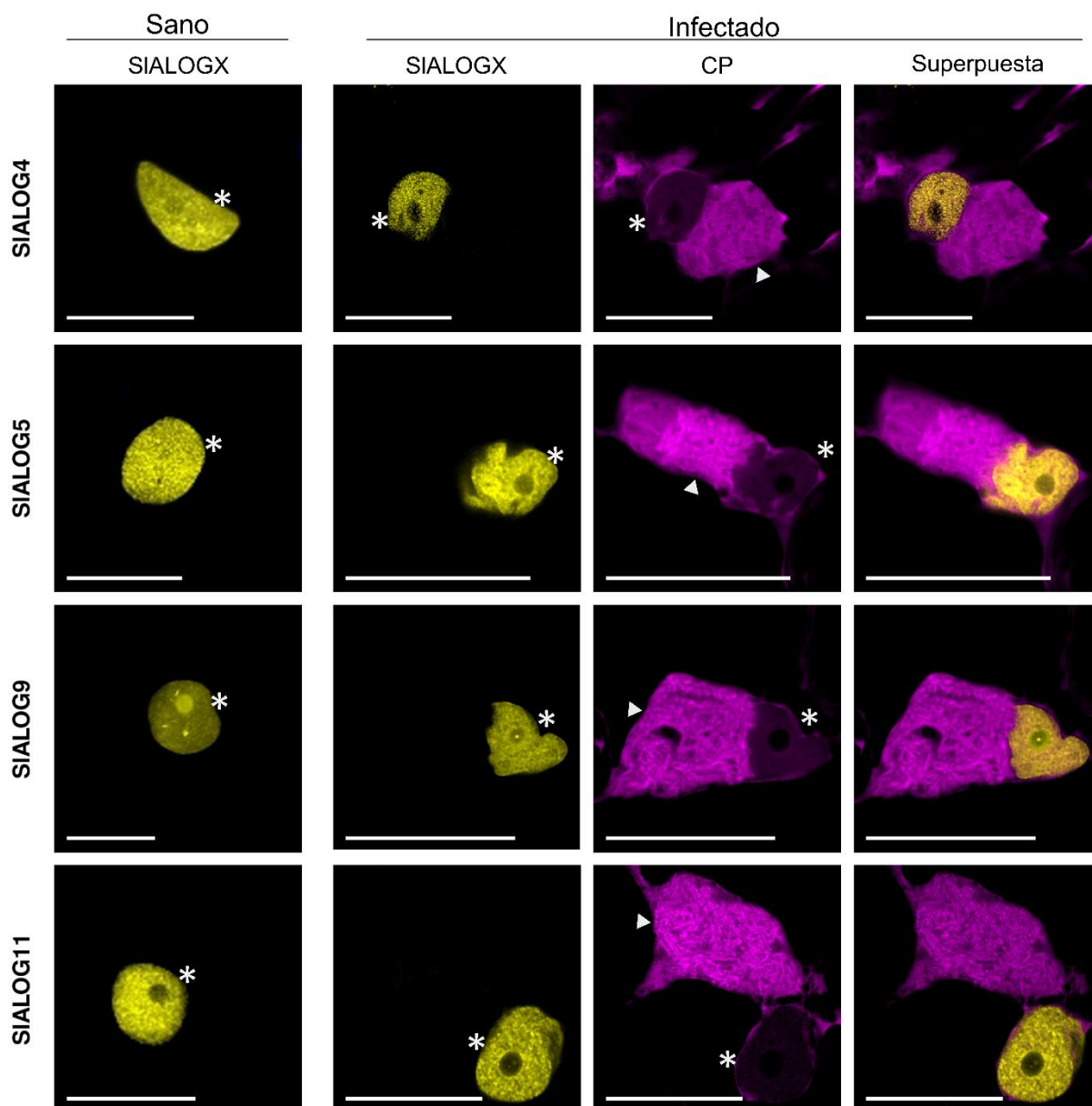


Figura 4.12. Localización subcelular de miembros representativos de la familia ALOG de tomate en células sanas e infectadas. Distribución subcelular de proteínas ALOG de *Solanum lycopersicum* fusionadas a EYFP (canal amarillo) en células epiteliales de *N. benthamiana*. Los paneles de la izquierda muestran células sanas. A la derecha se muestran células infectadas con la señal de la proteína SIALOGX (canal amarillo), la CP de PepMV (canal magenta) y la superposición de ambos canales. Los núcleos se indican con asteriscos y los orgánulos de replicación viral (VROs) con cabezas de flecha. La barra de tamaño representa 20 μm .

4.3.5. Análisis de mutantes de delección y quimeras de SIALOG1 y SIALOG5

Con el objetivo de mapear la/s región/es responsable/s de la interacción entre SIALOG1 y TGB1, se construyeron mutantes de delección de SIALOG1 y quimeras

entre SIALOG1 y 5 en base a i) la arquitectura modular de las proteínas ALOG, ii) la elevada identidad de aminoácidos y estrecha relación filogenética entre SIALOG1 y SIALOG5, y iii) la gran diferencia en cuanto a la localización subcelular observada entre SIALOG1 y SIALOG5 durante la infección por PepMV.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de SIALOG1 predijo dos IDRs en las regiones N- y C-terminales, uno en la posición 14-50 y otro en posición 144-180, ambos solapando con la región de la proteína correspondiente al dominio ALOG (Figura 4.13 A). De igual modo se identificaron dos IDR en los extremos de SIALOG5, uno en posición 1-58 y otro en en posición 130-220 (Figura 4.13 A). Estos IDRs han sido previamente descritos y caracterizados experimentalmente (Huang et al., 2022).

Aprovechando la estructura modular de ambas proteínas (Figura 4.13 A), se generaron construcciones de delección eliminando selectivamente cada IDR en SIALOG1, así como construcciones quiméricas mediante intercambio modular de los IDRs entre SIALOG1 y SIALOG5 (Figura 4.13 B). Todas las construcciones fueron fusionadas a EYFP para evaluar su capacidad de ser reclutadas a VROs durante la infección por PepMV (Figura 4.13 B).

Las proteínas EYFP-SIALOG1 Δ IDR1.1 y EYFP-SIALOG1 Δ IDR1.2 mostraron una reducción significativa en su localización en VROs (Figura 4.14) comparadas con la proteína completa (Figura 4.9). La delección del IDR1.2 redujo el reclutamiento a VROs considerablemente, mientras que la delección del IDR1.1 mostró una reducción más acusada (Figura 4.14).

Ninguna de las proteínas quiméricas generadas presentó localización en VROs (Figura 4.14), en contraste con la marcada localización en VROs de SIALOG1 (Figura 4.9), sugiriendo que no hay redundancia funcional entre los IDRs de SIALOG1 y SIALOG5.

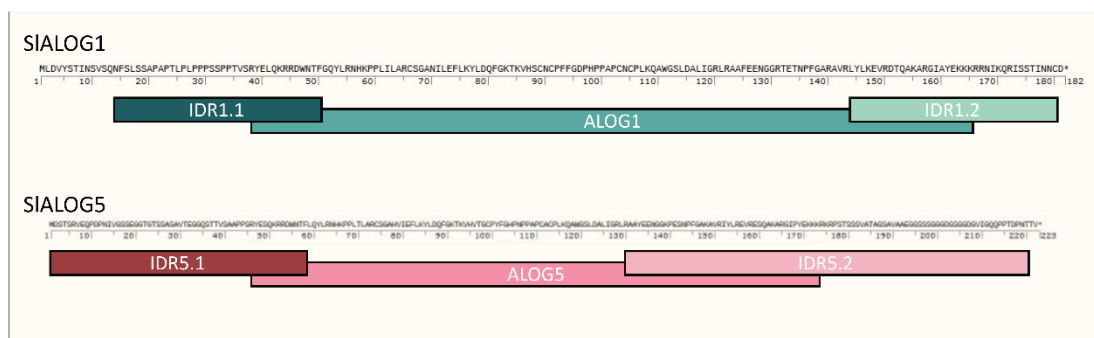
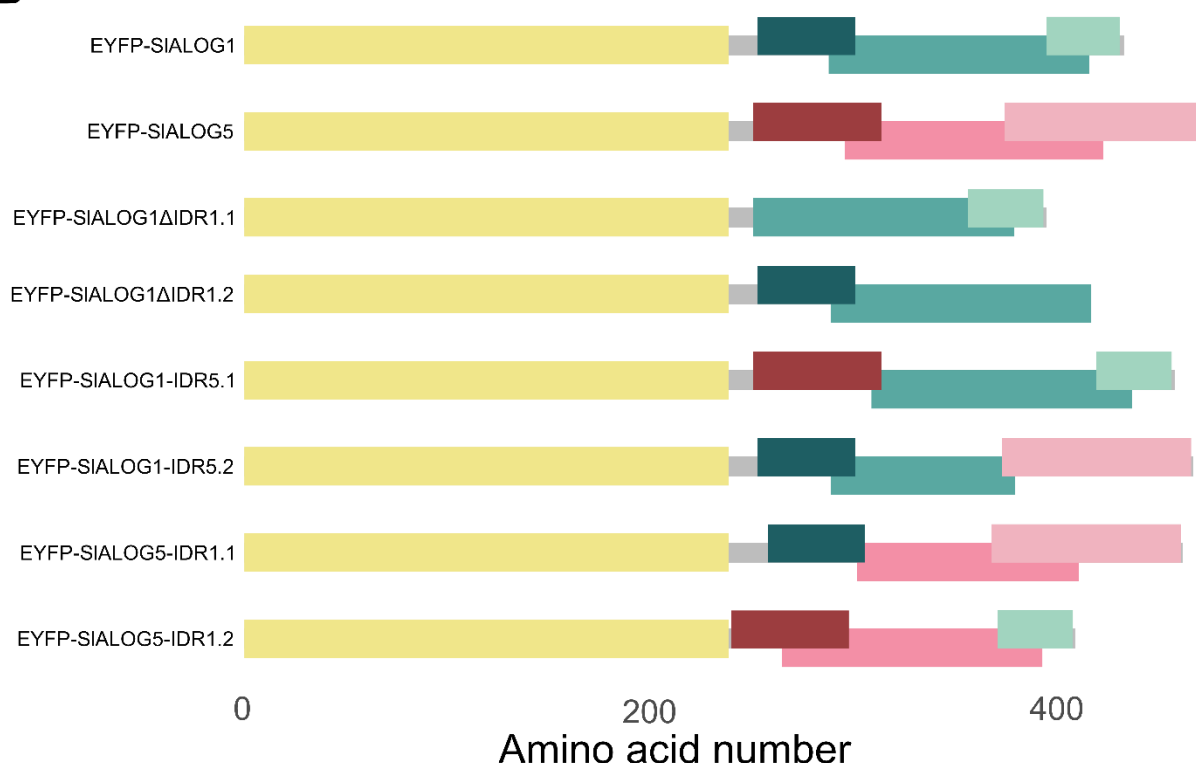
A**B**

Figura 4.13. Arquitectura modular de proteínas ALOG y construcciones generadas. A. Estructura de SIALOG1 y SIALOG5. Secuencia de SIALOG1 y SIALOG5 indicando la localización de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en los extremos N- y C-terminales, así como el dominio ALOG central. Los distintos colores identifican las diferentes proteínas y dominios. **B.** Representación esquemática de las construcciones de delección y quiméricas generadas. Los diferentes dominios quedan representados de acuerdo con el código de colores introducido en el panel A. Adicionalmente, se representa en amarillo la posición de la proteína fluorescente amarilla (EYF). Las diferentes cajas están representadas a escala mostrándose la barra de tamaño en la parte inferior de la figura.

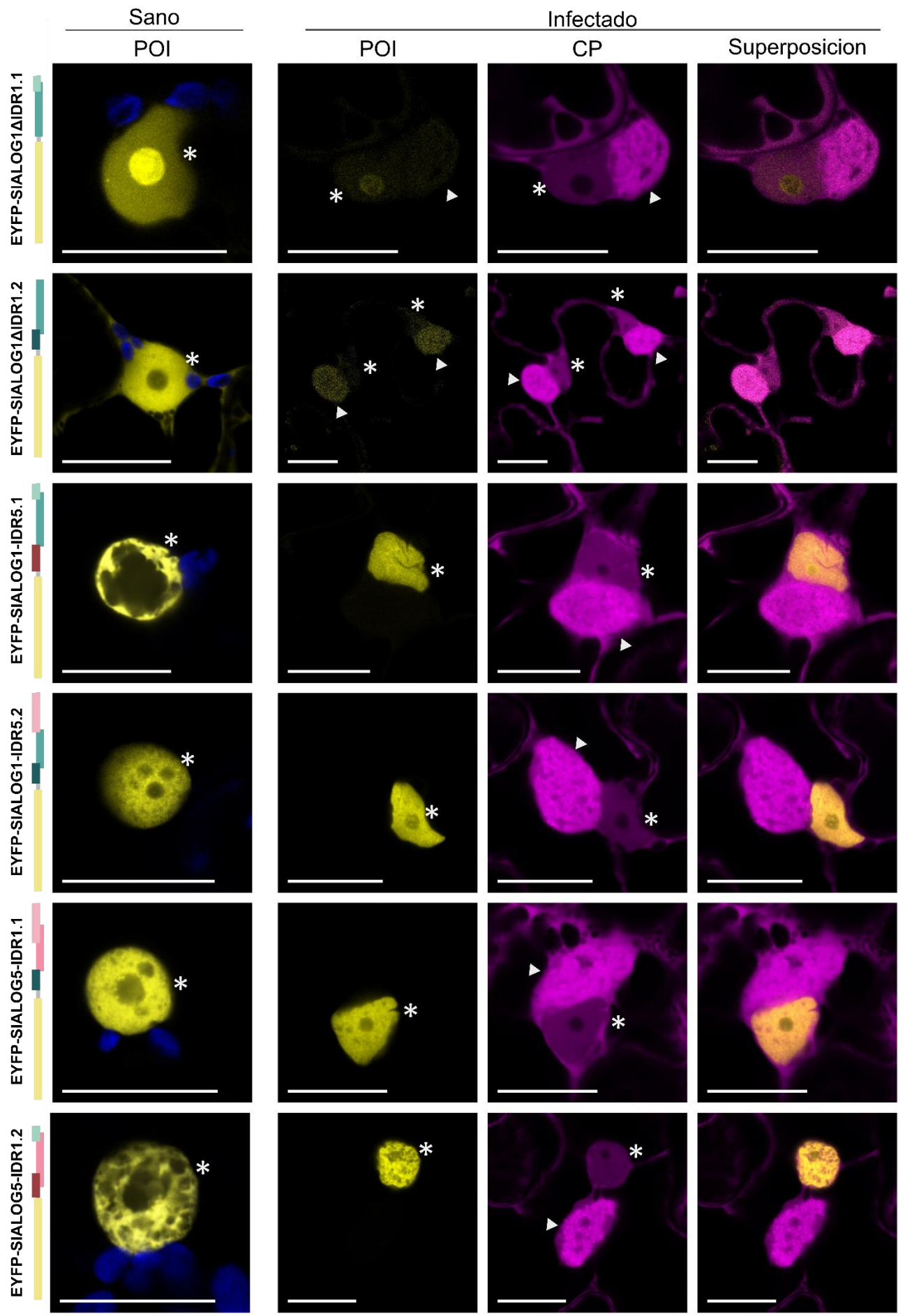


Figura 4.14. Análisis de localización subcelular de mutantes de delección y quimeras de SIALOG1 y SIALOG5. Imágenes representativas de la localización subcelular de versiones truncadas de SIALOG1 y proteínas quiméricas entre SIALOG1 y SIALOG5, fusionadas a EYFP y expresadas transitoriamente en células epiteliales de *N. benthamiana*. Los paneles izquierdos corresponden a células sanas. A la derecha se muestran células infectadas por PepMV, con imágenes representativas de los canales de la proteína de interés (POI) (canal amarillo), la CP de PepMV (canal magenta) y la superposición de ambos canales. Al lado del nombre de cada construcción, se muestra su esquema según la Figura 4.13. Los núcleos se indican con asteriscos y los orgánulos de replicación viral se señalan con cabezas de flecha. La barra de tamaño corresponde a 20 μm .

4.3.6. RNAseq del mutante *slalog1*

Con el objetivo de caracterizar la influencia de SIALOG1 en la configuración del transcriptoma de tomate durante la infección por PepMV, se realizó un RNA-seq en plantas de tomate cv. MicroTom de genotipo silvestre (WT) y el mutante nulo *slalog1*, en condiciones control (mock-inoculadas) o infectadas por PepMV. Las plantas se muestrearon a 7 dpi porque en ese momento los cambios transcriptómicos inducidos por PepMV tienen más amplitud (Alcaide et al., 2022). A este tiempo postinfección no se observaron diferencias significativas en la acumulación de PepMV en el genotipo *slalog1* con respecto al WT (Figura 4.15 A).

El análisis de componentes principales (PCA) reveló el agrupamiento de las réplicas biológicas dentro de cada tratamiento y una segregación muy clara de los cuatro tratamientos (Figura 4.15 B). El componente 1 explicó el 28,1% de la varianza total y diferenció las plantas infectadas por PepMV de las mock-inoculadas, mientras que el componente 2 explicó el 19,7% de la varianza total separando los genotipos WT y *slalog1* (Figura 4.15 B).

El número total de genes expresados, definido como fragmentos por kilobase por millón de fragmentos mapeados (FPKM) ≥ 1 , fue comparable entre los cuatro tratamientos superando los 17.000 genes en cada uno de ellos. Se identificaron los genes diferencialmente expresados (DEGs) para las comparaciones pareadas: i) WT-Infectado (WT-I) vs WT-mock (WT-M), para estudiar el efecto de la infección en fondo silvestre, ii) *slalog1*-I vs *slalog1*-M, efecto de PepMV en el fondo mutante, iii) *slalog1*-

Resultados

M vs WT-M, efecto de la mutación en condiciones basales, y iv) *slalog1*-I vs WT-I, diferencias en la respuesta a la infección.

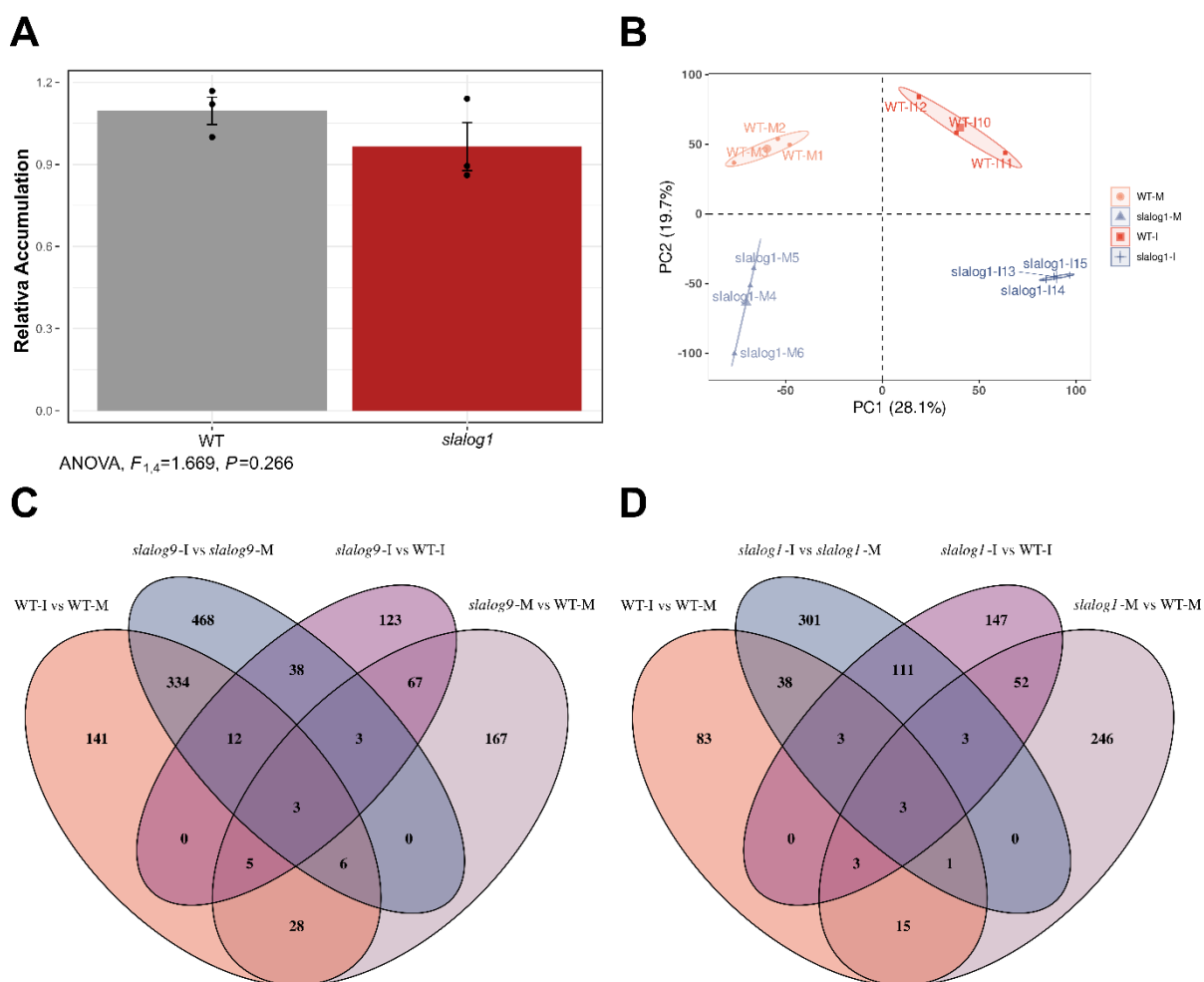


Figura 4.15. RNAseq de plantas de tomate de genotipo *slalog1*. **A.** Ensayo de susceptibilidad a PepMV en plantas *slalog1*. Se muestra la acumulación viral relativa a 7 días postinoculación en plantas infectadas mecánicamente con una suspensión de viriones de PepMV, comparando plantas de genotipo silvestre (WT, gris) y mutante (*slalog1*, rojo). La acumulación viral fue cuantificada mediante RT-qPCR relativa a partir de *pooles* de tres extracciones independientes de ARN total extraído individualmente. Como gen de referencia para la normalización de la expresión se utilizó la subunidad 25S del ARN ribosomal. **B.** Análisis de componentes principales (PCA). Los grupos biológicos ensayados fueron silvestre mock-inoculado (WT-M), *slalog1* mock-inoculado (*slalog1*-M), silvestre infectado con PepMV (WT-I) y *slalog1* infectado por PepMV (*slalog1*-I). **C** y **D.** Diagramas de Venn. Se muestran los genes diferencialmente expresados (DEGs) (**C**) inducidos y (**D**) reprimidos.

El análisis de intersección mediante diagramas de Venn reveló que 355 DEGs inducidos y 45 reprimidos fueron compartidos entre las comparaciones WT-I vs WT-M y *slalog1*-I vs *slalog1*-M (Figura 4.15 C y D), representando una respuesta

transcripcional conservada a la infección viral independiente de la mutación. Por el contrario, 174 DEGs inducidos y 101 reprimidos fueron específicos de la comparación WT-I vs WT-M (Figura 4.15 C y D) constituyendo posibles genes cuya regulación por PepMV es dependiente de SIALOG1. 509 DEGs inducidos y 415 reprimidos fueron específicos para la comparación *slalog1*-I vs *slalog1*-M (Figura 4.15 C y D) representando posiblemente una respuesta transcripcional a la infección compensatoria o aberrante ante la ausencia de SIALOG1.

Para estudiar funcionalmente los DEGs, se realizó un análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO, *Gene Ontology*). La significancia estadística se ajustó utilizando un $p.adjust < 0,05$ para reducir la tasa de falsos positivos derivada de las comparaciones múltiples (Figura 4.16). En la comparación WT-I vs WT-M se detectó una sobre-representación en términos asociados a la actividad quinasa (*transmembrane receptor protein serine/threonine kinase activity*, *kinase activity* y *transmembrane receptor protein kinase activity*), respuesta antioxidante (*glutathione transferase activity* y *arsenate reductase [glutaredoxin] activity*) y actividad *chlorophyll binding*. La mutación de SIALOG1 parece tener un efecto en el transporte de péptidos (*dipeptide transmembrane transporter activity*) y regulación de la actividad transcripcional de la ARN polimerasa II (*DNA-binding transcription activator activity*, *RNA polymerase II-specific*), tal como destaca la comparación *slalog1*-M vs WT-M. En cuanto a la respuesta a la infección en el mutante *slalog1* únicamente se observa un fuerte enriquecimiento en el término *regulation of DNA-templated transcription*. Aparece el término *dipeptide transmembrane transporter activity*, asociado a la mutación, y el término *glutathione transferase activity*, asociado a la infección (Figura 4.16 A). Finalmente, en la comparación entre plantas infectadas (*slalog1*-I vs WT-I) aparece el término *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase activity*, relacionado con el paso limitante en la síntesis de la fitohormona etileno (Figura 4.16 A).

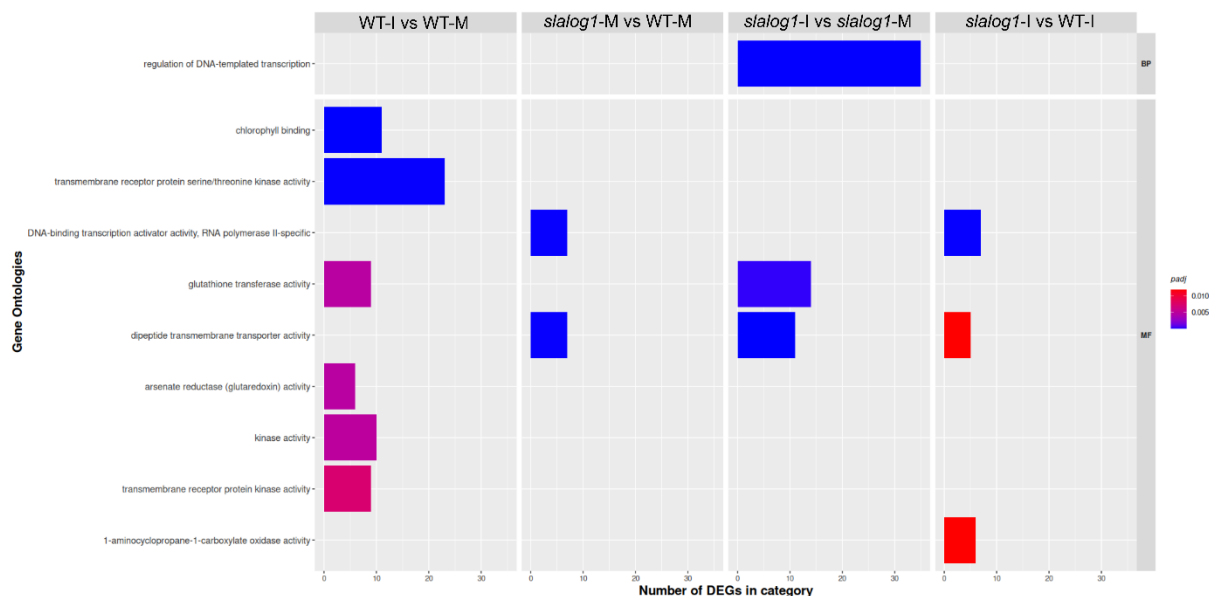
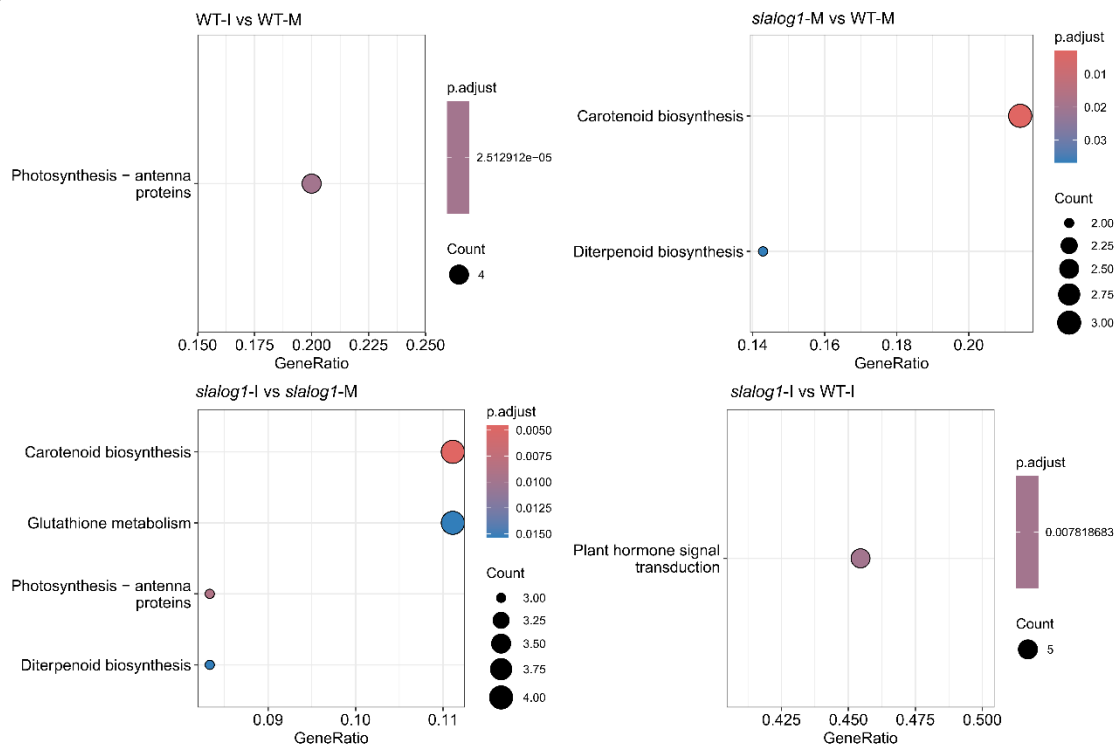
A**B**

Figura 4.16. Estudio funcional de los genes diferencialmente expresados (DEGs). **A.** Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO). Se muestran las categorías ontológicas sobrerrepresentadas en cada comparación. El tamaño de cada barra indica el número de DEGs por categoría y el color representa el grado de significancia ($p.adjust < 0,05$). **B.** Análisis de términos KEGG. Se muestran las categorías KEGG sobrerrepresentadas en cada comparación. El tamaño de cada punto representa el número de DEGs por categoría asociada y el color representa el grado de significancia estadística ($p.adjust < 0,05$).

Para obtener una perspectiva más integradora de los procesos biológicos alterados entre los distintos grupos biológicos, se completó el análisis GO con un

análisis de enriquecimiento en vías metabólicas mediante la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Este análisis reveló una desregulación de la biosíntesis de carotenoides y diterpenoides asociadas a la mutación, y alteraciones adicionales en el metabolismo del glutatión en la respuesta a la infección del mutante (Figura 4.16 B). En la comparación *slalog1*-I vs WT-I, la señalización hormonal se encuentra desregulada (Figura 4.16 B).

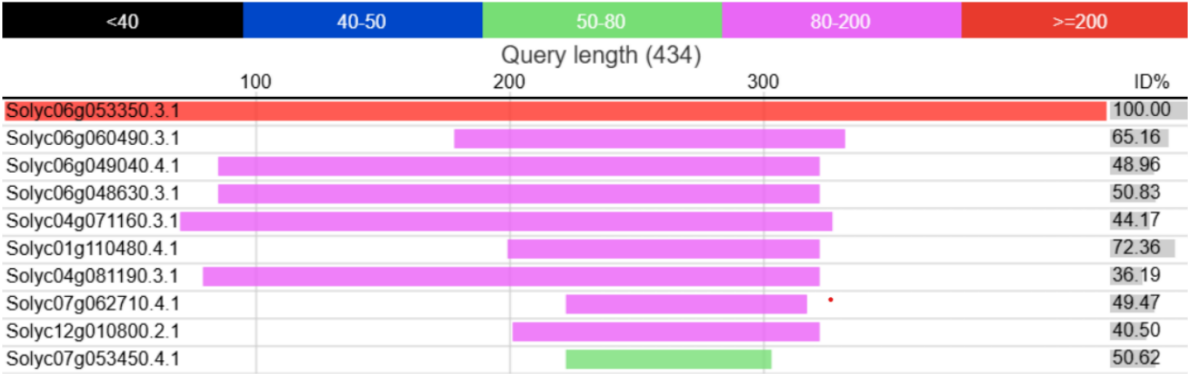
4.4. Caracterización de SlbZIP42

El gen anotado como *Solyc06g053350* (Figura 4.5 C y E) se localiza en la cadena negativa del cromosoma 6 del genoma de tomate y presenta una estructura genómica compleja compuesta por cuatro exones y tres intrones. La secuencia anotada del gen, incluyendo las regiones no traducidas, presenta una longitud de 7.113 pb. La región 5'UTR tiene una extensión de 263 pb, mientras que la 3'UTR de 315 pb. Los exones que forman el gen presentan longitudes de 689, 133, 85 y 398 pb en sentido 5'-3', mientras que los intrones presentan extensiones superiores, siendo 3.924, 253 y 1.054 pb las longitudes de los diferentes intrones anotados. El CDS del gen es de 1305 pb y codifica una proteína de 434 aa con un peso molecular teórico de ~47 kDa.

Un análisis mediante BLASTP contra la base de datos Sol Genomics Network identificó nueve proteínas en el genoma de tomate con alta similitud, sobre todo en la región central (Figura 4.17 A). Las 10 proteínas identificadas están anotadas como miembros de la familia *basic leucine zipper* (bZIP). La pertenencia de estas proteínas a la familia bZIP fue confirmada mediante la identificación del dominio canónico bZIP (IPR004827) de unión a ácidos nucleicos en todas ellas.

No obstante, la familia bZIP está altamente diversificada en plantas y se han descrito un total de 69 miembros en *S. lycopersicum* (D. Li et al., 2015). Para identificar todos los miembros potenciales de la familia, se realizó una búsqueda por homología mediante BLASTP utilizando el dominio bZIP conservado como *query* contra la base

A



B

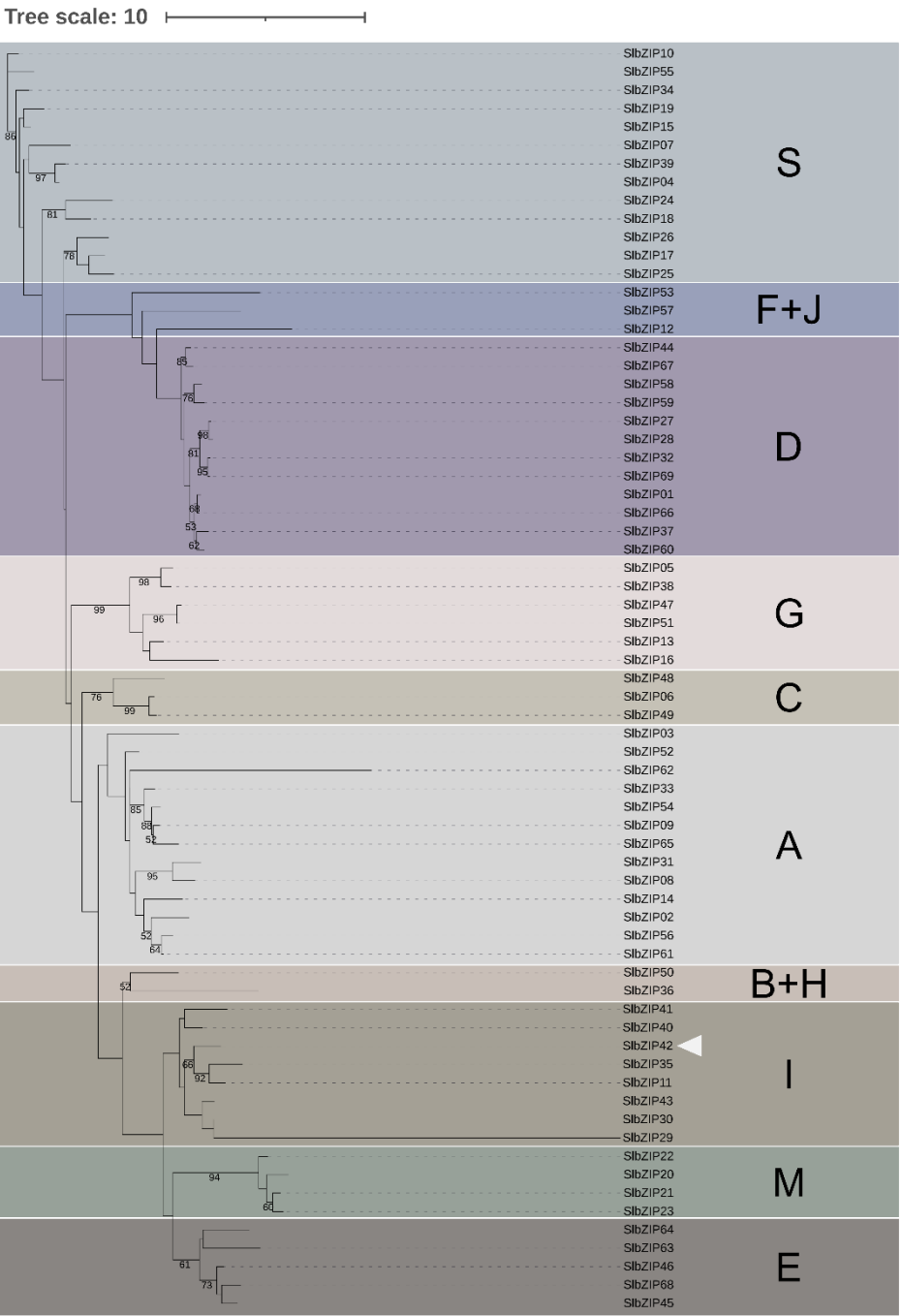


Figura 4.17. Análisis de homología y relaciones filogenéticas de *Solyc06g053350* con la familia bZIP. A. BLASTP del candidato de Y2H frente a la base de datos Sol Genomics Network. Se muestran los 10 genes identificados con su porcentaje de identidad (ID%) a la secuencia obtenida de cuatro clones en el escrutinio Y2H. **B. Reconstrucción filogenética de la familia bZIP en tomate.** Árbol filogenético de las 69 proteínas de la familia bZIP de *S. lycopersicum* (SlbZIP). La filogenia fue inferida mediante el método de máxima verosimilitud utilizando el modelo JTT+G, con 1000 iteraciones para el cálculo de *bootstrap*; se indican los valores de soporte $\geq 50\%$, así como la escala del árbol. El análisis se realizó con el software MEGA7. El árbol está enraizado en el punto medio. Se indican los distintos miembros de cada uno de los clados presentes en *S. lycopersicum* con un sombreado y la letra que lo representa.

de datos Sol Genomics Network empleando un *E-value threshold* permisivo de 1,0, siguiendo la metodología establecida por Li et al. (D. Li et al., 2015). Utilizando estos criterios, se identificaron los 69 genes no redundantes de la familia SlbZIP (Figura 4.17 B) (D. Li et al., 2015).

Por uniformidad y sistemática, se adoptó una nomenclatura basada en el prefijo SlbZIP seguido de numeros correlativos reflejando la posición relativa en el genoma, de acuerdo con los criterios establecidos en revisiones previas (Dröge-Laser et al., 2018; D. Li et al., 2015). Así, los miembros de la familia bZIP en tomate se nombran como SlbZIP1-69, siendo el gen *Solyc06g053350*, objeto de esta tesis doctoral, nombrado como *SlbZIP42*.

Un análisis filogenético de los 69 miembros de la familia bZIP en tomate permitió identificar 12 de los 13 grupos descritos en la bibliografía, a excepción del grupo K (Figura 4.17 B). SlbZIP42 forma parte del grupo I, junto a SlbZIP11, 29, 30, 35, 40, 41 y 43 (Figura 4.17 B). El grupo I es uno de los peor caracterizados dentro de la familia bZIP y algunos de sus miembros han sido relacionados con funciones del desarrollo vascular, señalización osmótica y activación de genes de defensa ante ciertas condiciones redox (Dröge-Laser et al., 2018). Respecto a la respuesta a patógenos, solo VIP1 (AtbZIP51) ha sido caracterizado en su papel en respuesta a *Agrobacterium* y estrés oxidativo (Tzfira et al., 2001). La identificación de SlbZIP42 como interactor putativo de la proteína viral TGB1 en esta tesis doctoral representa la primera descripción de interacción directa entre un miembro del grupo I de bZIP y una proteína viral.

Estructuralmente, SlbZIP42, al igual que todos los miembros descritos de la familia bZIP, comparte una arquitectura modular característica (Dröge-Laser et al., 2018). SlbZIP42 presenta un dominio bZIP central con estructura tridimensional definida, flanqueado por regiones N- y C-terminales flexibles (Figura 4.18 A). El dominio bZIP incluye la región de unión a ácidos nucleicos y *leucine zipper* con un papel en la homo y heterodimerización (Figura 4.18 B). A lo largo de la secuencia de SlbZIP42 se pueden identificar diferentes regiones predichas como IDRs (Figura 4.18 C).

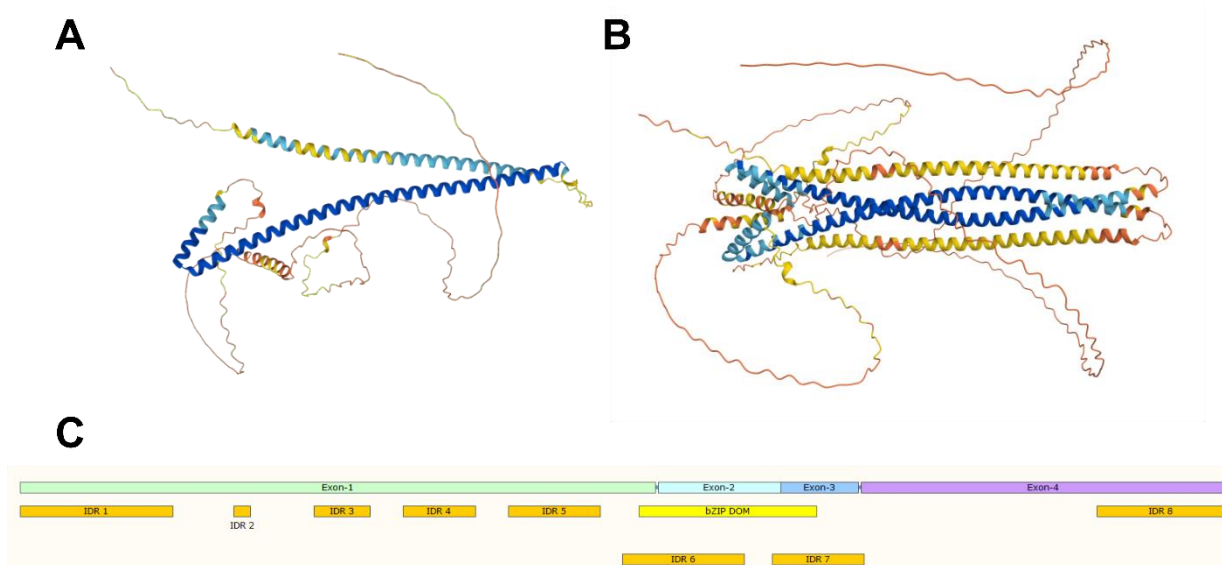


Figura 4.18. Estructura de SlbZIP42. A-B. Modelo 3D de SlbZIP42. El modelo se generó mediante AlphaFold Server. Se destaca el dominio bZIP, más estructurado, en azul oscuro. **(A).** Monómero. **(B).** Homodímero de SlbZIP42. **C. Dominios predichos de SlbZIP42.** Se muestran las regiones intrínsecamente desordenadas (IDR) predichas mediante PONDR VLXT y el dominio conservado bZIP identificado mediante InterProScan (IPR004827).

4.4.1. Evaluación de la susceptibilidad de la línea *slbzip42* a PepMV

Como en el caso de SIALOG1, se generaron líneas de mutantes nulos en *SlbZIP42* en tomate cv. MicroTom utilizando la tecnología CRISPR/Cas9. Para los ensayos de susceptibilidad a PepMV se seleccionó la línea mutante *slbzip42* caracterizada por la delección de una adenina en posición 313, que genera un codón de stop prematuro en posición 360 (Figura 4.19 A). Esta mutación, según la predicción *in silico*, impide la expresión de la proteína, dada la proximidad entre el codón de inicio y el de stop. La línea *slbzip42* no mostró diferencias fenotípicas

apreciables en condiciones normales de cultivo, ni frente a la infección por PepMV a los tiempos de muestreo (Figura 4.19 B).

A



B



C

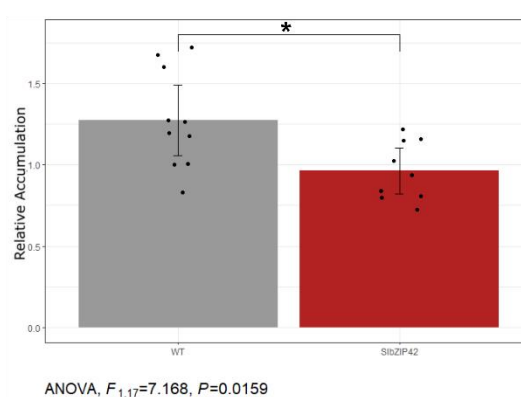


Figura 4.19. Caracterización de la línea mutante *slbzip42* en MicroTom. A. Esquema de la edición mediante CRISPR/Cas9 del gen *SlbZIP42*. Se muestra una representación de la región codificante (CDS) de *SlbZIP42* y la posición del ARN guía (gRNA). La ampliación muestra: la secuencia silvestre (WT) del gen con la posición del gRNA y la secuencia PAM, así como la secuencia mutante (*slbzip42*) resultante de la delección de un nucleótido en la región diana (sombreado en azul), que genera un codón de stop prematuro (sombreado en rojo). **B.** Inoculación de plantas de la línea *slbzip42*. Se muestran plantas representativas de la línea mutante *slbzip42* sanas e infectadas con PepMV a 14 dpi, en comparación con plantas de genotipo silvestre con el mismo fondo genético. La barra morada representa 10 cm. **C.** Ensayo de susceptibilidad a PepMV en plantas *slbzip42*. Se muestra la acumulación viral relativa en plantas inoculadas mecánicamente con PepMV a 14 dpi, comparando plantas de genotipo silvestre (WT) y mutante (*slbzip42*). La acumulación viral fue cuantificada mediante RT-qPCR relativa a partir de ARN total extraído individualmente de cada planta. Como gen de referencia para la normalización de la expresión se utilizó la subunidad 25S del ARN ribosomal. El asterisco indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos calculada mediante un test *one-way* ANOVA con un p -valor = 0,0159.

Para cada uno de los ensayos de susceptibilidad se emplearon al menos 10 plantas por genotipo y tratamiento; todas ellas fueron genotipadas de forma individual. A los 14 dpi se realizó el muestreo y, tras la extracción de ARN total, se procedió a la cuantificación de la acumulación de PepMV en las muestras de forma

individual mediante RT-qPCR relativa. Los resultados obtenidos fueron reproducidos entre las diferentes réplicas biológicas y los diferentes ensayos realizados ($n > 3$), mostrando una reducción estadísticamente significativa de la acumulación viral en plantas *slbzip42* en comparación con las de genotipo WT (Figura 4.19 C). Estos resultados sugieren una función de SlbZIP42 como factor proviral durante la infección por PepMV.

4.4.2. Localización subcelular de SlbZIP42

Para determinar la localización subcelular de SlbZIP42, se empleó la proteína SlbZIP42-mRFP expresada de forma transitoria en células epidérmicas de *N. benthamiana* sanas e infectadas por PepMV.

En células sanas, la proteína de fusión SlbZIP42-mRFP mostró una distribución nuclear y citoplasmática, con exclusión selectiva del nucleolo (Figura 4.20). Durante la infección por PepMV, la proteína mantuvo esta localización núcleo-citoplásmica; sin embargo, se observó una reducción en la intensidad de la señal de fluorescencia en núcleo respecto a la señal de citoplasma (Figura 4.20). De manera significativa, SlbZIP42 localizó en los VROs situados en la periferia nuclear, donde colocalizó con la CP de PepMV (Figura 4.20 columna CP).

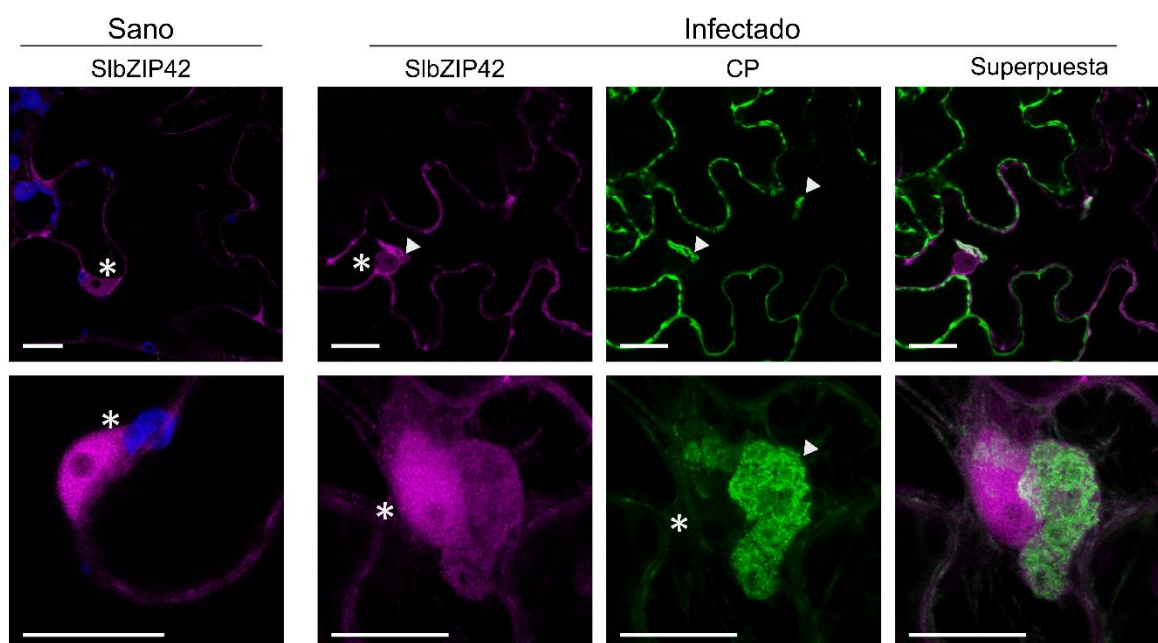
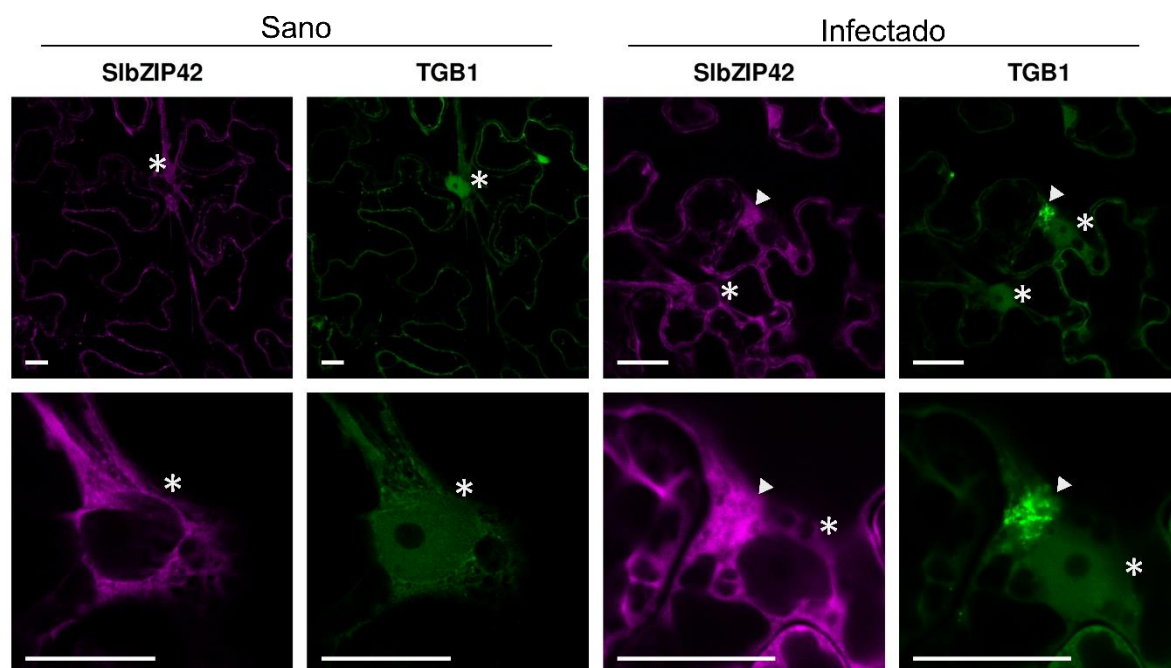


Figura 4.20. Localización subcelular de SlbZIP42 en células sanas e infectadas por PepMV. Se muestra la localización subcelular de la proteína de fusión SlbZIP42-mRFP (canal magenta) en células sanas (izquierda) e infectadas por PepMV (derecha). En los paneles de células infectadas se muestran imágenes de SlbZIP42-mRFP (canal magenta), la CP (canal verde), expresada a partir del clon agroinfectivo PepMV-GFP, así como la superposición entre ambos canales. En azul se muestra la autofluorescencia de los cloroplastos. Los núcleos se señalan con asteriscos y los orgánulos de replicación viral con cabezas de flecha. Las barras de tamaño representan 20 μ m.

4.4.3. Análisis de la interacción entre SlbZIP42 y TGB1

Para estudiar la colocalización de SlbZIP42 y TGB1 se emplearon SIALOG1-mRFP y TGB1-GFP para minimizar posibles interferencias espectrales entre los distintos canales de fluorescencia. En células sanas ambas proteínas mostraron colocalización en citoplasma y núcleo (Figura 4.21 A). En células infectadas por PepMV las proteínas coincidieron espacialmente en núcleo, citoplasma y VROs

A



B

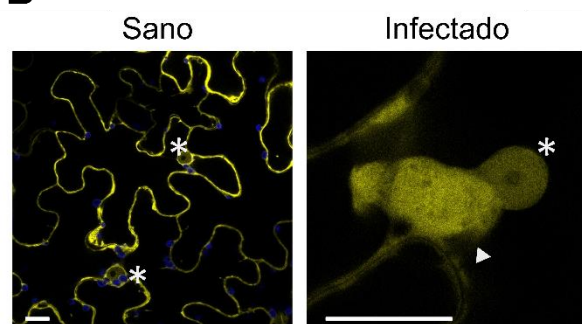


Figura 4.21. Análisis espacial de la interacción SlbZIP42-TGB1. A. Co-localización de SlbZIP42 y TGB1 en células sanas e infectadas. Se muestra imágenes representativas de SlbZIP42-mRFP (canal magenta) y TGB1-GFP (canal verde) en células epiteliales de *N. benthamiana*. **B.** Estudio de la interacción SlbZIP42-TGB1 mediante complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC). Se muestra imágenes correspondientes a células epiteliales que coexpresan SlbZIP42-nYFP y TGB1-cYFP en células sanas e infectadas por PepMV. En azul se muestra la autofluorescencia de cloroplastos. La infección se inició con el clon agroinfectivo PepMV-WT. Los núcleos se indican con asteriscos y los orgánulos de replicación viral con cabezas de flecha. Las barras de tamaño representan 20 μm .

(Figura 4.21 A), consistente con los patrones individuales observados previamente.

La interacción entre ambas proteínas se estudió mediante BiFC empleando las proteínas de fusión SlbZIP42-nYFP y TGB1-cYFP. En células sanas se detectó reconstitución de la fluorescencia en núcleo y citoplasma (Figura 4.21 B). En células infectadas, la reconstitución de la fluorescencia se detectó en núcleo y citoplasma, sin embargo, la señal en citoplasma se concentró en los VROs (Figura 4.21 B). Se realizaron mediciones de tiempo de vida mediante FRET-FLIM como forma complementaria de demostrar la interacción SlbZIP42-TGB1. Para esta combinación de proteínas SlbZIP42-mRFP/TGB1-GFP se obtuvieron resultados no significativos en cuanto a decaimiento del tiempo de vida medio del donador (resultados no mostrados).

4.4.4. Estudio del Clado I de la familia bZIP de tomate

Para determinar si la localización observada en VROs es específica de SlbZIP42 o compartida con otros miembros del Clado I de la familia bZIP de tomate, se analizó la distribución subcelular de las proteínas SlbZIP11, SlbZIP30, SlbZIP40, SlbZIP41 y SlbZIP43 (Figura 4.17 B) en células epidérmicas de *N. benthamiana* sanas e infectadas por PepMV. Se seleccionaron estas proteínas por pertenecer al Clado I y ser representativas de su diversidad filogenética (Figura 4.17 B).

En células sanas, todas las proteínas estudiadas presentaron una localización núcleo-citoplasmática, a excepción de SlbZIP43, que mostró una localización exclusivamente nuclear. Todas las proteínas analizadas presentaron exclusión en nucleolo (Figura 4.22). Durante la infección por PepMV, SlbZIP30, SlbZIP40,

SlbZIP41 y SlbZIP43 localizaron en los VROs, marcados a través de la CP de PepMV (Figura 4.22). SlbZIP11 no mostró señal de fluorescencia aparente en los VROs durante la infección por PepMV, manteniendo su localización predominante en núcleo. Estos resultados sugieren un papel diferenciado de SlbZIP11 respecto al resto de miembros del Clado I de la familia bZIP analizados, incluyendo a SlbZIP42.

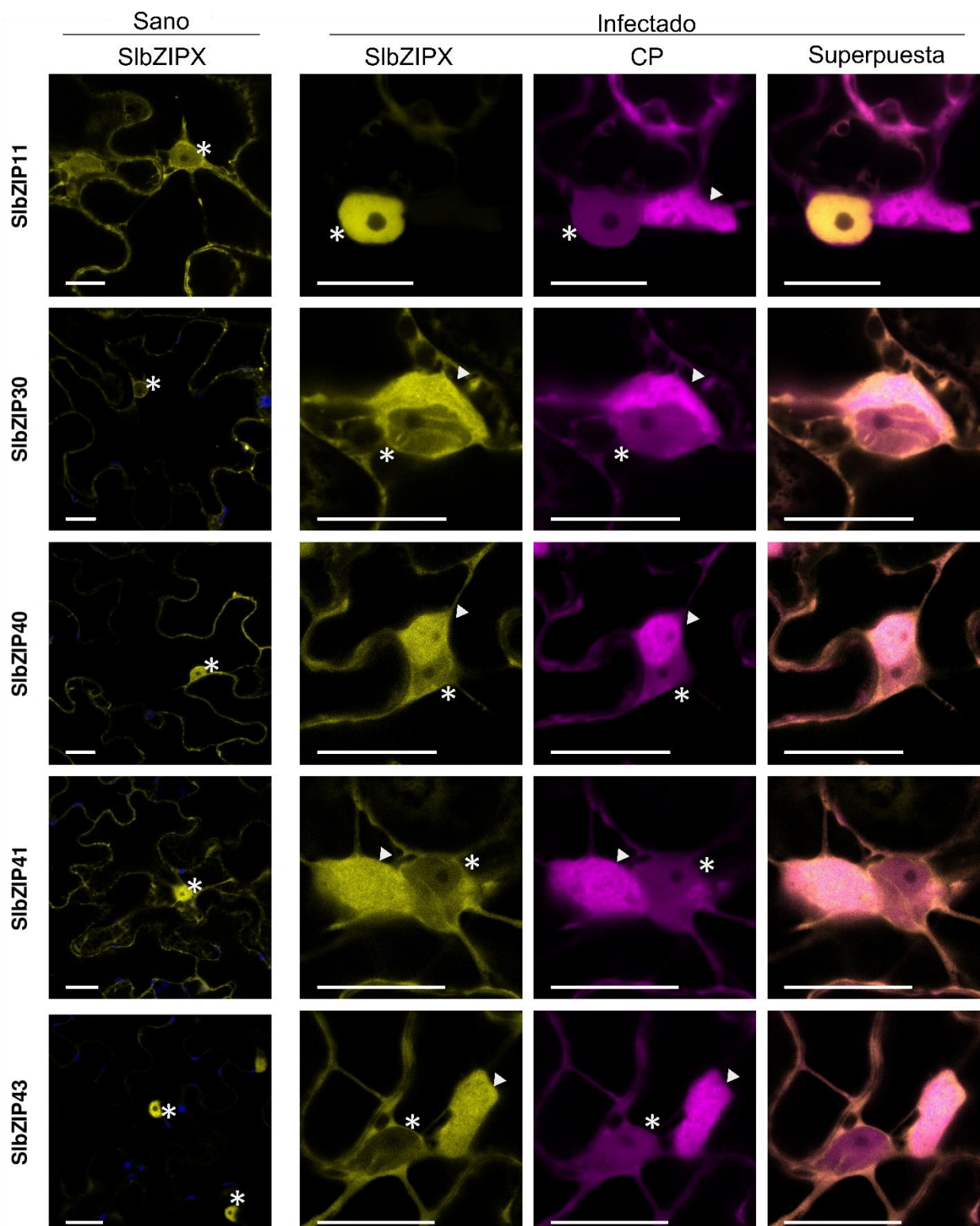


Figura 4.22. Estudio de la localización subcelular del Clado I de la familia bZIP de tomate. Las imágenes fueron tomadas en células epiteliales de *N. benthamiana* a 3 días post-agroinfiltración mediante CLSM. Se muestran imágenes representativas de los factores bZIP (canal amarillo) y la CP de PepMV (canal magenta) expresada a partir del clon agroinfectivo PepMV-TagRFP. En los paneles de la izquierda se muestran células sanas y los paneles de la derecha corresponden a células infectadas con imágenes de las proteínas individuales y la superposición de ambos. Los núcleos se señalan con asteriscos, mientras que los orgánulos de replicación viral están indicados con cabezas de flecha. La barra de tamaño representa 20 μm .

4.4.5. RNAseq del mutante *slbzip42*

Se empleó la técnica de RNA-seq para estudiar el papel del *SlbZIP42* en plantas sanas y ante la infección por PepMV. El experimento incluyó plantas de cv. MicroTom de genotipo WT y *slbzip42*, tanto inoculadas con PepMV, como mock-inoculadas. El muestreo se realizó a 7 dpi y se muestrearon todos los pisos foliares de las plantas de forma individual, evitando las hojas inoculadas. A 7 dpi no se observaron diferencias significativas en la acumulación de PepMV entre los dos genotipos estudiados (Figura 4.23 A).

El número total de genes expresados ($\text{FPKM} \geq 1$) fue comparable entre los cuatro tratamientos, con más de 18.000 en cada uno de ellos. Mediante un PCA se observó una clara diferenciación entre los cuatro tratamientos, con agrupamiento de las réplicas biológicas (Figura 4.23 B). El componente 1 explica el 25,4% de la varianza total separando los grupos sanos de infectados, mientras que el componente 2 explica el 20,8% de la varianza total diferenciando entre los dos genotipos.

El análisis de los DEGs mediante diagramas de Venn mostró que 223 DEGs inducidos y 48 reprimidos fueron compartidos en las comparaciones WT-I vs WT-M y *slbzip42*-I vs *slbzip42*-M (Figura 4.23 C y D), mostrando una respuesta común a la infección viral entre ambos genotipos. 306 DEGs inducidos y 98 reprimidos fueron específicos de la comparación WT-I vs WT-M (Figura 4.23 C y D), mostrando un importante grupo de genes cuya alteración por PepMV es, posiblemente, dependiente de SlbZIP42. En la comparación *slbzip42*-I vs *slbzip42*-M se

identificaron 146 DEGs inducidos y 173 reprimidos específicamente (Figura 4.23 C y D), señalando una posible respuesta compensatoria o aberrante ante la infección en ausencia de SlbZIP42.

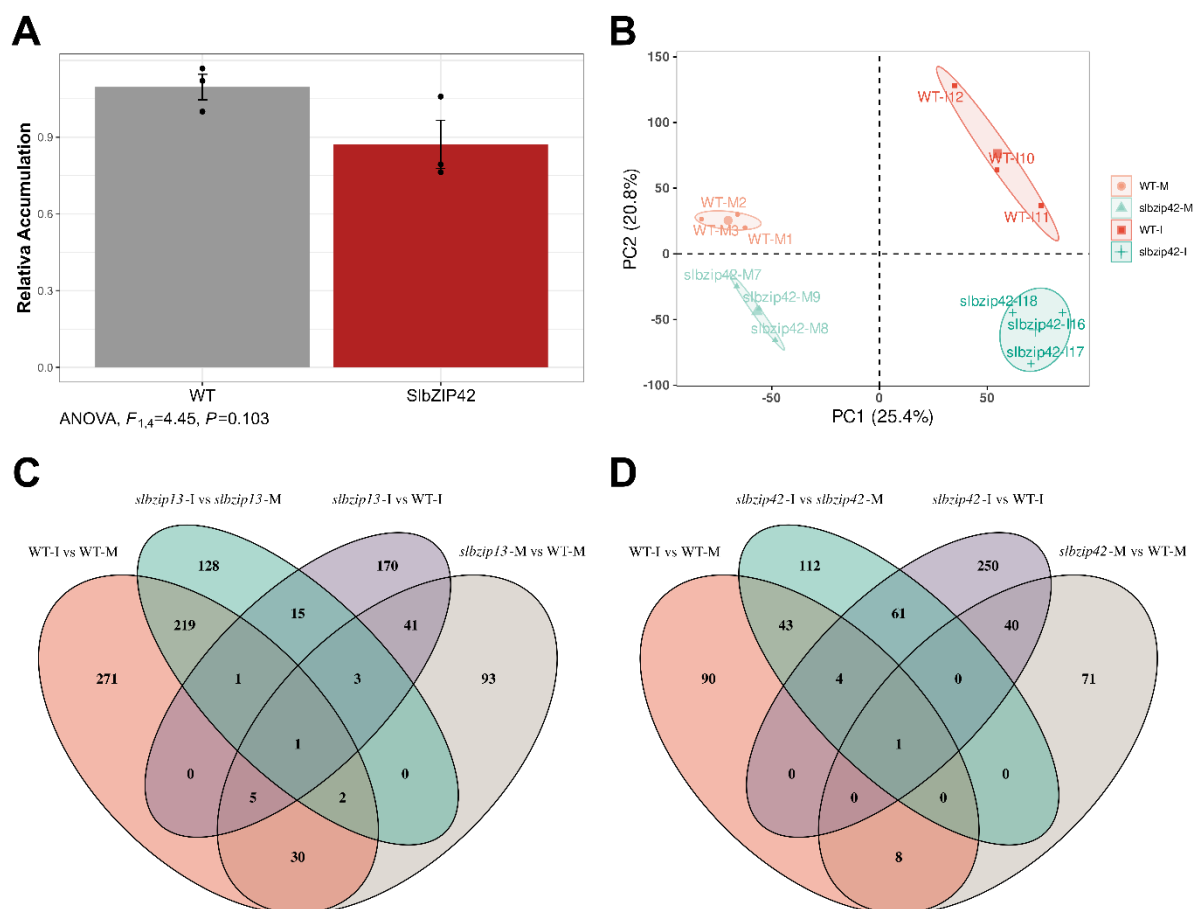
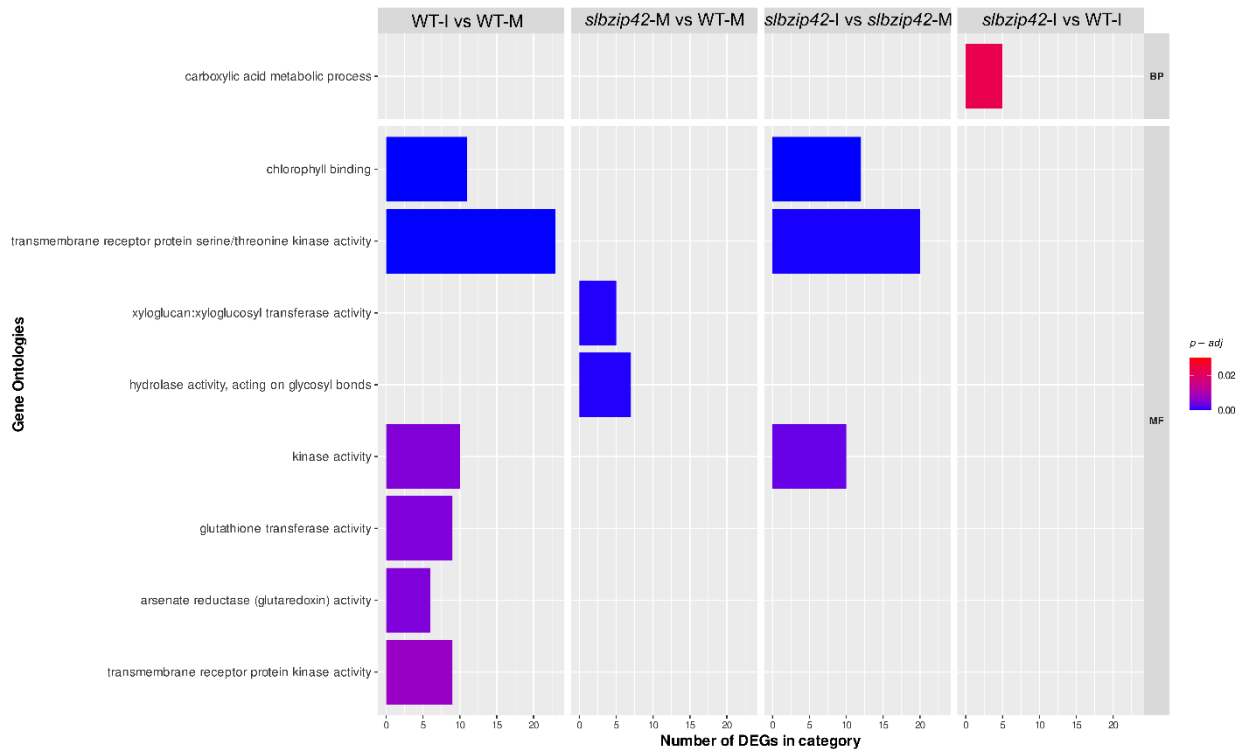


Figura 4.23. RNAseq de plantas de tomate de genotipo *slbzip42*. A. B. Análisis de componentes principales (PCA). Los grupos biológicos ensayados fueron silvestre mock-inoculado (WT-M), *slbzip42* mock-inoculado (slbzip42-M), silvestre infectado con PepMV (WT-I) y *slbzip42* infectado por PepMV (slbzip42-I). C y D. Diagramas de Venn. Se muestran los genes diferencialmente expresados (DEGs) (C). Inducidos. (D). Reprimidos.

Para caracterizar funcionalmente los DEGs, se realizó un análisis de enriquecimiento en términos GO ($p.adj < 0,05$). En la comparación *slbzip42*-M vs WT-M surgieron como específicos los términos *xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity* y *hydrolase activity, acting on glycosyl bonds* (Figura 4.24), mientras que en la comparación *slbzip42*-I vs WT-I surgió el término *carboxylic acid metabolic process* como específico. En la comparación *slbzip42*-I vs *slbzip42*-M no surgió ningún término específico con respecto a la comparación WT-I vs WT-M. Este resultado es notable en base a la observación anterior con 146 DEGs inducidos y 173 reprimidos específicos de la comparación *slbzip42*-I vs *slbzip42*-M (Figura 4.23 C y

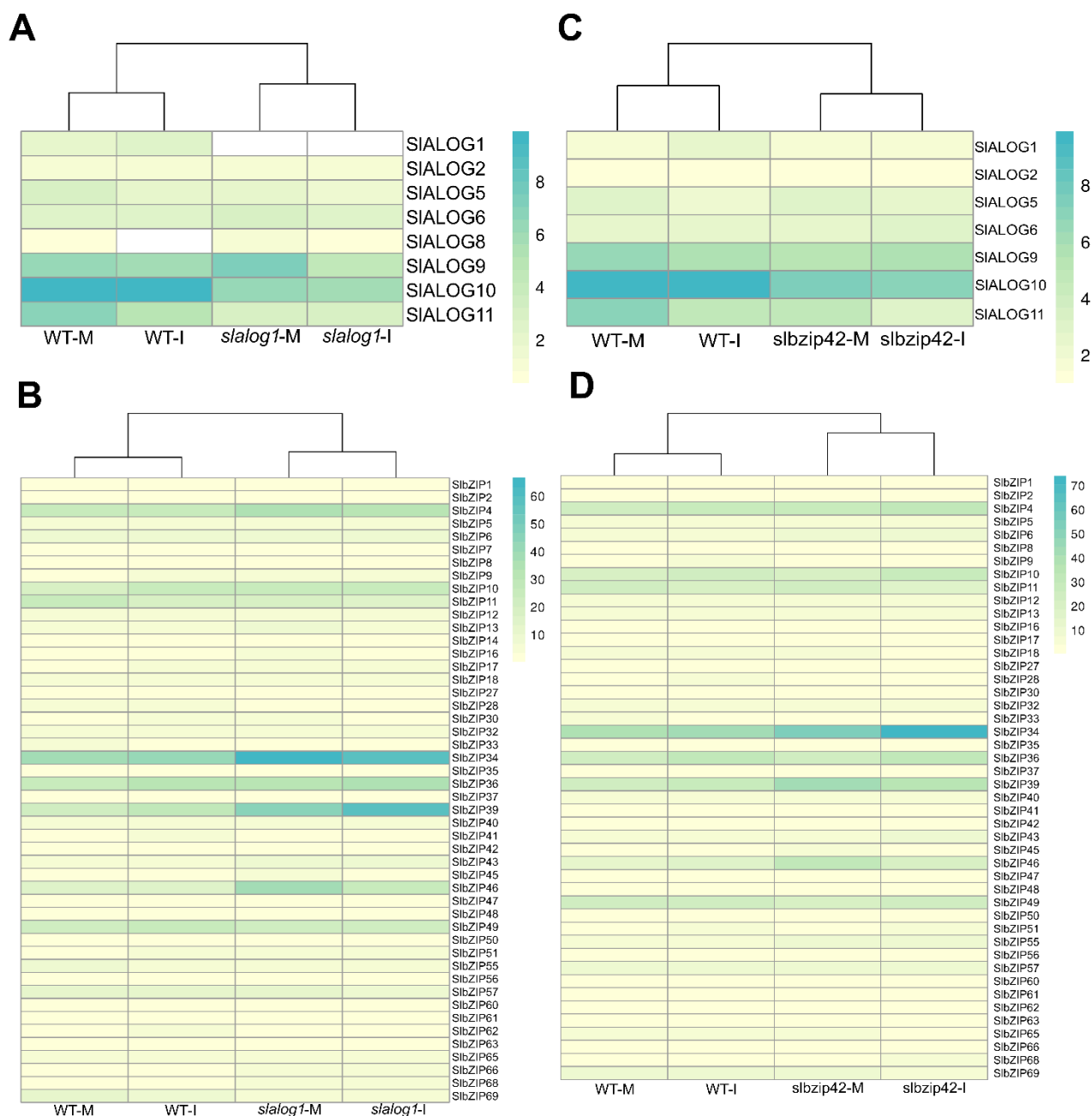
Resultados

D). El análisis KEGG no mostró términos desregulados más allá de un término relacionado con fotosíntesis en las comparaciones WT-I vs WT-M y *slbzip42*-I vs *slbzip42*-M (resultados no mostrados).



4.24. Análisis de enriquecimiento en términos de ontología génica (GO). Se muestran las categorías ontológicas sobrerrepresentadas en cada comparación. El tamaño de cada barra indica el número de DEGs por categoría y el color representa el grado de significancia ($p.adj < 0,05$).

Se estudió el perfil de expresión de la familia ALOG y la familia bZIP en los mutantes *slalog1* y *slbzip42*, observando una desregulación similar en los genes SIALOG10 y 11, ambos reprimidos en ambos genotipos mutantes, y SlbZIP34, 39 y 46, sobrerrepresentados en ambos genotipos mutantes (Figura 4.25).



4.25. Heatmap de la expresión de la familia ALOG y bZIP en los mutante *slalog1* y *slbzip42*. Se muestran los valores de expresión de cada uno de los miembros de la familia ALOG o bZIP de tomate en cada uno de los grupos biológicos ensayados. **A.** Expresión de la familia ALOG en el mutante *slalog1*. **B.** Expresión de la familia bZIP en el mutante *slalog1*. **C.** Expresión de la familia ALOG en el mutante *slbzip42*. **D.** Expresión de la familia bZIP en el mutante *slbzip42*.

Discusión

En esta discusión he incluido un primer apartado con consideraciones esencialmente experimentales y, a continuación, cuatro apartados con interpretaciones de mis resultados en el contexto más amplio de la biología celular de los potexvirus.

5.1. Limitaciones y problemas experimentales

El método de muestreo constituye una fuente potencial de error que debe ser tomada en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. En los estudios de susceptibilidad y RNA-seq se optó por muestrear el conjunto de hojas sistémicas de cada planta, evitando las hojas inoculadas. Con este método de muestreo se persiguió reducir la variabilidad biológica inter- e intraindividual. No obstante, esta estrategia de muestreo podría conllevar una dilución de efectos específicos, ya que ni la infección ni la respuesta del huésped son necesariamente sincrónicas ni homogénea entre individuos, tejidos o células. Asimismo, es probable que distintas hojas se encuentren en estados fisiológicos y/o infecciosos diferentes en el momento del muestreo. A pesar de estas limitaciones, se consideró el muestreo global de la planta una aproximación más representativa y robusta frente al análisis de un único piso foliar o foliolo, que podría amplificar variaciones locales y comprometer la reproducibilidad del experimento y la comparación entre las distintas plantas de un mismo tratamiento. Este método de muestreo ha sido aplicado previamente en distintos estudios de susceptibilidad y análisis transcriptómicos (Alcaide et al., 2022; Méndez-López et al., 2023), lo que respalda su idoneidad para reducir la variabilidad biológica asociada al muestreo en el diseño experimental seguido en esta tesis doctoral.

Los pesos moleculares observados en los *Western blot* para las proteínas TGB1-GFP y SIALOG1-mRFP se desviaron un 13% y 34%, respectivamente, de los valores teóricos calculados (Figura 4.3 B). En contraste, la GFP libre mantuvo su tamaño esperado de ~27 kDa. Este patrón de anomalía selectiva en el desplazamiento es consistente con el fenómeno de movilidad electroforética

aberrante descrito en la bibliografía para proteínas que contienen IDRs (Iakoucheva et al., 2001; Trivedi & Nagarajaram, 2022). La TGB1 de PepMV contiene un IDR predicho de 37 aa (Figura 4.2D), mientras que SILOG1 contiene dos IDRs de mayor tamaño (Figura 4.8). La ausencia de esta anomalía en la migración de la GFP libre, una proteína globular sin IDRs, valida en cierta medida esta interpretación y sugiere la ausencia de artefactos metodológicos. Sin embargo, no puede descartarse la contribución de modificaciones postraduccionales en TGB1 y/o SILOG1 en la discrepancia observada entre el peso teórico y el observado.

Las diferencias observadas en la intensidad relativa de SILOG1 en VROs en los experimentos de colocalización – menos pronunciado en SILOG1-mRFP/PepMV-WT (Figura 4.12 A) en comparación con SILOG1-EYFP/PepMV-TagRFP (Figura 4.11) – pueden atribuirse en gran medida a la distinta cinética de ambos clones virales. Mientras que PepMV-TagRFP establece VROs plenamente estructurados a 3 dpa en todas las células, PepMV-WT progresa de forma más lenta, generando estructuras replicativas emergentes en un número limitado de células al mismo tiempo post infección. Esta discrepancia permitió capturar distintos estados temporales de la infección, proporcionando una ventana comparativa poco habitual en estudios de interacción virus-huésped.

La presencia de IDRs en SILOG1 y SlbZIP42 sugiere que ambas proteínas podrían participar en interacciones proteína–proteína de carácter dinámico, mediadas por contactos débiles y dependientes del contexto molecular. En consecuencia, se consideró oportuno implementar aproximaciones experimentales, poco invasivas y cercanas a condiciones nativas (BiFC y FRET-FLIM), para confirmar y caracterizar estas hipotéticas interacciones débiles en el contexto de la infección por PepMV.

En la técnica BiFC la reconstitución de la YFP es irreversible; una vez reconstituida la proteína fluorescente, permanece estable incluso si la interacción entre las dos proteínas problema se rompe. Por ello, aunque esta técnica proporciona información espacial sobre la interacción *in vivo*, no permite discriminar (i)

interacciones dinámicas y transitorias, (ii) variaciones en la afinidad entre compartimentos celulares, ni (iii) especificidad temporal de la interacción (Kudla & Bock, 2016; Romei & Boxer, 2019). Para superar las limitaciones de BiFC, se empleó la técnica FRET-FLIM en los compartimentos subcelulares donde se detectó señal BiFC positiva.

El diseño experimental original contemplaba registrar el tiempo de vida medio de fluorescencia (τ) en núcleo, VROs y citoplasma. Sin embargo, en el momento de la escritura de este manuscrito, debido a limitaciones técnicas, el análisis se limitó a mediciones en núcleo. En el citoplasma, la baja concentración de ambas proteínas, y la distribución heterogénea de estas, impidió la obtención de medidas FRET-FLIM reproducibles. En los VROs, se presentaron diferentes desafíos: (i) La técnica requiere del uso de las proteínas fluorescentes GFP y mRFP, impidiendo el uso de los clones agroinfectivos marcados con proteínas fluorescentes y (ii) el uso del clon PepMV-WT resultó en VROs a 3 dpa de tamaño y densidad insuficientes para acumular un número representativo de medidas.

El τ de la GFP en células sanas fue significativamente superior a los registrados en los controles para SLALOG1 (Figura 4.11 C). Este aumento en el τ del donador sugiere cambios en el microentorno del fluoróforo más que un efecto de FRET, dado que en condiciones de FRET se espera una disminución del τ del donador. Alteraciones en parámetros como el pH, la polaridad o la viscosidad del entorno pueden afectar al tiempo de vida de la fluorescencia (Datta et al., 2020). Considerando que todas las medidas fueron tomadas en el núcleo, la explicación más plausible es un cambio en la viscosidad del entorno de TGB1-GFP posiblemente causado por la sobreexpresión de SLALOG1-mRFP, ya que la sobreexpresión de TGB1-GFP, GFP y mRFP no tuvieron un efecto significativo en el τ del donador, tal y como se puede observar en los diferentes controles (Figura 4.11 C).

El estudio de la interacción SlbZIP42-TGB1 mediante FRET-FLIM no mostró una reducción del τ del donador. Sin embargo, unos resultados negativos en esta técnica no descartan la interacción, ya que puede deberse a que ambos fluoróforos

se encuentran en una orientación desfavorable o fuera del radio de Förster pese a que ambas proteínas problema están interaccionando (Spatola Rossi et al., 2022). Tampoco se puede descartar una competencia entre la proteína nativa y la de fusión.

5.2. La TGB1 de PepMV

El análisis de la proteína TGB1 de PepMV desarrollado en esta tesis doctoral aporta evidencias experimentales sobre su localización subcelular, permitiendo establecer paralelismos y divergencias con las TGB1s caracterizadas de otros virus, como PVX. El análisis *in silico*, junto con los resultados de los ensayos de microscopía y fraccionamiento subcelular, respaldan el modelo funcional establecido para la familia *Alphaflexiviridae* (Úbeda et al., 2025), en el que la TGB1 se comporta como una proteína multifuncional, dinámicamente distribuida entre núcleo, citoplasma y plasmodesmos durante las diferentes fases del ciclo infectivo.

El análisis filogenético situó a la TGB1 de PepMV dentro de un clado bien definido, en coherencia con lo descrito para la replicasa o la CP (Úbeda et al., 2025). La presencia del dominio helicasa de la superfamilia 1 (SF1) manteniendo conservados los motivos Walker A y los aminoácidos clave en el motivo Walker B, además de la presencia de múltiples regiones potenciales de unión a ácidos nucleicos y la conservación estructural del dominio helicasa, sugieren que la TGB1 de PepMV mantiene la capacidad de unirse y remodelar ácidos nucleicos, lo que respalda un papel activo en procesos de movimiento y/o replicación, tal y como se ha demostrado para otros potexvirus (Kalinina et al., 2002; Leshchiner et al., 2006). La presencia de un IDR complementa este modelo, introduciendo un elemento flexible que podría facilitar interacciones transitorias con diferentes proteínas del huésped y del complejo viral (Mishra et al., 2020). Además, la abundancia relativa de residuos susceptibles de fosforilación (Figura 4.2 C), junto con la presencia de múltiples motivos consenso de quinasas celulares, sugiere que la TGB1 de PepMV podría estar sujeta a una intensa regulación postraducciona mediada por quinasas del huésped.

Este mecanismo de regulación ha sido documentado previamente para otras proteínas virales de movimiento como la TGB1 de PVX (Módena et al., 2008).

Los resultados obtenidos revelan una distribución dual núcleo-citoplásmica de la TGB1 de PepMV, sugiriendo funciones en ambos compartimentos. La localización nuclear de proteínas de movimiento ha sido documentada para otros virus, con los que se ha sugerido su implicación en el movimiento sistémico, la modulación de la expresión génica, mecanismos de defensa y secuestro de factores del huésped o del ciclo celular (Z. Li et al., 2018; Solovyev et al., 2012; Solovyev & Savenkov, 2014), aunque no se había confirmado de forma experimental para PepMV. La localización nuclear de la TGB1 ha sido demostrada para los potexvirus PVX (Samuels et al., 2007) y AltMV (Nam et al., 2013). Para barley stripe mosaic virus (BSMV), un hordeivirus, también se ha demostrado su localización nuclear y concretamente la presencia de una señal de localización nucleolar (NoLS). BSMV requiere la localización nucleolar para el movimiento célula-célula debido a su interacción con la proteína fibrilarina (Z. Li et al., 2018). Resultados similares han sido obtenidos para la TGB1 de AltMV (Nam et al., 2013), a diferencia de lo descrito en esta tesis, donde no se ha predicho ninguna NoLS en la TGB1 de PepMV, y se ha observado una exclusión del nucleolo tanto en células sanas como infectadas, sugiriendo diferencias funcionales con las TGB1s de BSMV y AltMV.

La localización y funciones citoplasmáticas de las TGBs1 están mejor descritas. Para PVX, se ha descrito que la expresión de la TGB1 en células no infectadas desencadena la formación de inclusiones con forma de varilla (Samuels et al., 2007), o inclusiones similares a *X-bodies* (Tilsner et al., 2012), asociadas con una remodelación del sistema de endomembranas y el citoesqueleto. Esto no ha sido observado para la TGB1 de PepMV, que tras su sobreexpresión en ausencia de la infección no indujo cambios ultraestructurales detectables a 3-4 dpa. Esto sugiere que PepMV difiere de PVX en requerir otros factores virales para iniciar la reestructuración celular y formar el VRO, aunque no se pueden descartar cambios ultraestructurales más tarde de 4 dpa. Dentro de los VROs, la TGB1 presentó una

distribución en forma de agregados discretos de morfología relativamente irregular y tamaño variable (Figura 4.4 A, C). Estas estructuras granulares dentro de los VROs podrían representar los gránulos de TGB1 descritos para PVX, a partir de los cuales se formarían los distintos VRCs, junto al resto de factores virales y diferentes factores del huésped (Linnik et al., 2013; Tilsner et al., 2013).

La acumulación de TGB1 en PDs se observó tanto en células sanas como infectadas, señalando que la TGB1 de PepMV no necesita de otros factores virales para acumularse en estas estructuras de comunicación. Sin embargo, la localización en PD fue mucho más marcada durante la infección, tal y como se ha descrito para otros potexvirus (Chou et al., 2013; Tilsner et al., 2013), lo que es coherente con descripciones previas donde se concluye que el direccionamiento de la TGB1 a estas estructuras de comunicación intercelular está favorecido por el resto de proteínas del TGB (Howard et al., 2004).

Estos resultados son coherentes con los descritos para PVX (Tilsner et al 2012). En este sentido, la TGB1 de PepMV parece seguir, en términos generales, los patrones de localización subcelular descritos para el género *Potexvirus*. No obstante, se ha descrito que la TGB1 de PVX es capaz de inducir de forma autónoma la reorganización de los filamentos de actina, el sistema de endomembranas y la consecuente formación de los *X-bodies*, los VROs de PVX (Tilsner et al., 2012), mientras que en el caso de la TGB1 de PepMV no se han observado alteraciones de la ultraestructura celular en ausencia de infección. Además, la TGB1 de PepMV presenta una exclusión nucleolar a diferencia de la TGB1 de AltMV cuya localización en este orgánulo nuclear es esencial para el movimiento sistémico. Estas diferencias sugieren posibles divergencias funcionales entre la TGB1 de PepMV y otras TGB1 de *Potexvirus*.

5.3. SIALOG1 durante la infección por PepMV

De acuerdo con el análisis filogenético, los ortólogos más probables de *SILOG1* en *A. thaliana* son LSH5 y LSH6 (Figura 4.7 A). Sin embargo, a diferencia de otros miembros de la familia que han sido funcionalmente caracterizados -LSH3 y 4 en el desarrollo y diferenciación de órganos florales (Rieu et al., 2024) o LSH8 como regulador positivo de la señalización mediada por ácido abscísico (Zou et al., 2021)- LSH5 y 6 permanecen sin caracterizar funcionalmente (Rieu et al., 2024). Esta laguna en el conocimiento dentro del papel descrito para la familia ALOG como reguladores del desarrollo subraya la relevancia y novedad de identificar por primera vez a un miembro de esta familia como interactor de una proteína viral con un papel proviral durante la infección, siendo potencialmente requerido para optimizar alguna fase del ciclo infectivo.

El elevado número de DEGs específicos del mutante *slalog1* (Figura 4.15 C y D), junto con el bajo número de categorías funcionales enriquecidas (Figura 4.16), sugiere que *SILOG1* podría actuar como un *master-regulator*, afectando de manera amplia pero poco focalizada la red transcripcional. Esto explicaría la ausencia de un fenotipo mutante observable en plantas *slalog1* gracias a la reprogramación compensatoria y/o aberrante ante la ausencia de *SILOG1*, prueba de la robustez de la red reguladora, como se ha descrito en otros casos (Balderas-Hernández et al., 2013).

Según los resultados del RNA-seq *SILOG1* regula procesos basales de transporte de dipéptidos a través de membranas, la actividad transcripcional asociada a la ARN-polimerasa II y la biosíntesis de carotenoides y diterpenoides (Figura 4.16). El transporte de dipéptidos es fundamental para la transducción de señales de defensa, ya que péptidos señal derivados de patógenos o del daño celular que estos provocan pueden actuar como elicitores de inmunidad (Yamaguchi & Huffaker, 2011; Zelman & Berkowitz, 2023). Los carotenoides son precursores de fitohormonas como el ABA y las estrigolactonas, así como de diferentes moléculas antioxidantes (Sun et al., 2022). Por su parte, los diterpenoides constituyen un grupo de metabolitos perteneciente a la familia de los terpenoides, extremadamente

diversificados en plantas con múltiples funcionales biológicas clave, entre ellas sirven de precursores para la síntesis de giberelinas (Zi et al., 2014). La desregulación de estas categorías funcionales y rutas metabólicas en el mutante *slalog1* sugiere que la ausencia de SIALOG1 provoca un desbalance hormonal y compromete mecanismos de señalización y de defensa que mitigarían el estrés celular inducido por la infección. Sin embargo, este desbalance parece ser corregido mediante rutas compensatorias, ya que el mutante *slalog1* no presenta diferencias fenotípicas apreciables con las plantas WT.

Ante la infección por PepMV, el mutante *slalog1* parece tener una respuesta no canónica a la infección al no observarse la sobrerrepresentación de términos GO asociados a la infección. Esto parece estar compensado a través del metabolismo del glutatión y la señalización hormonal, principalmente mediada por etileno, sugiriendo un mecanismo de defensa no canónico basado en glutatión y etileno ante la ausencia de SIALOG1. El etileno es una fitohormona clave en respuestas de defensa, senescencia y estrés abiótico (Iqbal et al., 2017), y su síntesis está frecuentemente alterada durante infecciones virales como parte tanto de la respuesta de defensa del huésped como de estrategias de manipulación celular por parte del virus (Zhao et al., 2017). Pese a esto, las plantas mutantes *slalog1* infectadas no presentan un fenotipo de senescencia exacerbado, por lo que han de existir mecanismos adicionales que atenúen esta respuesta desregulada.

Pese a que SIALOG1 y TGB1 coexisten en el núcleo en células sanas, su interacción es estrictamente dependiente del contexto de infección. Este patrón sugiere que la interacción es posible gracias a cambios conformacionales desencadenados durante la infección y causados bien por modificaciones post-traduccionales, cambios en el ambiente bioquímico, la presencia de una tercera proteína en el complejo de interacción, o la liberación del bloqueo de la interacción por una hipotética tercera proteína.

El cambio en la localización subcelular de SIALOG1 desde el núcleo al VRO durante la infección es un fenotipo único entre los miembros de la familia ALOG

evaluados. El mapeo de dominios de interacción reveló que ambas IDRs de SIALOG1 son críticas y actúan cooperativamente para mediar esta relocalización. Notablemente, la sustitución de cualquiera de estas IDRs por sus homólogos de otro miembro de la familia ALOG bloquea completamente el fenotipo de localización en VROs, demostrando que estas regiones no son funcionalmente redundantes en la familia ALOG. Esta especificidad podría reflejar una red de interacción única de SIALOG1 dentro de la familia ALOG, a diferencia de la función redundante en la supresión de la floración descrita anteriormente (Huang et al., 2022). La acumulación de SIALOG1 en los VROs sugiere un papel funcional y/o estructural de esta proteína de tomate durante el ciclo infectivo de PepMV. Sin embargo, a partir de los datos disponibles no es posible determinar si el patrón observado refleja un fenómeno de relocalización proteica propiamente dicho, ni discriminar si dicha relocalización es un proceso activo mediado directamente por TGB1 o una consecuencia de otros cambios celulares producidos durante la infección por PepMV.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis doctoral sugieren un modelo en el que la TGB1 actúa como un factor selectivo que reconoce específicamente características únicas de SIALOG1, posiblemente determinantes estructurales en sus IDRs, a través de un mecanismo desencadenado exclusivamente durante la infección. La especificidad de la interacción SIALOG1-TGB1 es prueba de que la TGB1 no actúa como un factor promiscuo de secuestro de factores de transcripción, sino que posee una alta capacidad discriminatoria. Este mecanismo señala a SIALOG1 como un regulador específicamente modulado por PepMV durante el ciclo infectivo, con una función que no tienen otros miembros ALOG en la patogénesis de PepMV.

La relocalización selectiva de SIALOG1 a los VROs en estadios avanzados de la infección es particularmente significativa, dado que los VROs son microambientes altamente especializados en la replicación viral y coordinación de la infección (Úbeda et al., 2025). Este reclutamiento selectivo, junto con la reducción en la acumulación viral observada en plantas *slalog1*, sugiere que SIALOG1 desempeña funciones en la optimización del ciclo infectivo de PepMV a través de múltiples mecanismos

potenciales no excluyentes como (i) el secuestro de un factor de transcripción implicado en la activación de mecanismos de defensa antiviral, (ii) como proteína cebo para el secuestro de diferentes factores celulares, y retenerlos en el VRO, (iii) redireccionando a SIALOG1 hacia funciones de transcripción/traducción en el contexto del VRO, (iv) redireccionando a SIALOG1 hacia funciones estructurales en el VRO, (v) mediante el secuestro de la posible capacidad de exportación nuclear de SIALOG1. El papel estructural de SIALOG1 en los VROs estaría mediado por sus IDRs, capaces de promover la separación de fases líquido-líquido y la formación de condensados biomoleculares tal y como se ha descrito en la bibliografía para estas proteínas (Huang et al., 2022), y como parece sugerir las localizaciones de las diferentes proteínas quiméricas SIALOG1-SIALOG5 en su localización en células sanas. Estos IDRs permitirían la incorporación de SIALOG1 en subcondensados del VRO, donde actuaría como componente estructural estabilizando el microambiente requerido por el virus, ya que los IDRs facilitan interacciones multivalentes y débiles que organizan espacialmente componentes virales y celulares, como se ha descrito en proteínas de virus ARN(+) de animales y plantas (Lin & Nagy, 2024). De forma complementaria, la capacidad de interacciones multivalentes de los IDRs permitiría el secuestro de diferentes factores del huésped a microambientes del VRO.

El análisis transcriptómico del mutante *slalog1* revela una reprogramación masiva de la respuesta a PepMV con alteraciones significativas en la defensa antioxidante y la señalización hormonal. El secuestro de SIALOG1 en los VROs podría constituir una estrategia viral de modulación fina de la respuesta defensiva del huésped, reduciendo su cinética y/o amplitud, a la vez que se evita la activación de rutas compensatorias ante la ausencia total de SIALOG1. En este modelo, SIALOG1 no sería un simple factor proviral secuestrado por el virus, sino un regulador de tolerancia cuya función ha sido cooptada por PepMV para modular la respuesta del hospedador de manera que permita una replicación viral sostenible sin colapso celular y la subsecuente infección sistémica – un equilibrio que asegura la propagación viral, asegurando la supervivencia del hospedador a largo plazo.

Estos hallazgos abren nuevas vías sobre cómo los virus pueden cooptar selectivamente factores de transcripción para facilitar su ciclo infectivo incluso fuera del núcleo, representando un mecanismo adicional de patogénesis viral, reforzando el interés en caracterizar este factor de transcripción putativo como potencial regulador modulado por la TGB1 durante la infección viral.

5.4. SlbZIP42 durante la infección por PepMV

La familia bZIP representa una de las familias de factores de transcripción más extensamente estudiadas en plantas, con roles documentados en desarrollo, respuesta al estrés abiótico, señalización hormonal y defensa contra patógenos (Dröge-Laser et al., 2018). SlbZIP42 pertenece al grupo I de la familia bZIP, un subgrupo funcionalmente inexplorado especialmente en el contexto de la interacción virus-huésped. Sin embargo, estudios previos han relacionado a miembros de este subgrupo con funciones en el desarrollo vascular, señalización osmótica y activación de genes de defensa bajo condiciones de estrés oxidativo (Dröge-Laser et al., 2018), rutas frecuentemente moduladas durante la infección viral, sugiriendo un papel potencial de este subgrupo de bZIPs en la compatibilidad huésped-patógeno. En el contexto de respuesta a patógenos, únicamente VIP1 (AtbZIP51) ha sido caracterizado por su papel en la respuesta a *Agrobacterium tumefaciens*, *Botrytis cinerea* y la señalización de estrés oxidativo y osmótico (Lapham et al., 2018; Tzfira et al., 2001). No obstante, su papel concreto, en especial su participación en la translocación a núcleo de proteínas bacterianas, es controvertido en la literatura científica (Lapham et al., 2018). Sin embargo, la participación de miembros del grupo I de bZIP en interacciones planta-virus permanece inexplorada. La identificación de SlbZIP42 como interactor específico de la proteína viral de movimiento TGB1 de PepMV representaría la primera descripción de interacción directa entre un miembro del grupo I de bZIP y una proteína viral. Este hallazgo posiciona al grupo I de bZIP como un nuevo objetivo potencial de manipulación viral y sugiere que estos factores

de transcripción podrían desempeñar funciones especializadas en la compatibilidad huésped-patógeno que no han sido exploradas.

Al igual que en el caso de SIALOG1, el mutante *slbzip42* presenta un alto número de DEGs específicos que no se reflejan en términos GO o categorías KEGG enriquecidas, sugiriendo un papel como *master-regulator*, afectando de manera amplia pero poco focalizada al perfil transcripcional. De forma basal SlbZIP42 estaría implicado en la remodelación de la pared celular (Figura 4.24). Ante la infección, el mutante *slbzip42* presentaría una respuesta equivalente al WT, con una desregulación adicional en el metabolismo de compuestos con grupos carboxilo. Gran parte de los genes desregulados en esta categoría corresponden a *aromatic L-amino acid decarboxylases*, enzimas que catalizan la descarboxilación de aminoácidos aromáticos en aminas bioactivas, las cuales son el sustrato principal de numerosos metabolitos de defensa como los alcaloides (Facchini et al., 2000). Estos genes estarían inducidos en el mutante *slbzip42* en respuesta a la infección por PepMV, pese a que, según los resultados obtenidos, el resto de mecanismos de defensa estarían activos como en el WT. Este estado de defensas sobreactivadas frente a la infección podría explicar la reducción en la acumulación de PepMV en el mutante *slbzip42*.

El análisis de la localización subcelular de SlbZIP42 revela un cambio significativo en su distribución ante la infección por PepMV, algo consistente con la familia bZIP que requiere el *shuttling* núcleo-citoplasma para su regulación funcional (Dröge-Laser et al., 2018). Este comportamiento ha sido registrado para múltiples miembros del clado I, sugiriendo que TGB1 podría interactuar con múltiples miembros del grupo I, por lo que estos probablemente compartan determinantes estructurales que posibiliten el reconocimiento e interacción. Esta observación contrasta marcadamente con la especificidad observada en la interacción SIALOG1-TGB1. Significativamente, SlbZIP11 – uno de los miembros filogenéticamente más divergente dentro del grupo I – no mostró relocalización aparente a VROs, sugiriendo que SlbZIP11 ha divergido funcionalmente del resto del grupo I desempeñando roles

distintos en el contexto de la infección. La identificación de SlbZIP11 como excepción dentro del grupo I proporciona una oportunidad para el mapeo de los determinantes moleculares responsables de la relocalización a VROs.

A diferencia de la interacción SIALOG1-TGB1, estrictamente dependiente de la infección, la interacción SlbZIP42-TGB1 ocurre tras la sobreexpresión de ambas proteínas de manera independiente de la infección. Esta interacción que podría ocurrir tempranamente podría entenderse como una modulación preventiva para facilitar el subsecuente secuestro de la maquinaria celular, o bien como una forma de marcar y llevar a SlbZIP42 a los primeros VRCs una vez que la replicación viral se comienza a establecer, posiblemente con un papel estructural, como se ha descrito para otras proteínas citosólicas del huésped capaces de formar cambio de fase líquido-líquido (Lin & Nagy, 2024). Cabe señalar que la ausencia de localización en VROs de SlbZIP11 muestra que los resultados obtenidos no se deben a una interacción promiscua o una concentración aleatoria en VROs de las proteínas bZIP estudiadas.

Estos resultados, pese a que preliminares, podrían sugerir que el clado I de SlbZIP actuaría bien como un regulador de tolerancia en base a su papel en la síntesis de metabolitos secundarios y reestructuración de la pared celular, o bien como andamiaje en la formación de los VRCs, gracias a la presencia de extensos IDRs en sus extremos.

El análisis de expresión de familias génicas específicas reveló que SlbZIP34, y en menor medida SlbZIP39 y SlbZIP46, están desregulados en el mutante *slbzip42* y el mutante *slalog1*. De manera similar, SIALOG9, SIALOG10 y SIALOG11 muestran represión leve en ambos mutantes. Esta observación podría indicar que SIALOG1 y SlbZIP42 podrían formar un complejo heteromérico que actúa como co-represor de ciertos miembros de la familia ALOG y co-activador de algunos bZIPs. Sin embargo, existen otras explicaciones, como una regulación compensatoria.

5.5. Un modelo para el secuestro de dos factores de transcripción por la TGB1

En conjunto, los datos obtenidos, junto con la información previa disponible, permiten proponer un modelo en el que la TGB1 de PepMV actúa como una proteína multifuncional con una elevada plasticidad subcelular y, posiblemente, conformacional, lo que podría reflejar roles temporales y funcionales diferenciados a lo largo del ciclo infectivo. En estadios iniciales de la infección, la proteína presentaría una distribución núcleo-citoplásmica, estableciendo un estado basal de interacción con el huésped. Con el progreso de la infección y las interacciones con otros componentes virales, se favorecería su relocalización hacia compartimentos asociados a la replicación y el movimiento viral (Figura 4.4). Este comportamiento sugiere la integración de señales regulatorias, potencialmente de naturaleza postraduccionales, que modularían su función en respuesta al contexto celular e infectivo.

De acuerdo con las ideas expresadas más arriba, se podría proponer el siguiente modelo de interacción. En las primeras fases de la infección, la TGB1 presenta una localización núcleo-citoplásmica sin alteraciones en la ultraestructura celular. La TGB1 presente en el núcleo coexiste con SIALOG1 sin interaccionar mientras que la TGB1 de núcleo y citoplasma se une constitutivamente a SlbZIP42 y otros SlbZIP.

En las fases tempranas de la infección, la TGB1 comienza a localizarse en los VRCs nacientes, junto con SlbZIP42 y otros SlbZIP, mientras que, en el núcleo, cambios conformacionales permitirían la interacción TGB1-SIALOG1. La interacción/secuestro de SIALOG1 y miembros de SlbZIP por parte de la TGB1 serviría para modular la respuesta defensiva del huésped en favor del virus.

En las fases avanzadas de la infección, los VROs son estructuras maduras derivadas de membranas y con subestructuras (VRCs) condensadas en su interior. La TGB1 concentraría complejos formados a partir de SIALOG1 en los VRCs junto al resto

de proteínas virales para optimizar procesos de replicación/transcripción, mientras que los miembros del clado I de la familia bZIP estarían formando el andamiaje primario de estos orgánulos virales.

Conclusiones

Esta tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la proteína TGB1 de PepMV y su implicación en procesos nucleares durante la infección viral. A continuación, se presentan las principales conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos.

A. En referencia al estudio de la TGB1 de PepMV:

1. La TGB1 de PepMV mantiene las generalidades descritas para el género *Potexvirus* con una localización núcleo-citoplásmica en células sanas y relocalización a plasmodesmos y VROs durante la infección.
2. La TGB1 de PepMV presenta exclusión nucleolar.
3. La TGB1 de PepMV, por sí misma, no altera la ultraestructura celular.

B. Referentes a la caracterización de SIALOG1:

4. SIALOG1 es un interactor nuclear de la TGB1 de PepMV y pertenece a la familia de factores de transcripción ALOG.
5. El mutante *slalog1* no tiene un fenotipo observable distinto del de las plantas WT.
6. PepMV tiene una acumulación viral significativamente inferior en plantas de tomate *slalog1* respecto a plantas WT.
7. SIALOG1 tiene una localización nuclear en células sanas y se acumula en los VROs durante la infección.
8. SIALOG1 presenta dos regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en sus extremos.
9. La interacción SIALOG1-TGB1 es específica y dependiente de la infección.
10. La interacción SIALOG1-TGB1 requiere de determinantes estructurales presentes en los IDRs de SIALOG1.

11. SIALOG1 es el único miembro estudiado de la familia ALOG de tomate que se acumula en los VROs de PepMV.
12. Los IDRs de los miembros de la familia ALOG no son funcionalmente redundantes.
13. El análisis transcriptómico realizado sugiere que SIALOG1 participa en el transporte de dipéptidos a través de membrana, la actividad transcripcional asociada a la ARN polimerasa II y la síntesis de carotenoides y diterpenoides.

C. Referentes a la caracterización de SlbZIP42:

14. SlbZIP42 es un interactor de la TGB1 de PepMV y pertenece a la familia de factores de transcripción bZIP.
15. El mutante *slbzip42* de tomate no tiene un fenotipo observable distintos del de las plantas WT.
16. PepMV presenta una acumulación viral significativamente inferior en plantas *slbzip42* de tomate respecto de plantas WT.
17. SlbZIP42 tiene una localización núcleo-citoplásmica en células sanas y se concentra en los VROs de PepMV durante la infección.
18. SlbZIP42 presenta dos IDRs en sus extremos.
19. La interacción SlbZIP42-TGB1 ocurre con independencia de la infección.
20. SlbZIP30, 40, 41, 42 y 43 se acumulan en VROs.
21. SlbZIP11, a diferencia del resto de miembros de la familia estudiados, no se concentra en VROs.
22. El análisis transcriptómico realizado sugiere que SlbZIP42 tenga un papel relevante en la remodelación de la pared celular y el metabolismo de aminoácidos aromáticos.

En conjunto, esta tesis doctoral identifica similitudes y diferencias entre la TGB1 de PepMV y la de virus relacionadas, y aporta evidencias sobre su implicación en la modulación e procesos celulares del huésped, poniendo de manifiesto el papel de la TGB1 en el núcleo.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral sientan la base para futuros estudios dirigidos a analizar funcionalmente las interacciones descritas, así como evaluar su relevancia y grado de conservación en otros patosistemas.

Conclusions

This doctoral thesis has focused on the study of the PepMV TGB1 protein and its involvement in nuclear processes during viral infection. The main conclusions that can be drawn from results obtained are presented below.

A. Regarding the study of PepMV TGB1:

1. PepMV TGB1 shows features consistent with those described for members of the genus *Potexvirus*, including a nucleo-cytoplasmic localization and relocalization to plasmodesmata and viral replication organelles (VROs) during infection.
2. PepMV TGB1 shows nucleolar exclusion.
3. PepMV TGB1 alone does not induce detectable alterations in cellular ultrastructure.

B. Regarding the characterization of SIALOG1:

4. SIALOG1 is a nuclear interactor of PepMV TGB1 and belongs to the ALOG family of transcription factors.
5. The *slalog1* mutant does not display an observable phenotype distinct from that of WT plants.
6. PepMV accumulates at significantly levels in *slalog1* tomato plants than in WT plants.
7. SIALOG1 localizes in nucleus of healthy cells and accumulates in VROs during infection.
8. SIALOG1 contains two intrinsically disordered regions (IDRs) at its N- and C-termini.
9. The interaction between SIALOG1 and TGB1 is specific and dependent on viral infection.
10. The SIALOG1–TGB1 interaction requires structural determinants present in the IDRs of SIALOG1.

11. Among the analyzed tomato ALOG family members, SlALOG1 is the only protein that accumulates in PepMV VROs.
12. The IDRs of ALOG family members are not functionally redundant.
13. Transcriptomic analyses suggest that SlALOG1 participates in dipeptide transport across membranes, RNA polymerase II-associated transcriptional activity, and carotenoid and diterpenoid biosynthesis.

C. Regarding the characterization of SlbZIP42:

14. SlbZIP42 is an interactor of PepMV TGB1 and belongs to the bZIP family of transcription factors.
15. The *slbzip42* tomato mutant does not display an observable phenotype distinct from that of WT plants.
16. PepMV accumulates at significantly lower levels in *slbzip42* tomato plants than in WT plants.
17. SlbZIP42 shows nucleo-cytoplasmic localization in healthy cells and accumulates in PepMV VROs.
18. SlbZIP42 contains two IDRs at its N- and C-termini.
19. The SlbZIP42–TGB1 interaction occurs independently of infection.
20. SlbZIP30, SlbZIP40, SlbZIP41, SlbZIP42, and SlbZIP43 accumulate in PepMV VROs.
21. In contrast to the other analyzed bZIP members, SlbZIP11, does not accumulate in VROs.
22. Transcriptomic analyses suggest that SlbZIP42 plays a relevant role in cell wall remodeling and aromatic amino acid metabolism.

Overall, this doctoral thesis identifies similarities and differences between the PepMV TGB1 protein and that of related viruses, and provides evidence for its involvement in the modulation of host cellular processes, highlighting the role of TGB1 in the nucleus.

The results presented in this thesis lay the groundwork for future studies aimed at the functional analysis of the interactions described, as well as at assessing their relevance and degree of conservation in other pathosystems.

Bibliografía

- AbouHaidar, M. G., Xu, H., & Hefferon, K. L. (1998). Potexvirus isolation and RNA extraction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 81, 131–143. <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:131/TABLES/1>
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., & Fauquet, C. M. (2004). Virology Division News: The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149(5), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
- Adhikari, B., Verchot, J., Brandizzi, F., & Ko, D. K. (2025a). ER stress and viral defense: Advances and future perspectives on plant unfolded protein response in pathogenesis. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 301, Number 4). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108354>
- Adhikari, B., Verchot, J., Brandizzi, F., & Ko, D. K. (2025b). ER stress and viral defense: Advances and future perspectives on plant unfolded protein response in pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 301(4), 108354. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2025.108354>
- Agirrezabala, X., Mé Ndez-Ló Pez, E., Lasso, G., Sá Nchez-Pina, A., Aranda, M., & Valle, M. (2015). *The near-atomic cryoEM structure of a flexible filamentous plant virus shows homology of its coat protein with nucleoproteins of animal viruses*. <https://doi.org/10.7554/eLife.11795.001>
- Agüero, J., Gómez-Aix, C., Sempere, R. N., García-Villalba, J., García-Núñez, J., Hernando, Y., & Aranda, M. A. (2018). Stable and broad spectrum cross-protection against pepino mosaic virus attained by mixed infection. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01810>
- Aguilar, J. M., Hernández-Gallardo, M. D., Cenis, J. L., Lacasa, A., & Aranda, M. A. (2002). Complete sequence of the Pepino mosaic virus RNA genome. *Archives of Virology*, 147(10), 2009–2015. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0848-9>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2017). Antiviral roles of abscisic acid in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 270346. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.01760/XML>
- Alcaide, C., & Aranda, M. A. (2021). Determinants of Persistent Patterns of Pepino Mosaic Virus Mixed Infections. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.694492>
- Alcaide, C., & Aranda, M. A. (2023). Fluorescently labelled pepino mosaic virus strains share infected tissues and colocalize in cellular aggregates reminiscent

- of viral replication complexes. *Virus Research*, 329(February), 199100.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199100>
- Alcaide, C., Donaire, L., & Aranda, M. A. (2022). Transcriptome analyses unveiled differential regulation of AGO and DCL genes by pepino mosaic virus strains. *Molecular Plant Pathology*, 23(11), 1592–1607.
<https://doi.org/10.1111/mpp.13249>
- Alcaide, C., Méndez-López, E., Úbeda, J. R., Gómez, P., & Aranda, M. A. (2023). Characterization of Two Aggressive PepMV Isolates Useful in Breeding Programs. *Viruses*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/v15112230>
- Alves, M. S., Dadalto, S. P., Gonçalves, A. B., De Souza, G. B., Barros, V. A., & Fietto, L. G. (2013). Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14, Number 4, pp. 7815–7828). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms14047815>
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), 13079–13084. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.22.13079>,
- Anastassiadou, M., Arena, M., Auteri, D., Brancato, A., Bura, L., Carrasco Cabrera, L., Chaideftou, E., Chiusolo, A., Crivellente, F., De Lentdecker, C., Egsmose, M., Fait, G., Greco, L., Ippolito, A., Istace, F., Jarrah, S., Kardassi, D., Leuschner, R., Lostia, A., ... Villamar-Bouza, L. (2021). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substances Pepino Mosaic Virus,EU strain, mild isolate Abp1 and Pepino Mosaic Virus,CH2 strain, mild isolate Abp2. *EFSA Journal*, 19(1), e06388. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6388>
- Andrews, S. (2010). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Soil. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Aparicio-Puerta, E., Lebrón, R., Rueda, A., Gómez-Martín, C., Giannoukakos, S., Jaspez, D., Medina, J. M., Zubkovic, A., Jurak, I., Fromm, B., Marchal, J. A., Oliver, J., & Hackenberg, M. (2019). sRNAbench and sRNAtoolbox 2019: intuitive fast small RNA profiling and differential expression. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W530–W535. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ415>
- Atabekov, J., Dobrov, E., Karpova, O., & Rodionova, N. (2007). Potato virus X: Structure, disassembly and reconstitution. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 667–675. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2007.00420.X>;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., Novikov, V. K., & Arkhipenko, M. V. (2001). Translational activation of encapsidated potato virus

- X RNA by coat protein phosphorylation. *Virology*, 286(2), 466–474.
<https://doi.org/10.1006/viro.2001.1013>
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., & Poljakov, V. Y. (2000). The movement protein-triggered in situ conversion of potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology*, 271(2), 259–263. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0319>
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), 938–942. <https://doi.org/10.1038/nature06069>
- Balderas-Hernández, V. E., Alvarado-Rodríguez, M., & Fraire-Velázquez, S. (2013). Conserved versatile master regulators in signalling pathways in response to stress in plants. *AoB PLANTS*, 5. <https://doi.org/10.1093/AOBPLA/PLT033>
- Bamunusinghe, D., Hemenway, C. L., Nelson, R. S., Sanderfoot, A. A., Ye, C. M., Silva, M. A. T., Payton, M., & Verchot-Lubicz, J. (2009). Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology*, 393(2), 272–285.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.002>
- Baulcombe, D. C. (1996). RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 32(1–2), 79–88.
<https://doi.org/10.1007/BF00039378/METRICS>
- Baulcombe, D. C., Lloyd, J., Manoussopoulos, I. N., Roberts, I. M., & Harrison, B. D. (1993). Signal for potyvirus-dependent aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and the effect of its transfer to potato virus X. *Journal of General Virology*, 74(7), 1245–1253. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-7-1245>,
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant Journal*, 44(3), 471–482. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02539.x>
- Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Andersen, M. T., & Forster, R. L. S. (1991). Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology*, 183(2), 695–702. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90998-Q](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90998-Q)
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., & Baulcombe, D. C. (1999). The Rx Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. *The Plant Cell*, 11(5), 781–791. <https://doi.org/10.1105/TPC.11.5.781>
- Blystad, D. R., van der Vlugt, R., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba, M., Bese, G., Hristova, D., Pospieszny, H., Mehle, N., Ravnkar, M., Tomassoli, L.,

- Varveri, C., & Nielsen, S. L. (2015). Host range and symptomatology of Pepino mosaic virus strains occurring in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, *143*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0664-1>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170>
- Candresse, T., Marais, A., Faure, C., Dubrana, M. P., Gombert, J., & Bendahmane, A. (2010). Multiple Coat Protein Mutations Abolish Recognition of Pepino mosaic potexvirus (PepMV) by the Potato Rx Resistance Gene in Transgenic Tomatoes. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, *23*(4), 376–383. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Cañizares, M. C., Nicholson, L., & Lomonossoff, G. P. (2005). Use of viral vectors for vaccine production in plants. *Immunology and Cell Biology*, *83*(3), 263–270. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1711.2005.01339.X>
- Carmichael, D. J., Rey, M. E. C., Naidoo, S., Cook, G., & Heerden, S. W. van. (2011). First Report of Pepino mosaic virus Infecting Tomato in South Africa. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0036>, *95*(6), 767–767. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-11-0036>
- Chen, I. H., Chen, H. T., Huang, Y. P., Huang, H. C., Shenkwen, L. L., Hsu, Y. H., & Tsai, C. H. (2018). A thioredoxin NbTRXh2 from *Nicotiana benthamiana* negatively regulates the movement of Bamboo mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, *19*(2), 405–417. <https://doi.org/10.1111/mpp.12532>
- Chen, S. C., Desprez, A., & Olsthoorn, R. C. L. (2010). Structural homology between bamboo mosaic virus and its satellite RNAs in the 5' untranslated region. *Journal of General Virology*, *91*(3), 782–787. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.015941-0/CITE/REFWORKS>
- Cho, I. S., Chung, B. N., Yoon, J.-Y., Hammond, J., & Lim, H.-S. (2022). First report of pepino mosaic virus infecting tomato in South Korea. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-22-0380-pdn>
- Chou, Y. L., Hung, Y. J., Tseng, Y. H., Hsu, H. T., Yang, J. Y., Wung, C. H., Lin, N. S., Meng, M., Hsu, Y. H., & Chang, B. Y. (2013). The Stable Association of Virion with the Triple-gene-block Protein 3-based Complex of Bamboo mosaic virus. *PLoS Pathogens*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003405>
- Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906. (2015). *EFSA Journal*, *13*(1). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.3977>

- Córdoba, M. C., Martínez-Priego, L., & Jordá, C. (2004). New Natural Hosts of Pepino mosaic virus in Spain. *Plant Disease*, 88(8), 906–906. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.8.906d>
- Córdoba-Sellés, M. D. C., García-Rández, A., Alfaro-Fernández, A., & Jordá-Gutiérrez, C. (2007). Seed transmission of Pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91(10), 1250–1254. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-10-1250>
- Cotillon, A. C., Girard, M., & Ducouret, S. (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of a French isolate of Pepino mosaic virus (PepMV). *Archives of Virology*, 147(11), 2231–2238. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0873-8>
- Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A., Skala, M. C., & Biomed, " J. (2020). Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *Journal of Biomedical Optics*, 25(7), 071203. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>
- Davino, S., Accotto, G. P., Masenga, V., Torta, L., & Davino, M. (2009). Basil (*Ocimum basilicum*), a new host of Pepino mosaic virus. In *Plant Pathology* (Vol. 58, Number 2, p. 407). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02026.x>
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., & Canard, B. (2011). Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nature Reviews Microbiology* 2011 10:1, 10(1), 51–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2675>
- DiMaio, F., Chen, C. C., Yu, X., Frenz, B., Hsu, Y. H., Lin, N. S., & Egelman, E. H. (2015). The molecular basis for flexibility in the flexible filamentous plant viruses. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(8), 642–644. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3054>
- DPV-PepMV. (2005). *Details of DPV Pepino mosaic virus and References*. <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=411>
- Dröge-Laser, W., Snoek, B. L., Snel, B., & Weiste, C. (2018). The Arabidopsis bZIP transcription factor family — an update. *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.001>
- Duff-Farrier, C. R. A., Candresse, T., Bailey, A. M., Boonham, N., & Foster, G. D. (2016). Evidence for different, host-dependent functioning of Rx against both wild-type and recombinant Pepino mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, 17(1), 120–126. <https://doi.org/10.1111/mpp.12256>
- Efthimiou, K. E., Gatsios, A. P., Aretakis, K. C., Papayiannis, L. C., & Katis, N. I. (2010). First report of Pepino mosaic virus infecting greenhouse cherry

- tomatoes in Greece. *Plant Disease*, 95(1), 78. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-10-0643>
- Ellenberger, T. E., Brandl, C. J., Struhl, K., & Harrison, S. C. (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α Helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71(7), 1223–1237. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80070-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80070-4),
- EPPO. (2024). *Potexvirus pepini (PEPMV0)[World distribution]/ EPPO Global Database*. <https://gd.eppo.int/taxon/PEPMV0/distribution>
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., & Tari, L. W. (2000). Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: Evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 54(2), 121–138. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00050-9)
- Fakhro, A., von Barga, S., Bandte, M., Büttner, C., Franken, P., & Schwarz, D. (2011). Susceptibility of different plant species and tomato cultivars to two isolates of Pepino mosaic virus. *European Journal of Plant Pathology*, 129(4), 579–590. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9722-x>
- Finkelstein, R. R., & Lynch, T. J. (2000). *Absciscic Acid Inhibition of Radicle Emergence But Not Seedling Growth Is Suppressed by Sugars 1*. www.plantphysiol.org
- Food Safety Authority, E. (2017a). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Mild Pepino mosaic virus isolate VC1. *EFSA Journal*, 15(1), e04651. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4651>
- Food Safety Authority, E. (2017b). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Mild Pepino mosaic virus isolate VX1. *EFSA Journal*, 15(1), e04650. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4650>
- Forray, A., Tüske, M., & Gáborjányi, R. (2004). First report on the occurrence of Pepino mosaic virus in Hungary. *Növényvédelem*, 40(9), 471–473. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043186484>
- French, C. J., Bouthillier, M., Bernardy, M., Ferguson, G., Sabourin, M., Johnson, R. C., Masters, C., Godkin, S., & Mumford, R. (2001). First Report of Pepino mosaic virus in Canada and the United States. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1121B>, 85(10), 1121. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1121B>
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., & Angell, S. (2003). TIP, A Novel Host Factor Linking Callose Degradation with the Cell-to-Cell

- Movement of Potato virus X. In *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI* (Vol. 16, Number 2).
- Fujimoto, Y., Keima, T., Hashimoto, M., Hagiwara-Komoda, Y., Hosoe, N., Nishida, S., Nijo, T., Oshima, K., Verchot, J., Namba, S., & Yamaji, Y. (2022). Short 5' Untranslated Region Enables Optimal Translation of Plant Virus Tricistronic RNA via Leaky Scanning. *Journal of Virology*, 96(7).
<https://doi.org/10.1128/JVI.02144-21/ASSET/A0ED5058-865E-4A11-A97F-F9CBDA36AD03/ASSETS/IMAGES/LARGE/JVI.02144-21-F008.JPG>
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., & Takahashi, Y. (2000). REPRESSION OF SHOOT GROWTH, a bZIP Transcriptional Activator, Regulates Cell Elongation by Controlling the Level of Gibberellins. In *The Plant Cell* (Vol. 12). www.plantcell.org
- García-Alcalde, F., Okonechnikov, K., Carbonell, J., Cruz, L. M., Götz, S., Tarazona, S., Dopazo, J., Meyer, T. F., & Conesa, A. (2012). Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. *Bioinformatics*, 28(20), 2678–2679.
<https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS503>
- Gayral, M., Arias Gaguancela, O., Vasquez, E., Herath, V., Flores, F. J., Dickman, M. B., & Verchot, J. (2020). Multiple ER-to-nucleus stress signaling pathways are activated during Plantago asiatica mosaic virus and Turnip mosaic virus infection in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 103(3), 1233–1245.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.14798>
- Gómez, P., Sempere, R. N., Elena, S. F., & Aranda, M. A. (2009). Mixed Infections of Pepino Mosaic Virus Strains Modulate the Evolutionary Dynamics of this Emergent Virus. *Journal of Virology*, 83(23), 12378–12387.
https://doi.org/10.1128/JVI.01486-09/SUPPL_FILE/SUPPLDATA.ZIP
- Gómez-Aix, Alcaide, C., Agüero, J., Faize, M., Juárez, M., Díaz-Marrero, C. J., Botella-Guillén, M., Espino, A. I., Aranda, M. A., & Gómez, P. (2019). Genetic diversity and population structure of Pepino mosaic virus in tomato crops of Spain and Morocco. *Annals of Applied Biology*, 174(3), 284–292.
<https://doi.org/10.1111/aab.12491>
- González, L. E., Peiró, R., Rubio, L., & Galipienso, L. (2021). Persistent southern tomato virus (Stv) interacts with cucumber mosaic and/or pepino mosaic virus in mixed-infections modifying plant symptoms, viral titer and small rna accumulation. *Microorganisms*, 9(4), 689.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040689/S1>
- Grinzato, A., Kandiah, E., Lico, C., Betti, C., Baschieri, S., & Zanotti, G. (2020). Atomic structure of potato virus X, the prototype of the Alphaflexiviridae family. *Nature*

Chemical Biology, 16(5), 564–569. <https://doi.org/10.1038/S41589-020-0502-4>;SUBJMETA=326,449,535,596,631;KWRD=PLANT+SCIENCES,STRUCTURAL+BIOLOGY,VIROLOGY

- Guedes Corrêa, L. G., Riaño-Pachón, D. M., Guerra Schrago, C., Vicentini dos Santos, R., Mueller-Roeber, B., & Vincentz, M. (2008). The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: Adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS ONE*, 3(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002944>
- Hanssen, I. M., Gutiérrez-Aguirre, I., Paeleman, A., Goen, K., Wittemans, L., Lievens, B., Vanachter, A. C. R. C., Ravnika, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Cross-protection or enhanced symptom display in greenhouse tomato co-infected with different Pepino mosaic virus isolates. *Plant Pathology*, 59(1), 13–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02190.x>
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Vandewoestijne, E., Van Bergen, L., Bragard, C., Lievens, B., Vanachter, A. C. R. C., & Thomma, B. P. H. J. (2009). Pepino mosaic virus isolates and differential symptomatology in tomato. *Plant Pathology*, 58(3), 450–460. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.02018.x>
- Hanssen, I. M., Paeleman, A., Wittemans, L., Goen, K., Lievens, B., Bragard, C., Vanachter, A. C. R. C., & Thomma, B. P. H. J. (2008). Genetic characterization of Pepino mosaic virus isolates from Belgian greenhouse tomatoes reveals genetic recombination. *European Journal of Plant Pathology*, 121(2), 131–146. <https://doi.org/10.1007/S10658-007-9255-0>
- Hanssen, I. M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Pepino mosaic virus: A successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 179–189. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00600.x>
- Hanssen, I. M., van Esse, H. P., Ballester, A. R., Hogewoning, S. W., Parra, N. O., Paeleman, A., Lievens, B., Bovy, A. G., & Thomma, B. P. H. J. (2011). Differential tomato transcriptomic responses induced by pepino mosaic virus isolates with differential aggressiveness. *Plant Physiology*, 156(1), 301–318. <https://doi.org/10.1104/pp.111.173906>
- Hasiów-Jaroszewska, B., & Borodynko, N. (2012). Characterization of the necrosis determinant of the European genotype of pepino mosaic virus by site-specific mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Archives of Virology*, 157(2), 337–341. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1162-1>
- Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Jackowiak, P., Figlerowicz, M., & Pospieszny, H. (2011). Single mutation converts mild pathotype of the Pepino

- mosaic virus into necrotic one. *Virus Research*, 159(1), 57–61.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.008>
- Hasiów-Jaroszewska, B., Paeleman, A., Ortega-Parra, N., Borodynko, N., Minicka, J., Czerwoniec, A., Thomma, B. P. H. J., & Hanssen, I. M. (2013). Ratio of mutated versus wild-type coat protein sequences in Pepino mosaic virus determines the nature and severity of yellowing symptoms on tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 923–933. <https://doi.org/10.1111/mpp.12059>
- Hata, Y., Ohtsuka, J., Hiwatashi, Y., Naramoto, S., & Kyozuka, J. (2024). Cytokinin and ALOG proteins regulate pluripotent stem cell identity in the moss *Physcomitrium patens*. *Sci. Adv*, 10, 6082.
- Haupt, S., Cowan, G. H., Ziegler, A., Roberts, A. G., Oparka, K. J., & Torrance, L. (2005). Two plant-viral movement proteins traffic in the endocytic recycling pathway. *Plant Cell*, 17(1), 164–181. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.027821>
- He, H., Ge, L., Chen, Y., Zhao, S., Li, Z., Zhou, X., & Li, F. (2024). m6A modification of plant virus enables host recognition by NMD factors in plants. *Science China Life Sciences*, 67(1), 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2377-1>
- He, H., Ge, L., Li, Z., Zhou, X., & Li, F. (2023). Pepino mosaic virus antagonizes plant m 6 A modification by promoting the autophagic degradation of the m 6 A writer. *ABIOTECH*. <https://doi.org/10.1007/s42994-023-00097-6>
- He, R., Li, Y., Bernards, M. A., & Wang, A. (2023). Manipulation of the Cellular Membrane-Cytoskeleton Network for RNA Virus Replication and Movement in Plants. *Viruses*, 15(3), 744. <https://doi.org/10.3390/V15030744>
- He, Y., Wu, Q., Cui, C., Tian, Q., Zhang, D., & Zhang, Y. (2023). ChIP-Seq Analysis of SLAREB1 Downstream Regulatory Network during Tomato Ripening. *Foods*, 12(12), 2357. <https://doi.org/10.3390/FOODS12122357/S1>
- Herath, V., Gayral, M., Miller, R. K., & Verchot, J. (2020). BIP and the unfolded protein response are important for potyvirus and potexvirus infection. *Plant Signaling and Behavior*, 15(11).
<https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1807723>,
- Hernando, Y., & Aranda, M. A. (2024). Cross-protection against pepino mosaic virus, more than a decade of efficient disease control. In *Annals of Applied Biology* (Vol. 184, Number 2, pp. 174–182). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/aab.12884>
- Herranz, M. C., Pallas, V., & Aparicio, F. (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: Nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Molecular*

- Plant-Microbe Interactions*, 25(8), 1093–1103. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0079-R>
- Howard, A. R., Heppler, M. L., Ju, H. J., Krishnamurthy, K., Payton, M. E., & Verchot-Lubicz, J. (2004). Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology*, 328(2), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.06.039>
- Howe, G. A., & Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, 59(Volume 59, 2008), 41–66. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092825/CITE/REFWORKS>
- Hsu, H. T., Chou, Y. L., Tseng, Y. H., Lin, Y. H., Lin, T. M., Lin, N. S., Hsu, Y. H., & Chang, B. Y. (2008). Topological properties of the triple gene block protein 2 of Bamboo mosaic virus. *Virology*, 379(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.06.019>
- Huang, C.-Y., Huang, Y.-L., Meng, M., Hsu, Y.-H., & Tsai, C.-H. (2001). Sequences at the 3' Untranslated Region of Bamboo Mosaic Potexvirus RNA Interact with the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *Journal of Virology*, 75(6), 2818–2824. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2818-2824.2001/ASSET/8C583D73-928F-474F-8D28-3E87709DD4E4/ASSETS/GRAPHIC/JV0611873006.JPEG>
- Huang, X., Chen, S., Li, W., Tang, L., Zhang, Y., Yang, N., Zou, Y., Zhai, X., Xiao, N., Liu, W., Li, P., & Xu, C. (2021). ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nature Chemical Biology*, 17(5), 549–557. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00739-0>
- Huang, X., Tang, L., Yu, Y., Dalrymple, J., Lippman, Z. B., & Xu, C. (2018). Control of flowering and inflorescence architecture in tomato by synergistic interactions between ALOG transcription factors. *Journal of Genetics and Genomics*, 45(10), 557–560. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.03.008>
- Huang, X., Xiao, N., Zou, Y., Xie, Y., Tang, L., Zhang, Y., Yu, Y., Li, Y., & Xu, C. (2022). Heterotypic transcriptional condensates formed by prion-like paralogous proteins canalize flowering transition in tomato. *Genome Biology*, 23(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-022-02646-6>
- Huang, Y. W., Sun, C. I., Hu, C. C., Tsai, C. H., Meng, M., Lin, N. S., Dinesh-Kumar, S. P., & Hsu, Y. H. (2023). A viral movement protein co-opts endoplasmic reticulum luminal-binding protein and calreticulin to promote intracellular movement. *Plant Physiology*, 191(2), 904–924. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac547>

- Huang, Y.-L., Hsu, Y.-H., Han, Y.-T., & Meng, M. (2005). mRNA guanylation catalyzed by the S-adenosylmethionine-dependent guanylyltransferase of bamboo mosaic virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 13153–13162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412619200>
- Iakoucheva, L. M., Kimzey, A. L., Masselon, C. D., Smith, R. D., Dunker, A. K., & Ackerman, E. J. (2001). Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 10(7), 1353. <https://doi.org/10.1110/PS.PS.40101>
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., & Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, 8, 235913. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00475/FULL>
- Iyer, L. M., & Aravind, L. (2012). ALOG domains: Provenance of plant homeotic and developmental regulators from the DNA-binding domain of a novel class of DIRS1-type retroposons. *Biology Direct*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-39>
- Izhaki, A., Alvarez, J. P., Cinnamon, Y., Genin, O., Liberman-Aloni, R., & Eyal, Y. (2018). The tomato BLADE ON PETIOLE and TERMINATING FLOWER regulate leaf axil patterning along the proximal-distal axes. *Frontiers in Plant Science*, 9(August), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01126>
- Jaubert, M., Bhattacharjee, S., Mello, A. F. S., Perry, K. L., & Moffett, P. (2011). ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(3), 1556–1564. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178012>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jones, R. A. C., Koenig, R., & Lesemann, D. E. (1980). Pepino mosaic virus, a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*). *Ann. Appl. Biol*, 94, 6–7.
- Jordá, C., Pérez, A. L., Culebras, P. V. M., & Lacasa, A. (2001). First Report of Pepino mosaic virus on Natural Hosts. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1292D>, 85(12), 1292–1292. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1292D>
- Jordá, C., Pérez, A. L., Martínez-Culebras, P., Abad, P., Lacasa, A., & Guerrero, M. M. (2001). First Report of Pepino mosaic virus on Tomato in Spain. *Plant Disease*, 85(12), 1292–1292. <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.12.1292c>

- Ju, H. J., Samuels, T. D., Wang, Y. S., Blancaflor, E., Payton, M., Mitra, R., Krishnamurthy, K., Nelson, R. S., & Verchot-Lubicz, J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. *Plant Physiology*, *138*(4), 1877–1895. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066019>
- Kadaré, G., & Haenni, A.-L. (1997). MINIREVIEW Virus-Encoded RNA Helicases. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 71, Number 4). <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Solovyev, A. G., Schiemann, J., & Morozov, S. Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. *Virology*, *296*(2), 321–329. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1328>
- Kang, S. G., Koo, B. J., Lee, E. T., & Chang, M. U. (2007). Allexivirus transmitted by eriophyid mites in garlic plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *17*(11), 1833–1840. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18092468>
- Kim, K. H., & Hemenway, C. L. (1999). Long-distance RNA-RNA interactions and conserved sequence elements affect potato virus X plus-strand RNA accumulation. *RNA*, *5*(5), 636–645. <https://doi.org/10.1017/S1355838299982006>
- Kim, K.-H., & Hemenway, C. (1997). Mutations That Alter a Conserved Element Upstream of the Potato Virus X Triple Block and Coat Protein Genes Affect Subgenomic RNA Accumulation. In *VIROLOGY* (Vol. 232).
- Kirchler, T., Briesemeister, S., Singer, M., Schütze, K., Keinath, M., Kohlbacher, O., Vicente-Carbajosa, J., Teige, M., Harter, K., & Chaban, C. (2010). The role of phosphorylatable serine residues in the DNA-binding domain of Arabidopsis bZIP transcription factors. *European Journal of Cell Biology*, *89*(2–3), 175–183. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2009.11.023>
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Hadad, L., Bakelman, E., Sela, N., Belausov, E., Lachman, O., Leibman, D., & Dombrovsky, A. (2020). Tomato Brown Rugose Fruit Virus Contributes to Enhanced Pepino Mosaic Virus Titers in Tomato Plants. *Viruses*, *12*(8), 879. <https://doi.org/10.3390/v12080879>
- Komatsu, K., Sasaki, N., Yoshida, T., Suzuki, K., Masujima, Y., Hashimoto, M., Watanabe, S., Tochio, N., Kigawa, T., Yamaji, Y., Oshima, K., Namba, S., Nelson, R. S., & Arie, T. (2021). Identification of a Proline-Kinked Amphipathic α -Helix Downstream from the Methyltransferase Domain of a Potexvirus Replicase and Its Role in Virus Replication and Perinuclear Complex Formation. *Journal of Virology*, *95*(20). <https://doi.org/10.1128/jvi.01906-20>

- Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Morris, T. J. (1993). Evolution and Taxonomy of Positive-Strand RNA Viruses: Implications of Comparative Analysis of Amino Acid Sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(5), 375–430. <https://doi.org/10.3109/10409239309078440>
- Koonin, E. V., Kuhn, J. H., Dolja, V. V., & Krupovic, M. (2024). Megataxonomy and global ecology of the virosphere. *The ISME Journal*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/ISMEJO/WRAD042>
- Kudla, J., & Bock, R. (2016). Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *The Plant Cell*, 28(5), 1002–1008. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00043>
- Kutek. (2009). An increasing the resistance of field tomato to Pepino mosaic virus. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 74(3), 867–877. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222574>
- Lacasa, A., Guerrero, M. M., Hita, I., Martínez, M. A., & Hernández, M. D. (2001). *La diseminación del virus del mosaico del pepino dulce (Pepino Mosaic Virus) en las labores de entutorado y desbrotado de las plantas de tomate*.
- Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J. U., & Forner, J. (2013). GreenGate - A Novel, Versatile, and Efficient Cloning System for Plant Transgenesis. *PLOS ONE*, 8(12), e83043. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083043>
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10(3). <https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-3-R25>
- Lapham, R., Lee, L. Y., Tsugama, D., Lee, S., Mengiste, T., & Gelvin, S. B. (2018). VIP1 and its homologs are not required for agrobacterium-mediated transformation, but play a role in botrytis and salt stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 749. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00749/FULL>
- Lara, P., Oñate-Sánchez, L., Abraham, Z., Ferrándiz, C., Díaz, I., Carbonero, P., & Vicente-Carbajosa, J. (2003). Synergistic activation of seed storage protein gene expression in Arabidopsis by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(23), 21003–21011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210538200>
- Lasemann, D., Dalchow, J., Winter, S., & Pfeilstetter, E. (2000). Occurrence of Pepino mosaic virus in European tomato crops: identification, etiology and epidemiology. *Mitteilungen Aus Der Biologischen Bundesanstalt*, 376, 323.

- Lazareva, E. A., Lezzhov, A. A., Chergintsev, D. A., Golyshev, S. A., Dolja, V. V., Morozov, S. Y., Heinlein, M., & Solovyev, A. G. (2021). Reticulon-like properties of a plant virus-encoded movement protein. *New Phytologist*, 229(2), 1052–1066. <https://doi.org/10.1111/nph.16905>
- Le, D. H. T., Méndez-López, E., Wang, C., Commandeur, U., Aranda, M. A., & Steinmetz, N. F. (2019). Biodistribution of Filamentous Plant Virus Nanoparticles: Pepino Mosaic Virus versus Potato Virus X. *Biomacromolecules*, 20(1), 469–477. https://doi.org/10.1021/ACS.BIOMAC.8B01365/SUPPL_FILE/BM8B01365_SI_001.PDF
- Lee, M., Dong, X., Song, H., Yang, J. Y., Kim, S., & Hur, Y. (2020). Molecular characterization of Arabidopsis thaliana LSH1 and LSH2 genes. *Genes and Genomics*, 42(10), 1151–1162. <https://doi.org/10.1007/s13258-020-00985-x>
- Lee, S. C., Wu, C. H., & Wang, C. W. (2010). Traffic of a viral movement protein complex to the highly curved tubules of the cortical endoplasmic reticulum. *Traffic*, 11(7), 912–930. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01064.x>
- Lee, T., Orvosova, M., Batzenschlager, M., Bueno Batista, M., Bailey, P. C., Mohd-Radzman, N. A., Gurzadyan, A., Stuer, N., Mysore, K. S., Wen, J., Ott, T., Oldroyd, G. E. D., & Schiessl, K. (2024). Light-sensitive short hypocotyl genes confer symbiotic nodule identity in the legume Medicago truncatula. *Current Biology*, 34(4), 825-840.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2024.01.018/ASSET/387D3CE6-A8C8-4FEE-A3B1-9BF24F7A48AC/MAIN.ASSETS/GR7.JPG>
- Lei, Y., Su, S., He, L., Hu, X., & Luo, D. (2019). A member of the ALOG gene family has a novel role in regulating nodulation in Lotus japonicus. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61(4), 463–477. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12711/SUPPINFO>
- Leibman, D., Ortega-Parra, N., Wolf, D., Shterkman, M., Hanssen, I., & Gal-On, A. (2021). A transgenic RNAi approach for developing tomato plants immune to Pepino mosaic virus. *Plant Pathology*, 70(4), 1003–1012. <https://doi.org/10.1111/ppa.13346>
- Leshchiner, A. D., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., & Kalinina, N. O. (2006). A minimal region in the NTPase/helicase domain of the TGBp1 plant virus movement protein is responsible for ATPase activity and cooperative RNA binding. *Journal of General Virology*, 87(10), 3087–3095. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81971-0>

- Lezzhov, A. A., Gushchin, V. A., Lazareva, E. A., Vishnichenko, V. K., Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2015). Translation of the shallot virus X TGB3 gene depends on non-AUG initiation and leaky scanning. *Journal of General Virology*, *96*(10), 3159–3164. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000248>
- Li, D., Fu, F., Zhang, H., & Song, F. (2015). Genome-wide systematic characterization of the bZIP transcriptional factor family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC Genomics*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1990-6>
- Li, F., Zhang, C., Li, Y., Wu, G., Hou, X., Zhou, X., & Wang, A. (2018). Beclin1 restricts RNA virus infection in plants through suppression and degradation of the viral polymerase. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03658-2>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324>
- Li, Q., Xiong, L., Gao, J., & Zhang, H. Y. (2019). Molecular mechanisms of the protein-protein interaction-regulated binding specificity of basic-region leucine zipper transcription factors. *Journal of Molecular Modeling*, *25*(8). <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4138-9>
- Li, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z., Miller, S. A., & Ling, K. S. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virology Journal*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12985-014-0237-5/TABLES/2>
- Li, Y. I., Chen, Y. J., Hsu, Y. H., & Meng, M. (2001). Characterization of the AdoMet-dependent guanylyltransferase activity that is associated with the N terminus of bamboo mosaic virus replicase. *Journal of Virology*, *75*(2), 782–788. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.2.782-788.2001>
- Li, Y.-I., Shih, T.-W., Hsu, Y.-H., Han, Y.-T., Huang, Y.-L., & Meng, M. (2001). The Helicase-Like Domain of Plant Potexvirus Replicase Participates in Formation of RNA 5' Cap Structure by Exhibiting RNA 5'-Triphosphatase Activity. *Journal of Virology*, *75*(24), 12114–12120. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12114-12120.2001>
- Li, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Jin, X., Zhang, K., Wang, X., Han, C., Yu, J., & Li, D. (2018). Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *Molecular Plant Pathology*, *19*(5), 1222–1237. <https://doi.org/10.1111/MPP.12612>

- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., & Yu, D. (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep21451>
- Lim, H. S., Vaira, A. M., Domier, L. L., Lee, S. C., Kim, H. G., & Hammond, J. (2010). Efficiency of VIGS and gene expression in a novel bipartite potexvirus vector delivery system as a function of strength of TGB1 silencing suppression. *Virology*, 402(1), 149–163. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.022>
- Lim, H. S., Vaira, A. M., Reinsel, M. D., Bae, H., Bailey, B. A., Dornier, L. L., & Hammond, J. (2010). Pathogenicity of Alternanthera mosaic virus is affected by determinants in RNA-dependent RNA polymerase and by reduced efficacy of silencing suppression in a movement-competent TGB1. *Journal of General Virology*, 91(1), 277–287. <https://doi.org/10.1099/vir.0.014977-0>
- Lin, H.-Y., Yu, C.-Y., Hsu, Y.-H., & Meng, M. (2012). Functional analysis of the conserved histidine residue of Bamboo mosaic virus capping enzyme in the activity for the formation of the covalent enzyme-m7GMP intermediate. *FEBS Letters*, 586(16), 2326–2331. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.024>
- Lin, K. Y., & Lin, N. S. (2017). Interfering satellite RNAs of Bamboo mosaic virus. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 256774. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00787/BIBTEX>
- Lin, M. K., Chang, B. Y., Liao, J. T., Lin, N. S., & Hsu, Y. H. (2004). Arg-16 and Arg-21 in the N-terminal region of the triple-gene-block protein 1 of Bamboo mosaic virus are essential for virus movement. *Journal of General Virology*, 85(1), 251–259. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19442-0>
- Lin, W., & Nagy, P. D. (2024). Co-opted cytosolic proteins form condensate substructures within membranous replication organelles of a positive-strand RNA virus. *New Phytologist*, 243(5), 1917–1935. <https://doi.org/10.1111/NPH.19691;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Ling, K. S. (2007). Molecular characterization of two Pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes*, 34(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0003-x>
- Ling, K. S. (2010). Effectiveness of chemo- and thermotherapeutic treatments on Pepino mosaic virus in tomato Seed. *Plant Disease*, 94(3), 325–328. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0325>
- Ling, K. S., & Scott, J. W. (2007). Sources of resistance to Pepino mosaic virus in tomato accessions. *Plant Disease*, 91(6), 749–753. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0749>

- Ling, K.-S., & Zhang, W. (2011). First Report of Pepino mosaic virus Infecting Tomato in Mexico. *Plant Disease*, 95(8), 1035–1035. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-11-0334>
- Linnik, O., Liesche, J., Tilsner, J., & Oparka, K. J. (2013). Unraveling the structure of viral replication complexes at super-resolution. *Frontiers in Plant Science*, 4(JAN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00006>
- Liou, D. Y., Hsu, Y. H., Wung, C. H., Wang, W. H., Lin, N. S., & Chang, B. Y. (2000). Functional analyses and identification of two arginine residues essential to the ATP-utilizing activity of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *Virology*, 277(2), 336–344. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0610>
- Liu, J., Ma, T., Liang, J., Yang, B., Chen, S., Li, X., Wu, W., Lu, J., & Fu, P. (2025). A core *Plasmopara viticola* effector attenuates the DNA-binding activity of bZIP transcription factor to compromise plant immunity. *Plant Journal*, 122(2). <https://doi.org/10.1111/TPJ.70143>,
- Liu, Z., Fan, Z., Wang, L., Zhang, Siyue, Xu, W., Zhao, S., Fang, S., Liu, M., Kofi, S. M., Zhang, Shuangxi, Kang, N., Ai, H., Li, R., Feng, T., Wei, S., & Zhao, H. (2024). Expression profiling of ALOG family genes during inflorescence development and abiotic stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Genetics*, 15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2024.1381690>
- Loake, G., & Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(5), 466–472. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2007.08.008>
- Loconsole, G., Önelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V., Yokomi, R. K., & Saponari, M. (2012). Identification and characterization of Citrus yellow vein clearing virus, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. *Phytopathology*, 102(12), 1168–1175. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0140-R>,
- Ludman, M., Szalai, G., Janda, T., & Fátýol, K. (2023). Hierarchical contribution of Argonaute proteins to antiviral protection. *Journal of Experimental Botany*, 74(21), 6760–6772. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad327>
- MacAlister, C. A., Park, S. J., Jiang, K., Marcel, F., Bendahmane, A., Izkovich, Y., Eshed, Y., & Lippman, Z. B. (2012). Synchronization of the flowering transition by the tomato terminating flower gene. *Nature Genetics*, 44(12), 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/ng.2465>
- Maghsoudi, R., Nassrollahnejad, S., Aghajanzadeh, S., & Bani Hashemian, S. M. (2023). Transmissibility of citrus yellow vein clearing virus by three dominant

- citrus aphids. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54(1), 101–115.
<https://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.353042.1007016>
- Maroon-Lango, C. J., Guaragna, M. A., Jordan, R. L., Hammond, J., Bandla, M., & Marquardt, S. K. (2005). Two unique US isolates of Pepino mosaic virus from a limited source of pooled tomato tissue are distinct from a third (European-like) US isolate: Brief Report. *Archives of Virology*, 150(6), 1187–1201.
<https://doi.org/10.1007/s00705-005-0495-z>
- Mathioudakis, M. M., Khechmar, S., Owen, C. A., Medina, V., Mansour, K. Ben, Tomaszewska, W., Spanos, T., Sarris, P. F., & Livieratos, I. C. (2018). A thioredoxin domain-containing protein interacts with pepino mosaic virus triple gene block protein 1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12).
<https://doi.org/10.3390/ijms19123747>
- Mathioudakis, M. M., Rodríguez-Moreno, L., Navarro Sempere, R., Aranda, M. A., & Livieratos, I. (2014). Multifaceted capsid proteins: Multiple interactions suggest multiple roles for Pepino mosaic virus capsid protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(12), 1356–1369. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-14-0195-R>
- Mathioudakis, M. M., Veiga, R., Ghita, M., Tsikou, D., Medina, V., Canto, T., Makris, A. M., & Livieratos, I. C. (2012). Pepino mosaic virus capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus Research*, 163(1), 28–39.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.08.007>
- Mathioudakis, M. M., Veiga, R. S. L., Canto, T., Medina, V., Mossialos, D., Makris, A. M., & Livieratos, I. (2013). Pepino mosaic virus triple gene block protein 1 (TGBp1) interacts with and increases tomato catalase 1 activity to enhance virus accumulation. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 589–601.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12034>
- Matzrafi, M., Abu-Nassar, J., Klap, C., Shtarkman, M., Smith, E., & Dombrovsky, A. (2023). Solanum elaeagnifolium and S. rostratum as potential hosts of the tomato brown rugose fruit virus. *PLoS ONE*, 18(3 March).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282441>
- Méndez-López, E., & Aranda, M. A. (2023). A regulatory role for the redox status of the pepino mosaic virus coat protein. *PLoS Pathogens*, 19(10 October).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011732>
- Méndez-López, E., Donaire, L., Gosálvez, B., Díaz-Vivancos, P., Sánchez-Pina, M. A., Tilsner, J., & Aranda, M. A. (2023). Tomato SIGSTU38 interacts with the PepMV coat protein and promotes viral infection. *New Phytologist*, 238(1), 332–348.
<https://doi.org/10.1111/nph.18728>

- Meng, M., & Lee, C. C. (2017). Function and structural organization of the replication protein of Bamboo mosaic virus. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 249482. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00522/BIBTEX>
- Minicka, J., Elena, S. F., Borodynko-Filas, N., Rubiś, B., & Hasiów-Jaroszewska, B. (2017). Strain-dependent mutational effects for Pepino mosaic virus in a natural host. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0920-4>
- Mishra, P. M., Verma, N. C., Rao, C., Uversky, V. N., & Nandi, C. K. (2020). Intrinsically disordered proteins of viruses: Involvement in the mechanism of cell regulation and pathogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 174, 1. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2020.03.001>
- Mitra, R., Krishnamurthy, K., Blancaflor, E., Payton, M., Nelson, R. S., & Verchot-Lubicz, J. (2003). The Potato virus X TGBp2 protein association with the endoplasmic reticulum plays a role in but is not sufficient for viral cell-to-cell movement. *Virology*, 312(1), 35–48. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00180-6)
- Módena, N. A., Zelada, A. M., Conte, F., & Mentaberry, A. (2008). Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Research*, 137(1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.04.007>
- Moore, C., & Meng, B. (2019). Prediction of the molecular boundary and functionality of novel viral AlkB domains using homology modelling and principal component analysis. *Journal of General Virology*, 100(4), 691–703. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001237/CITE/REFWORKS>
- Moreno-Pérez, M. G., Pagán, I., Aragón-Caballero, L., Cáceres, F., Fraile, A., & García-Arenal, F. (2014). Ecological and Genetic Determinants of Pepino Mosaic Virus Emergence. *Journal of Virology*, 88(6), 3359–3368. <https://doi.org/10.1128/jvi.02980-13>
- Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: Modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. In *Journal of General Virology* (Vol. 84, Number 6, pp. 1351–1366). <https://doi.org/10.1099/vir.0.18922-0>
- Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2015). Phylogenetic relationship of some “accessory” helicases of plant positive-stranded RNA viruses: Toward understanding the evolution of triple gene block. *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00508>

- Mumford, R. A., & Metcalfe, E. J. (2001). The partial sequencing of the genomic RNA of a UK isolate of Pepino mosaic virus and the comparison of the coat protein sequence with other isolates from Europe and Peru Brief Report. In *Arch Virol* (Vol. 146). www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., & Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *104*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1263/JBB.104.34>
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., Watanabe, Y., Nakamura, K., Kimura, T., & Ishiguro, S. (2007). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *71*(8), 2095–2100. <https://doi.org/10.1271/BBB.70216>
- Nam, J., Nam, M., Bae, H., Lee, C., Lee, B. C., Hammond, J., & Lim, H. S. (2013). AltMV TGB1 nucleolar localization requires homologous interaction and correlates with cell wall localization associated with cell-to-cell movement. In *Plant Pathology Journal* (Vol. 29, Number 4, pp. 454–459). <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.04.2013.0045>
- Naramoto, S., Hata, Y., & Kyojuka, J. (2020). The origin and evolution of the ALOG proteins, members of a plant-specific transcription factor family, in land plants. *Journal of Plant Research*, *133*(3), 323–329. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01171-6>
- Naramoto, S., Shivas Jones, V. A., Trozzi, N., Sato, M., Toyooka, K., Shimamura, M., Ishida, S., Nishitani, K., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., Dolan, L., & Kyojuka, J. (2019). A conserved regulatory mechanism mediates the convergent evolution of plant shoot lateral organs. *PLoS Biology*, *17*(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000560>
- Navarro, J. A., Sanchez-Navarro, J. A., & Pallas, V. (2019). Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. In *Advances in Virus Research* (Vol. 104, pp. 1–64). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>
- Nijhawan, A., Jain, M., Tyagi, A. K., & Khurana, J. P. (2008). Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiology*, *146*(2), 333–350. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112821>

- Oliveros, J. C., Franch, M., Tabas-Madrid, D., San-León, D., Montoliu, L., Cubas, P., & Pazos, F. (2016). Breaking-Cas—interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W267–W271. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW407>
- Olsthoorn, R. C. L., Owen, C. A., & Livieratos, I. C. (2022). Role of an RNA pseudoknot involving the polyA tail in replication of Pepino mosaic potexvirus and related plant viruses. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15598-5>
- Orellana, S., Yañez, M., Espinoza, A., Verdugo, I., González, E., Ruiz-Lara, S., & Casaretto, J. A. (2010). The transcription factor SlAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant, Cell and Environment*, *33*(12), 2191–2208. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2010.02220.X>,
- Osman, T. A. M., Olsthoorn, R. C. L., & Livieratos, I. C. (2014). Role of the Pepino mosaic virus 3'-untranslated region elements in negative-strand RNA synthesis in vitro. *Virus Research*, *190*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.018>
- Pagán, I., Córdoba-Sellés, M. D. C., Martínez-Priego, L., Fraile, A., Malpica, J. M., Jordá, C., & García-Arenal, F. (2006). Genetic structure of the population of Pepino mosaic virus infecting tomato crops in Spain. *Phytopathology*, *96*(3), 274–279. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0274>
- Papayiannis, L. C., Kokkinos, C. D., & Alfaro-Fernández, A. (2012). Detection, characterization and host range studies of Pepino mosaic virus in Cyprus. *European Journal of Plant Pathology*, *132*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9854-7>
- Park, M. R., Jeong, R. D., & Kim, K. H. (2014). Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Number MAR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00060>
- Park, M. R., Seo, J. K., & Kim, K. H. (2013). Viral and Nonviral Elements in Potexvirus Replication and Movement and in Antiviral Responses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 87, pp. 75–112). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407698-3.00003-X>
- Parra-Rojas, J., Moreno, A. A., Mitina, I., & Orellana, A. (2015). The Dynamic of the Splicing of bZIP60 and the Proteins Encoded by the Spliced and Unspliced mRNAs Reveals Some Unique Features during the Activation of UPR in

- Arabidopsis thaliana. *PLOS ONE*, *10*(4), e0122936.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0122936>
- Pechar, G. S., Donaire, L., Gosalvez, B., García-Almodovar, C., Sánchez-Pina, M. A., Truniger, V., & Aranda, M. A. (2022). Editing melon eIF4E associates with virus resistance and male sterility. *Plant Biotechnology Journal*, *20*(10), 2006–2022.
<https://doi.org/10.1111/PBI.13885>;JOURNAL:JOURNAL:14677652;ISSUE:ISSUE:DOI
- Peng, P., Liu, L., Fang, J., Zhao, J., Yuan, S., & Li, X. (2017). The rice TRIANGULAR HULL1 protein acts as a transcriptional repressor in regulating lateral development of spikelet. *Scientific Reports* *2017 7:1*, *7*(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14146-w>
- Perraki, A., Gronnier, J., Gouguet, P., Boudsocq, M., Deroubaix, A. F., Simon, V., German-Retana, S., Legrand, A., Habenstein, B., Zipfel, C., Bayer, E., Mongrand, S., & Germain, V. (2018). REM1.3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLoS Pathogens*, *14*(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007378>
- Peters, J., Mumford, R., Bese, G., Schenk, M., Van Der Vlugt, R., Glyn, J., Alfaro Fernandez, A., & Lambourne, C. (2011). The effect of Pepino mosaic virus on tomato yield. *Acta Horticulturae*, *914*, 203–206.
<https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2011.914.37>
- Pillai-Nair, N., Kim, K. H., & Hemenway, C. (2003). Cis-acting Regulatory Elements in the Potato Virus X 3' Non-translated Region Differentially Affect Minus-strand and Plus-strand RNA Accumulation. *Journal of Molecular Biology*, *326*(3), 701–720. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01369-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01369-4)
- Pospieszny, H., & Borodynko, N. (2006). New Polish Isolate of Pepino mosaic virus Highly Distinct from European Tomato, Peruvian, and US2 Strains. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1106C>, *90*(8), 1106–1106.
<https://doi.org/10.1094/PD-90-1106C>
- Qin, Y., Lu, S., Wen, Y., Li, S., Gao, S., Liu, Y., Li, X., Yang, J., Wang, Fengli, Wang, Fei, & Lu, C. (2024). Genomic Characterization and Molecular Detection of Rehmannia Allexivirus Virus, a Novel Allexivirus Infecting Rehmannia glutinosa. *Microorganisms*, *12*(5), 844.
<https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS12050844/S1>
- Rieu, P., Beretta, V. M., Caselli, F., Thévenon, E., Lucas, J., Rizk, M., Franchini, E., Caporali, E., Paleni, C., Nanao, M. H., Kater, M. M., Dumas, R., Zubieta, C., Parcy, F., & Gregis, V. (2024). The ALOG domain defines a family of plant-specific

- transcription factors acting during Arabidopsis flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.2310464121>
- Rodríguez-Martínez, J. A., Reinke, A. W., Bhimsaria, D., Keating, A. E., & Ansari, A. Z. (2017). Combinatorial bZIP dimers display complex DNA-binding specificity landscapes. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.19272>
- Roggero, P., Masenga, V., Lenzi, R., Coghe, R., Ena, S., & Winter, S. (2001). First report of pepino Mosaic virus in Tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 50, 798.
- Romei, M. G., & Boxer, S. G. (2019). Split Green Fluorescent Proteins: Scope, Limitations, and Outlook. *Annual Review of Biophysics*, 48(Volume 48, 2019), 19–44. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-051013-022846/CITE/REFWORKS>
- Rouleau, M., Smith, R. J., Bancroft, B., & Mackie, G. A. (1994). Purification, Properties, and Subcellular Localization of Foxtail Mosaic Potexvirus 26-kDa Protein. *Virology*, 204, 254–265.
- Rozanov, M. N., Koonin, E. V., & Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the “Sindbis-like” supergroup of positive-strand RNA viruses. In *Russian Academy of Medical Sciences* (Vol. 73).
- Ruiz-Ramón, F., Rodríguez-Sepúlveda, P., Bretó, P., Donaire, L., Hernando, Y., & Aranda, M. A. (2023). The tomato calcium-permeable channel 4.1 (SlOSCA4.1) is a susceptibility factor for pepino mosaic virus. *Plant Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1111/pbi.14119>
- Ruiz-Ramón, F., Sempere, R. N., Méndez-López, E., Sánchez-Pina, M. A., & Aranda, M. A. (2019). Second generation of pepino mosaic virus vectors: Improved stability in tomato and a wide range of reporter genes. *Plant Methods*, 15(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13007-019-0446-4/FIGURES/8>
- Salem, N. ' M., Jewehan, A., Aranda, M. A., & Fox, A. (2023). *Annual Review of Phytopathology Tomato Brown Rugose Fruit Virus Pandemic*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-021622>
- Salomone, A., & Roggero, P. (2002). Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of Pepino mosaic virus. *Article in Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.4454/jpp.v84i1.1088>
- Samuels, T. D., Ju, H. J., Ye, C. M., Motes, C. M., Blancaflor, E. B., & Verchot-Lubicz, J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the Potato virus X TGB

- proteins. *Virology*, 367(2), 375–389.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.022>
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). A Novel Subgroup of bZIP Proteins Functions as Transcriptional Activators in Hypoosmolarity-Responsive Expression of the ProDH Gene in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 45(3), 309–317.
<https://doi.org/10.1093/PCP/PCH036>
- Schenk, M. F., Hamelink, R., van der Vlugt, R. A. A., Vermunt, A. M. W., Kaarsenmaker, R. C., & Stijger, I. C. C. M. M. (2010). The use of attenuated isolates of Pepino mosaic virus for cross-protection. *European Journal of Plant Pathology*, 127(2), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9590-4>
- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Schwarz, D., Beuch, U., Bandte, M., Fakhro, A., Büttner, C., & Obermeier, C. (2010). Spread and interaction of Pepino mosaic virus (PepMV) and Pythium aphanidermatum in a closed nutrient solution recirculation system: Effects on tomato growth and yield. *Plant Pathology*, 59(3), 443–452.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02229.x>
- Sempere, R. N., Gómez, P., Truniger, V., & Aranda, M. A. (2011). Development of expression vectors based on pepino mosaic virus. *Plant Methods*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-6>
- Sempere, R. N., Gómez-Aix, C., Ruíz-Ramón, F., Gómez, P., Hasiów-Jaroszewska, B., Sánchez-Pina, M. A., & Aranda, M. A. (2016). Pepino mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase POL domain is a hypersensitive response-like elicitor shared by necrotic and mild isolates. *Phytopathology*, 106(4), 395–406.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-15-0277-R>
- Senshu, H., Ozeki, J., Komatsu, K., Hashimoto, M., Hatada, K., Aoyama, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y., & Namba, S. (2009). Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (TGBp1) from various potexviruses during infection. *Journal of General Virology*, 90(4), 1014–1024. <https://doi.org/10.1099/vir.0.008243-0>
- Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(4), 365–371. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00058-X)

- Shahmir, Fariba. (2006). *Analysis of RNA silencing suppressor activity by TGBp1 of Pepino mosaic virus*. Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada.
- Short, M. N., & Davies, J. W. (1983). Narcissus mosaic virus: a potexvirus with an encapsidated subgenomic messenger RNA for coat protein. *Bioscience Reports*, 3(9), 837–846. <https://doi.org/10.1007/BF01133782/METRICS>
- Sikorskaite, S., Rajamäki, M. L., Baniulis, D., Stanys, V., & Valkonen, J. P. T. (2013). Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families. *Plant Methods*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-31>
- Silveira, A. B., Gauer, L., Tomaz, J. P., Cardoso, P. R., Carmello-Guerreiro, S., & Vincentz, M. (2007). The Arabidopsis AtbZIP9 protein fused to the VP16 transcriptional activation domain alters leaf and vascular development. *Plant Science*, 172(6), 1148–1156. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.03.003>
- Soler, S., López, C., & Nuez, F. (2005). Natural Occurrence of Viruses in Lycopersicon spp. in Ecuador. *Https://Doi.Org/10.1094/PD-89-1244C*, 89(11), 1244–1244. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1244C>
- Soler, S., López, C., Prohens, J., & Nuez, F. (2011). New sources of resistance to PepMV in tomato. In *Journal of Plant Diseases and Protection* (Vol. 118, Number 5).
- Soler, S., Prohens, J., Díez, M. J., & Nuez, F. (2002). Natural occurrence of pepino mosaic virus in Lycopersicon species in central and southern Peru. *Journal of Phytopathology*, 150(2), 49–53. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00712.x>
- Soler-Aleixandre, S., López, C., Díez, M. J., Pérez De Castro, A., & Nuez, F. (2005). Association of Pepino mosaic virus with tomato collapse. *Journal of Phytopathology*, 153(7–8), 464–469. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0434.2005.01002.X>
- Solovyev, A. G., Kalinina, N. O., & Morozov, S. Y. (2012). Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Number DEC). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00276>
- Solovyev, A. G., & Savenkov, E. I. (2014). Factors involved in the systemic transport of plant RNA viruses: the emerging role of the nucleus. *Journal of Experimental Botany*, 65(7), 1689–1697. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT449>

- Song, Z., Zhang, C., Jin, P., Tetteh, C., Dong, X., Luo, S., Zhang, S., Li, X., Liu, Y., & Zhang, H. (2022). The cell-type specific role of Arabidopsis bZIP59 transcription factor in plant immunity. *Plant Cell and Environment*, 45(6), 1843–1861. <https://doi.org/10.1111/pce.14299>
- Spatola Rossi, T., Pain, C., Botchway, S. W., & Kriechbaumer, V. (2022). FRET-FLIM to Determine Protein Interactions and Membrane Topology of Enzyme Complexes. *Current Protocols*, 2(10), e598. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.598>
- Spence, N. J., Basham, J., Mumford, R. A., Hayman, G., Edmondson, R., & Jones, D. R. (2006). Effect of Pepino mosaic virus on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology*, 55(5), 595–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01406.x>
- Steele, J. F. C., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Marsian, J., Meshcheriakova, Y., & Lomonossoff, G. P. (2017). Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(4), e1447. <https://doi.org/10.1002/WNAN.1447>;WEBSITE:WEBSITE:WIRES;WGROU:ST RING:PUBLICATION
- Stobbs, L. W., Greig, N., Weaver, S., Shipp, L., & Ferguson, G. (2009). The potential role of native weed species and bumble bees (*Bombus impatiens*) on the epidemiology of Pepino mosaic virus. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 31(2), 254–261. <https://doi.org/10.1080/07060660909507599>
- Sun, T., Rao, S., Zhou, X., & Li, L. (2022). Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/S43897-022-00023-2>
- Takeda, S., Hanano, K., Kariya, A., Shimizu, S., Zhao, L., Matsui, M., Tasaka, M., & Aida, M. (2011). CUP-SHAPED COTYLEDON1 transcription factor activates the expression of LSH4 and LSH3, two members of the ALOG gene family, in shoot organ boundary cells. *Plant Journal*, 66(6), 1066–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04571.x>
- Tamai, A., & Meshi, T. (2001). *Cell-to-Cell Movement of Potato virus X: The Role of p12 and p8 Encoded by the Second and Third Open Reading Frames of the Triple Gene Block* (Vol. 14, Number 10).
- Thuenemann, E. C., Byrne, M. J., Peyret, H., Saunders, K., Castells-Graells, R., Ferriol, I., Santoni, M., Steele, J. F. C., Ranson, N. A., Avesani, L., Lopez-Moya, J. J., & Lomonossoff, G. P. (2021). A replicating viral vector greatly enhances accumulation of helical virus-like particles in plants. *Viruses*, 13(5), 885. <https://doi.org/10.3390/V13050885/S1>

- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I. M., Chapman, S. N., & Oparka, K. J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *Journal of Cell Biology*, 201(7), 981–995.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201304003>
- Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K. M., Bell, K., Roberts, A. G., Lacomme, C., Cruz, S. S., & Oparka, K. J. (2012). The TGB1 movement protein of potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiology*, 158(3), 1359–1370.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.189605>
- Tilsner, J., & Oparka, K. J. (2012). Missing links? - The connection between replication and movement of plant RNA viruses. In *Current Opinion in Virology* (Vol. 2, Number 6, pp. 705–711). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.09.007>
- Trivedi, R., & Nagarajaram, H. A. (2022). Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Number 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232214050>
- Turchetto, C., De Castro Silvério, A., Waschburger², E. L., Gonçalves Lacerda², M. E., Vieira Quintana², I., & Turchetto-Zolet², A. C. (2023). Genome-wide identification and evolutionary view of ALOG gene family in Solanaceae. *Genetics and Molecular Biology*, 46(3), 20230142.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2023-0142>
- Tzfira, T., Vaidya, M., & Citovsky, V. (2001). VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with Agrobacterium VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and Agrobacterium infectivity. *The EMBO Journal*, 20(13), 3596.
<https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.13.3596>
- Úbeda, J. R., Aranda, M. A., & Donaire, L. (2025). Alphaflexiviridae in Focus: Genomic Signatures, Conserved Elements and Viral-Driven Cellular Remodeling. In *Viruses* (Vol. 17, Number 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v17050611>
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Má té, Z., Adá, E., Oakeley, E. J., Schä fer, E., & Nagy, F. (2004). *Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of Arabidopsis*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0308044100
- Upadhyaya, G., Sethi, V., Modak, A., & Gangappa, S. N. (2025). ALOG/LSHs: a novel class of transcription factors that regulate plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 76(3), 836–850.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erae409>

- Vaira, A. M., Lim, H. S., Bauchan, G. R., Owens, R. A., Natilla, A., Dienelt, M. M., Reinsel, M. D., & Hammond, J. (2012). Lolium latent virus (Alphaflexiviridae) coat proteins: Expression and functions in infected plant tissue. *Journal of General Virology*, 93(8), 1814–1824. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.042960-0/CITE/REFWORKS>
- van den Born, E., Omelchenko, M. V., Bekkelund, A., Leihne, V., Koonin, E. V., Dolja, V. V., & Falnes, P. O. (2008). Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5451–5461. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKN519>
- Van Der Vlugt, R. A. A., Cuperus, C., Vink, J., Stijger, I. C. M. M., Lesemann, D. E., Verhoeven, J. T. J., & Roenhorst, J. W. (2002). Identification and characterization of Pepino mosaic potexvirus in tomato. *EPPO Bulletin*, 32(3), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2338.2002.00598.x>
- van der Vlugt, R. A. A., Stijger, C. C. M. M., Verhoeven, J. Th. J., & Lesemann, D.-E. (2000). First Report of Pepino Mosaic Virus on Tomato. *Plant Disease*, 84(1), 103. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.103C>
- Van Eck, J., Kirk, D. D., & Walmsley, A. M. (2006). Tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 459–473. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:459/FIGURES/1>
- Van Verk, M. C., Neeleman, L., Bol, J. F., & Linthorst, H. J. M. (2011). Tobacco transcription factor NtWRKY12 interacts with TGA2.2 in vitro and in vivo. *Frontiers in Plant Science*, 2(JUL). <https://doi.org/10.3389/FPLS.2011.00032>,
- Verchot, J. (2011). Wrapping membranes around plant virus infection. *Current Opinion in Virology*, 1(5), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.009>
- Verchot, J. (2022). Potato virus X: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus. *Molecular Plant Pathology*, 23(3), 315–320. <https://doi.org/10.1111/MPP.13163;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Verchot, J., Angell, S. M., & Baulcombe, D. C. (1998). In Vivo Translation of the Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Subgenomic mRNAs. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 72, Number 10).
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O., & Gilmer, D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(10), 1231–1247. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0086>

- Verchot-Lubicz, J., Ye, C. M., & Bamunusinghe, D. (2007). Molecular biology of potexviruses: Recent advances. In *Journal of General Virology* (Vol. 88, Number 6, pp. 1643–1655). <https://doi.org/10.1099/vir.0.82667-0>
- Verhoeven, Jt., van der Vlugt, R., & Roenhorst, J. (2003). High similarity between tomato isolates of Pepino mosaic virus suggests a common origin. In *European Journal of Plant Pathology* (Vol. 109).
- Voinnet, O., Lederer, C., & Baulcombe, D. C. (2000). A Viral Movement Protein Prevents Spread of the Gene Silencing Signal in *Nicotiana benthamiana*. In *Cell* (Vol. 103).
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C. S., Dietrich, K., Wang, X., Schütze, K., Alonso, R., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., & Dröge-Laser, W. (2006). Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *EMBO Journal*, 25(13), 3133–3143. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601206>
- WO2022263602A1_Plantas. (n.d.).
- Wright, D., & Mumford, R. (1999). Pepino mosaic Potexvirus (PepMV): first records in tomato in the United Kingdom. *Plant Disease Notice*, 89, 400.
- Wu, W. C., Chen, I. H., Hou, P. Y., Wang, L. H., Tsai, C. H., & Cheng, C. P. (2024). The phosphorylation of the movement protein TGBp1 regulates the accumulation of the Bamboo mosaic virus. *Journal of General Virology*, 105(1). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001945>
- Wu, X., Liu, J., Chai, M., Wang, J., Li, D., Wang, A., & Cheng, X. (2019). *The Potato Virus X TGBp2 Protein Plays Dual Functional Roles in Viral Replication and Movement*. <https://doi.org/10.1128/JVI>
- Wubben, J. M., Atkinson, S. C., & Borg, N. A. (2020). The role of protein disorder in nuclear transport and in its subversion by viruses. In *Cells* (Vol. 9, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells9122654>
- Wung, C. H., Hsu, Y. H., Liou, D. Y., Huang, W. C., Lin, N. S., & Chang, B. Y. (1999). Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potexvirus. *Journal of General Virology*, 80(5), 1119–1126. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-5-1119>
- Xiao, W., Ye, Z., Yao, X., He, L., Lei, Y., Luo, D., & Su, S. (2018). Evolution of ALOG gene family suggests various roles in establishing plant architecture of *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1431-1>

- Xu, C., Park, S. J., Van Eck, J., & Lippman, Z. B. (2016). Control of inflorescence architecture in tomato by BTB/POZ transcriptional regulators. *Genes and Development*, 30(18), 2048–2061. <https://doi.org/10.1101/gad.288415.116>
- Xu, Z., Wang, F., Ma, Y., Dang, H., & Hu, X. (2022). Transcription Factor SlAREB1 Is Involved in the Antioxidant Regulation under Saline–Alkaline Stress in Tomato. *Antioxidants*, 11(9), 1673. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11091673/S1>
- Yamaguchi, Y., & Huffaker, A. (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4), 351–357. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2011.05.001>
- Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagné, M. È. L., Bolduc, M., Leclerc, D., & Li, H. (2012). Crystal Structure of the Coat Protein of the Flexible Filamentous Papaya Mosaic Virus. *Journal of Molecular Biology*, 422(2), 263–273. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2012.05.032>
- Ye, C., Dickman, M. B., Whitham, S. A., Payton, M., & Verchot, J. (2011). The Unfolded Protein Response Is Triggered by a Plant Viral Movement Protein. *Plant Physiology*, 156(2), 741. <https://doi.org/10.1104/PP.111.174110>
- Ye, C. M., Chen, S., Payton, M., Dickman, M. B., & Verchot, J. (2013). TGBp3 triggers the unfolded protein response and SKP1-dependent programmed cell death. *Molecular Plant Pathology*, 14(3), 241–255. <https://doi.org/10.1111/mpp.12000>
- Yoshida, A., Sasao, M., Yasuno, N., Takagi, K., Daimon, Y., Chen, R., Yamazaki, R., Tokunaga, H., Kitaguchi, Y., Sato, Y., Nagamura, Y., Ushijima, T., Kumamaru, T., Iida, S., Maekawa, M., & Kyojuka, J. (2013). TAWAWA1, a regulator of rice inflorescence architecture, functions through the suppression of meristem phase transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(2), 767–772. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1216151110/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Yoshida, A., Suzaki, T., Tanaka, W., & Hirano, H. Y. (2009). The homeotic gene long sterile lemma (G1) specifies sterile lemma identity in the rice spikelet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(47), 20103–20108. https://doi.org/10.1073/PNAS.0907896106/SUPPL_FILE/0907896106SI.PDF
- Zarrougui, N. E., Spanos, T., Kissoudis, C., & Livieratos, I. C. (2022). The effect of soil salinity and pepino mosaic virus infection on the expression of tomato defence-related genes. *Plant Pathology*, 71(6), 1304–1312. <https://doi.org/10.1111/ppa.13566>

- Zelman, A. K., & Berkowitz, G. A. (2023). Plant Elicitor Peptide (Pep) Signaling and Pathogen Defense in Tomato. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(15). <https://doi.org/10.3390/PLANTS12152856>
- Zhang, L., Chen, H., Brandizzi, F., Verchot, J., & Wang, A. (2015). The UPR Branch IRE1-bZIP60 in Plants Plays an Essential Role in Viral Infection and Is Complementary to the Only UPR Pathway in Yeast. *PLOS Genetics*, 11(4), e1005164. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005164>
- Zhang, X., Lim, K., Qiu, Y., Hazawa, M., & Wong, R. W. (2025). Strategies for the Viral Exploitation of Nuclear Pore Transport Pathways. *Viruses 2025, Vol. 17, Page 151, 17(2)*, 151. <https://doi.org/10.3390/V17020151>
- Zhao, L., Nakazawa, M., Takase, T., Manabe, K., Kobayashi, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Matsui, M. (2004). Overexpression of LSH1, a member of an uncharacterised gene family, causes enhanced light regulation of seedling development. *Plant Journal*, 37(5), 694–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01993.x>
- Zhao, S., Hong, W., Wu, J., Wang, Y., Ji, S., Zhu, S., Wei, C., Zhang, J., & Li, Y. (2017). A viral protein promotes host SAMS1 activity and ethylene production for the benefit of virus infection. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.27529>
- Zhulidov, P. A., Bogdanova, E. A., Shcheglov, A. S., Vagner, L. L., Khaspekov, G. L., Kozhemyako, V. B., Matz, M. V., Meleshkevitch, E., Moroz, L. L., Lukyanov, S. A., & Shagin, D. A. (2004). Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Research*, 32(3). <https://doi.org/10.1093/NAR/GNH031>
- Zi, J., Mafu, S., & Peters, R. J. (2014). To Gibberellins and Beyond! Surveying the Evolution of (Di)terpenoid Metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 259. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-050213-035705>
- Ziebell, H., & Carr, J. P. (2010). *Cross-Protection: A Century of Mystery*. 76, 211–264. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(10\)76006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76006-1)
- Zou, J., Li, Z., Tang, H., Zhang, L., Li, J., Li, Yuhong, Yao, N., Li, Yaxing, Yang, D., & Zuo, Z. (2021). Arabidopsis lsh8 positively regulates aba signaling by changing the expression pattern of aba-responsive proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10314. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910314/S1>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKG595>