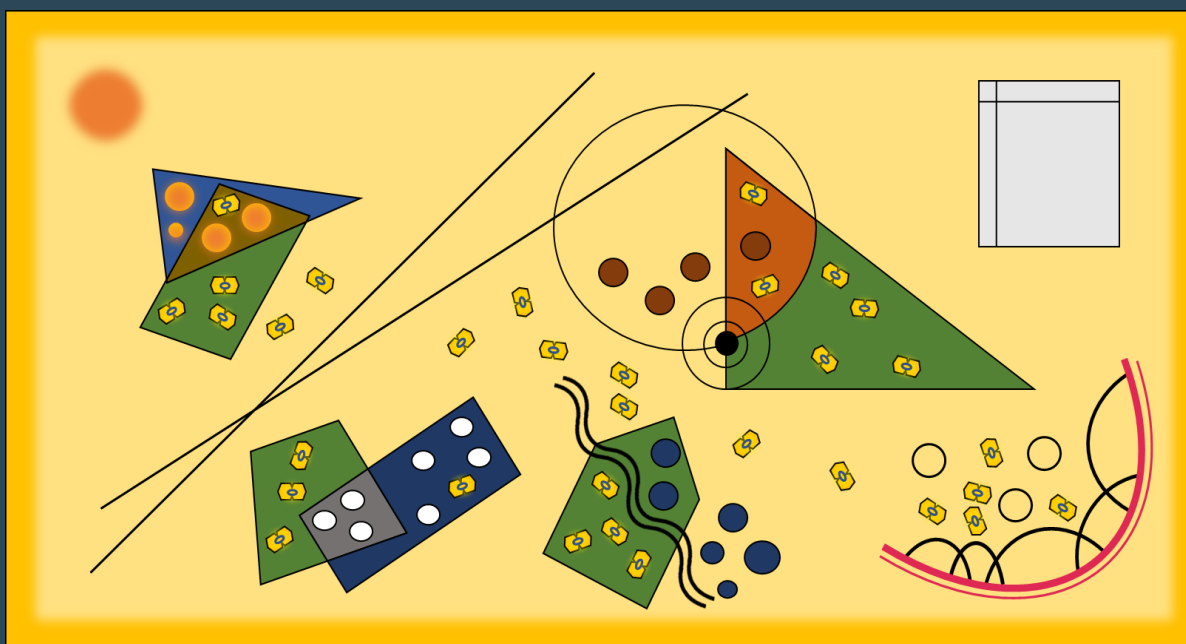


ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE ESTRESSES ABIÓTICOS Y LA INFECCIÓN POR GEMINIVIRUS EN SOLANÁCEAS



Tesis doctoral
Miguel Ángel Corrales Gutiérrez


Directoras
Araceli Castillo Garriga
Rosa Lozano Durán
Tutora
Araceli Castillo Garriga

Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Programa de Doctorado: Biotecnología Avanzada
Málaga, 2021



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Miguel Ángel Corrales Gutiérrez

 <https://orcid.org/0000-0001-5535-7451>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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

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

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





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



TESIS DOCTORAL

Estudio de la interacción entre estreses abióticos y la infección por geminivirus en solanáceas

Miguel Ángel Corrales Gutiérrez

Directoras

Araceli Castillo Garriga

Rosa Lozano Durán

Tutora

Araceli Castillo Garriga

**Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga
Programa de Doctorado: Biotecnología Avanzada
Málaga, 2021**





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

D./Dña MIGUEL ÁNGEL CORRALES GUTIÉRREZ

Estudiante del programa de doctorado BIOTECNOLOGÍA AVANZADA de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE ESTRESSES ABIÓTICOS Y LA INFECCIÓN POR GEMINIVIRUS EN SOLANÁCEAS

Realizada bajo la tutorización de ARACELI CASTILLO GARRIGA y dirección de ARACELI CASTILLO GARRIGA Y ROSA LOZANO DURAN (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 26 de JUNIO de 2021

Fdo.: MIGUEL ÁNGEL CORRALES GUTIÉRREZ Doctorando/a	Fdo.: Araceli Castillo Garriga Tutor/a
Fdo.: Rosa Lozano Durán	Araceli Castillo Garriga



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología

Area de Genética

La Dra. Araceli Castillo Garriga, Profesora Titular de Genética de la Universidad de Málaga, y la Dra. Rosa Lozano Durán, Principal Investigator del Shanghai Center for Plant Stress Biology (Academia China de Ciencias)

INFORMAN:

Que D. Miguel Angel Corrales Gutiérrez ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral titulada “*Estudio de la interacción entre estreses abióticos y la infección por geminivirus en solanáceas.*” con la cual aspira a la obtención del grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, y tenga los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, se extiende el presente informe en Málaga, a 26 de Junio de 2021.

Dra. Rosa Lozano Durán

Dra. Araceli Castillo Garriga

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología celular, Genética y Fisiología de la Universidad de Málaga y en el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea (IHSM) “La Mayora” UMA-CSIC. Ha sido financiada dentro del proyecto “*Interacciones multitróficas en el patosistema geminivirus/crinivirus - Bemisia tabaci - tomate*” (AGL2016-75819-C2-1-R) concedido a la Dra. Araceli Castillo Garriga.

Composición del tribunal

Presidente

Dr. Miguel Ángel Botella Mesa

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (UMA-
CSIC)
Universidad de Málaga

Secretario

Dr. Edgar Rodríguez Negrete

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Vocal

Dr. Juan Ignacio Vílchez Morillas

Instituto de Tecnología Química e Biológica Antonio Xavier (ITQB),
Universidade Nova de Lisboa (Oeiras, Portugal) and Agro-Tech Campus of
Oeiras

Sustitutos

Dra. Carmen Beuzón López

Departamento de Biología Molecular y Bioquímica
Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (UMA-
CSIC)

Dra. Norma Elena Leyva López

Departamento de Biotecnología Agrícola
CIIDIR Unidad Sinaloa
Instituto Politécnico Nacional, IPN, México

Dr. César Llave Correas

Biología de Plantas (Virología Molecular de Plantas).
Centro de Investigaciones Biológicas.
CSIC.

Agradecimientos

En la mayoría de las actividades humanas no existe el individualismo. Es decir, obviamente existimos como individuos, pero debido a la capacidad de nuestra especie de alterar el entorno mediante herramientas complejas y a nuestros elaborados sistemas sociales, a veces es más difícil comprender donde termina uno y empieza el otro. Por ejemplo, si yo hago una simple tortilla, ¿debería incluir entre los autores de la tortilla a quien elaboró el aceite, recogió los huevos y creó la cuchara y la sartén? ¿A quien me dio la receta, a quien me enseñó a batir los huevos? Indudablemente existen autores y autores, pero como individuos estamos inmersos en la colectividad (el tejido de hombres, ninguna persona es una isla, *homo sum, humani nihila me alienum puto...* etc.). El siguiente apartado es un intento de reconocer este hecho, una tentativa de expresar mi reconocimiento a la ayuda que tantas personas me han aportado.

Primero, quiero empezar agradeciéndole a Araceli el darme esta oportunidad, por esforzarse en comprender mi forma de pensar para mantener un diálogo eficaz, así como por tener paciencia con mis errores y enseñarme algo nuevo en cada reunión. Por su atención, especialmente cuando más la necesitaba al empezar como alumno interno.

A Rosa, porque también me dio esta oportunidad, por darme una cálida bienvenida en Shanghái, por enseñarme una nueva perspectiva desde la que diseñar y analizar experimentos, la importancia de la organización en el laboratorio y los beneficios de estructurar e hilar la bibliografía.

A Eduardo, porque siempre tuvo paciencia para reunirse con Araceli y conmigo, por sus aportaciones y su capacidad de llevar varios proyectos de forma conjunta. Porque siempre se esforzó en intentar ayudar con su experiencia cada vez que comentábamos los resultados de un experimento.

A Sonia, a Carmen, a Javi, a Vitoriano y a Miguel Ángel, por sus aportaciones, por su tiempo y esfuerzo dedicados a organizar el laboratorio, las prácticas de las asignaturas y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años.

A Mariem, porque nunca hubiera adivinado que una chiquilla nacida en los desiertos de Túnez pudiera ocupar una parte tan importante de mi vida. Porque es la niña africana más guapa que conozco, porque hacía café cuando yo me prepara té, porque no metió bichos en mi habitación más que un par de veces y porque es difícil encontrar a una persona tan dulce y cariñosa. Porque sería difícil describir lo mucho que me ha ayudado.

A Blanca, por aguantarme todos mis bajones y mis meteduras de pata, porque cuando buscaba piso me hizo uno de papel y cartón, porque fue a recogerme un premio aún estando constipada y porque sólo ella me mangonea como a mí me gusta. Porque sólo su agujero de oscuridad y miseria puede colapsar el mío, por todas las palabras, por todas las conversaciones, por todas las clases sobre biología y costumbres de la mujer. Porque sin su apoyo esto no se habría llevado a cabo, es imposible agradecerle cada broma, cada sonrisa y cada carantoña. Porque es tan única e irrepetible que no es mujer u hombre, es sólo y simplemente Blanca.

A Ana Luna, porque es un rayito de sol, o de luna, hecho persona. Porque siempre me ríe las gracias, me aguanta cuando la chincho y me bufa las zalamerías. Por todo lo que me ha enseñado y ha compartido, porque ha enriquecido mi vida de forma inconmensurable. Porque es una mujer maravillosa desde cualquier ángulo en el que la mires y porque nada de esto tendría sentido sin ella.

A Pepe, porque siempre ha tenido una paciencia infinita con las preguntas que le hago, porque siempre ha estado ahí para animarme, por todos los episodios de Los Simpsons que nos hemos memorizado y por no haberme llevado a los tribunales por acoso en el trabajo. Por los paseos en bicicleta por Guilin y las cervezas de la China. Y porque tiene un gusto inmejorable para buscarse novia.

A Tábata, nuestra Tabatita, la brujita del laboratorio que me enseñó a empezar la casa por el tejado. Porque siempre quiere ayudar, por todo el amor y el cariño con que siempre nos regala. Porque para mí siempre será mamá Tábata, aunque ya sea mamá por título propio.

A Edgar, porque además de ser una persona generosa con su tiempo, dispuesto siempre a enseñar algo a un pobre achichinche, fue la persona con la que aprendí que muchas veces la ciencia tiene más de artesanía que de técnica

A Álvaro Piedra, porque fue un primer guía estupendo en el laboratorio. Metódico e incansable, porque siempre se preocupó por mí y tuvo la generosidad de enseñarme lo que sabía.

A Eloy, porque saber que alguien tan excepcional tiene una buena opinión de ti, siempre sube el ánimo. Porque me ha animado, y me ha ayudado en un sinfín de cosas, por su excepcional bondad, por la generosidad que siempre le desborda y por su sempiterno buen humor en todo momento desde que nos conocimos.

A Bego, que nunca dice que no a un helado, que siempre está ahí dispuesta a organizar lo que sea. A Delfín, por las raquettes, el chocolate suizo y la bondad con la que comparte todo. A Lidia, que siempre está ahí, con su corazón de oro para ayudar en lo que haga falta, desde unas transgénicas a regalarte un poco de calma, porque aunque sea antequerana se deja querer. A Mario, por todas las conversaciones, por las lecciones de estadística y por el cariño que me ha regalado. A Álvaro, por aguantarme tanto y tanto, porque siempre ha hecho que sonriera. A Vítor, por toda su ayuda y experiencia, porque siempre regala un consejo con una sonrisa. A Karen, porque aunque ponga los ojos en blanco y diga que diciéndolo yo no tienen ningún valor, sigo pensando que es una mujer guapísima, inteligente, sensible y cultivada como pocas personas. A Noemí, porque es un volcán en erupción, porque siempre ha compartido sus pensamientos y experiencia, preocupándose de los más jovencitos del laboratorio. A Sara, porque siempre recibe con una risa a quien sea.

También tengo que agradecerle mucho a Lucía, por todo el cariño y la experiencia que me ha regalado, porque está tanto para un roto como para un descosido y porque por eso mismo es mi perota favorita. A Pablo, porque siempre está echando una mano, porque además de un excelente técnico es una persona con la que se puede hablar tanto de un

medio de cultivo como de la Bauhaus o de un diseñador de carteles del siglo XIX. A Rocío, porque nunca pensé que tanto amor y capacidad de esfuerzo pudieran caber en una persona, y por las transgénicas que hicimos. A Bea, que ha llevado tantas cosas para adelante sin que por ello dejara de sonreír a nadie. A Alex, porque siempre está igual de dispuesto a trabajar sin descanso que a tomarse algo al finalizar el día.

A todos los que faltan, Fran, Jose, Carlos (indispensables para cualquier plan que se quiera montar). A David (otra gran persona, tanto para salir como para aprender en el laboratorio) y a Carmen (porque no he visto a una persona que aúne un carácter tan combativo con tanto amor y cariño). A Vito Meco, por la generosidad con la que regala su experiencia a los más chiquitines. A Eli, por su cariño, porque me pidió que nunca olvidara ser así de educado y por toda su ternura. A la gente del departamento, por los buenos ratos echados, por todas las risas y conversaciones, a Alba, Diego, Javi, Nieves y Adrián, por todas las bromas, las conversaciones y el compañerismo compartido.

A Jessi, porque quiero que se sienta culpable por haberme dedicado sólo una línea en sus agradecimientos, y encima en el saco de los genéticos (¡Habrased visto!), en su tesis. Porque es una amiga, porque siempre me apoya y me recoge cuando me caigo, porque siempre ayuda en momentos difíciles, porque es inspirador conocer a alguien que siempre se pone de parte del débil y que siempre dice lo que piensa. Por toda la contaminación que nos comimos en China, por los paseos por Shanghái y los noodles de Xi'an. Y porque es la mujer que mejor gusto tiene para buscarse novio.

A Liping, que es una chica guapísima e inteligente como pocas, porque siempre está dispuesta a echar una mano y conversar. A Yaru, por todo su trabajo, por su cariño y su amabilidad. A Xinyu, que es la eficiencia personificada, una persona con un corazón de oro, una capacidad de trabajo espectacular y una persona que sabe ser atenta y cariñosa. A Tang, por ayudarme los primeros días en el laboratorio, porque es una persona sensible e inteligente. A Yanling, Pengfei, Yanmin, Xuehao. Gang, Yali, Ding Yi, Dingxue, Wenjia, Torres, a Alberto a Laura y Jose por toda su ayuda, todas las conversaciones y todo lo que compartimos. A Nibras, por su amabilidad, por su generosidad y por su paciencia conmigo. A Eva y Rafa, porque me hicieron un hueco en su casa y compartieron el calor y el cariño de su hogar conmigo, además de por todas las bromas, las conversaciones, la sabiduría y experiencia que Rafa compartió conmigo. A Nacho, porque ha sido muy generoso con su tiempo y esfuerzo, porque siempre tuvo la paciencia para enseñarme y ayudarme, y porque como amigo y dúo cómico es imposible encontrar a alguien igual. A Aurora, porque es una persona excepcional, fuerte, femenina, inteligente, con un gusto musical inabarcable, decidida y dura a la vez que comprensiva y dulce, porque el cariño que guarda es inmensurable. A Borja, porque es un gallego de pura cepa, amable e inteligente, que igual que hacer un western es capaz de bailar salsa. A Karen y Pilar, por los buenos ratos que compartimos, por su cariño y apoyo. A Sol, porque no hay palabras para describir el cariño que guarda en el pecho, porque es una persona tremendamente generosa que siempre me está dispuesta a ayudar, por todo el amor que siempre me ha expresado. A Lilian, Gabi y Dinna, porque me ayudaron a conocer a mucha gente maravillosa, porque son personas que me abrieron

un mundo nuevo y por todas las risas, por todas las experiencias, que me regalaron.

A Juan, porque no existen suficientes palabras para que pueda comunicarle lo mucho que le debo. Porque con un silencio o una página en blanco nos decimos suficiente. A Pedro, porque es igual de inteligente, y de bruto, y de peludo, que Balú. Porque siempre ha estado ahí, por todas las discusiones que hemos tenido y por las que nos quedan. A Ismael, porque es de las pocas personas que conozco que sabe valorar el silencio y nunca dice nada que no haya pensado, por todo su cariño y atención. A Jose, porque siempre está dispuesto a salir de fiesta, ya sea haciendo reír a la gente o haciendo que le partan la cara, porque siempre se preocupa por los demás. A Franci, porque fue el primero en enseñarme que el humor ácido no es mala cosa y porque me ha tenido que aguantar muchos años.

A mi madre, por todos los sacrificios que hizo para mantenerme, porque me enseñó a amar la naturaleza y porque hizo todo lo que pudo por lidiar con un chiquillo inquieto. A mi padre, porque siempre trabajó en algo que le desagradaba para alimentar a sus hijos, porque me descubrió cosas que de otro modo nunca hubiera buscado. A mi tía Ana María, mi Tata Mina, porque me llevaba a todos sitios de pequeño y no se cansaba de mí, porque me pedía que le contara cuentos y me hacía de rabiñar, porque me ha sustentado en momentos complicados, y porque siempre corrige lo que escribo en inglés. A mi abuelo, porque sería una persona muy diferente si no fuera por él, porque fue él el que me enseñó a cultivar y a utilizar la naturaleza para mi provecho. A tito Miguelín, por todo lo que es y ha sido, por su cariño y su amor, por toda la obra que ha hecho con su vida. A Elena, porque es mi hermana y no dejo de pensar en ella, porque lo único que puedo decir cuando la veo en mi mente es que le deseo todo lo mejor, aunque para ello tenga que ser duro, porque me ha aguantado como hermano, porque sabe cómo dibujar y hacer teatro conmigo. A la memoria de mi abuela, porque me contaba cuentos cuando era tan pequeño que apenas si lo recuerdo y porque me cebaba como a un cochinitillo. A Andrés, porque a veces la vida es perra, estúpida y ciega, porque cuando nos separamos supe el universo en el que estaba y el que quería. A la memoria de mis bisabuelos, porque sólo conocí a uno, pero fueron gente, dura, recia y terca, que aun viviendo en el agreste campo andaluz no se dejaron domeñar y consiguieron aprender los rudimentos de la lectura y el álgebra, porque provienen del campo y del campo es esta tesis.

A todos los que me han apoyado y ayudado en este camino, a todos los que no he nombrado, si esta tesis tiene algo bueno es gracias a vosotros.



Miguel Ángel Corrales Gutiérrez

Estudio de la interacción entre
estreses abióticos y la infección
por geminivirus en solanáceas

Tesis Doctoral

Málaga, 2019



La ciencia es un mito, sólo que es el mito
más hermoso, el único generalizable a
toda la especie y quizás el más digno de
respetarse

Antonio Escohotado

ÍNDICE

Summary	6
Introducción general	23
1. Geminivirus	24
1.1. Familia Geminiviridae: importancia agronómica y taxonomía	24
1.2. Estructura y organización del genoma de los geminivirus	26
1.3. Ciclo de vida de los geminivirus	28
1.3.1. El virus y la planta hospedadora	28
1.3.2. El virus y el insecto vector	31
1.4. Transcripción de los genes virales	32
1.5. Proteínas virales	33
1.5.1. C1/Rep	33
1.5.2. C3/REn	37
1.5.3. C2/TrAP	38
1.5.4. C4	38
1.5.5. V1/CP	39
1.5.6. V2/MP	40
1.5.7. V3	40
1.5.8. BV1/NSP	40
1.6. Satélites asociados a geminivirus	41
1.7. Mecanismos de defensa frente a geminivirus	42
2 Estreses abióticos	44
2.1 Estrés por sequía	44
Biosíntesis de ABA	44
Transducción de la señal de ABA	47
2.1.2 Respuesta a sequía independiente de ABA	48
2.2 Estrés por salinidad	49
2.2.1 Respuesta a estrés por salinidad: ruta Salt Overly Sensitive	50
2.2.2 Respuesta a estrés por salinidad: vía de etileno	51
2.3 Estrés por alta temperatura	53
2.3.1 Percepción de la temperatura en la planta	54
2.3.2 Respuesta a estrés por alta temperatura	55
3. Interacciones entre estreses abióticos y bióticos en planta	59
3.1 Enfermedades virales en plantas en los tiempos del cambio climático	59
3.1.1 Interacciones entre virus y estrés por sequía en planta	60
3.1.2 Interacciones entre virus y estrés por alta temperatura en planta	62

3.1.3 Interacciones entre patógenos y estrés por salinidad en planta	65
Objetivos	69
Resultados	71
Capítulo 1	
<i>Interacción entre el estrés hídrico y la infección por geminivirus en solanáceas.</i>	73
INTRODUCCIÓN	74
RESULTADOS	76
1.1 Efecto del estrés por sequía en la infección de TYLCV en <i>N. benthamiana</i> y tomate.	76
1.1.1 Diseño experimental.	76
1.1.2 El estrés por sequía dificulta la acumulación de virus en plantas de <i>N. benthamiana</i>	78
1.1.3 El estrés por sequía dificulta la acumulación de virus en plantas de tomate.	81
1.2 Efecto de la infección de TYLCV en la respuesta a estrés por sequía en <i>N. benthamiana</i> y tomate.	84
1.2.1 Diseño experimental.	84
1.2.2 La infección por TYLCV favorece la tolerancia a estrés por sequía en plantas de <i>N. benthamiana</i>	85
1.2.3 La infección por TYLCV favorece la tolerancia a estrés por sequía en plantas de tomate	88
1.3. Caracterización de la mayor tolerancia al estrés por sequía debida al geminivirus TYLCV	91
1.3.1 La proteína C4 de TYLCV confiere tolerancia al estrés por sequía en <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
1.3.2 El aumento en la tolerancia a sequía conferido por la expresión de C4 de TYLCV es independiente de su efecto en la arquitectura xilemática.....	93
1.3.3 La presencia de C4 de TYLCV no afecta a la acumulación de ABA ni a las respuestas dependientes de ABA.....	96
DISCUSIÓN	98
Capítulo 2	
<i>Interacción entre el estrés salino y la infección por geminivirus en solanáceas.</i>	103
INTRODUCCIÓN	104
RESULTADOS	107
2.1 Efecto del estrés por salinidad en la infección de TYLCV en plantas de <i>N. benthamiana</i>.	107
2.1.1 Diseño experimental.	107

2.1.2 El estrés salino dificulta la acumulación de virus en plantas de <i>N. benthamiana</i> .	109
2.2 Efecto del estrés por salinidad en la infección de TYLCV en plantas de tomate.	114
2.2.1 Diseño experimental.	114
2.2.2 El estrés salino dificulta la acumulación de virus en plantas de tomate.	116
2.3 Efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino en <i>N. benthamiana</i>.	121
2.3.1 Diseño experimental	121
2.3.2 La infección por TYLCV confiere una tolerancia leve a la salinidad en <i>N. benthamiana</i> .	122
2.4 Efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino en tomate.	128
2.4.1 Diseño experimental	128
2.4.2 La infección por TYLCV no confiere tolerancia a salinidad en tomate	130
DISCUSIÓN	135
Capítulo 3	
Efecto del estrés térmico sobre la infección del geminivirus TYLCV	141
INTRODUCCIÓN	142
RESULTADOS	144
3.1 Efecto del estrés térmico en la infección de TYLCV en tomate.	144
3.1.1 Diseño experimental.	144
3.1.2 El aumento de temperatura favorece la acumulación de virus en plantas de tomate.	145
3.2 Efecto de la temperatura en la infección de TYLCV en <i>N. benthamiana</i>	148
3.2.1 Diseño experimental	148
3.2.2 La alta temperatura en <i>N. benthamiana</i> , dificulta la infección por TYLCV.	150
DISCUSIÓN	154
Material y Métodos	159
1. Microorganismos y medios de cultivo	160
1.1 <i>Escherichia coli</i>	160
1.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	160
1.3 TYLCV	160
1.4 Medios de cultivo	161
2. Material vegetal y condiciones de cultivo	161
2.1 Plantas transgénicas utilizadas en este trabajo	162
3. Oligonucleótidos	163

4 Biología Molecular	164
4.1 Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	164
4.2 Transformación de <i>A. tumefaciens</i> mediante electroporación	164
4.3 Extracción de DNA genómico de planta	165
4.4 Cuantificación relativa del DNA viral mediante qPCR	165
4.5 Extracción de RNA de plantas de <i>A. thaliana</i>	166
4.6 RT-qPCR de plantas de <i>A. thaliana</i>	166
5 Ensayos de infección con TYLCV	167
5.1 Ensayos de infección en <i>N. benthamiana</i>	167
5.2 Ensayos de infección en tomate	167
5.3 Cuantificación de síntomas	168
7 Ensayos de estrés abióticos.....	169
7.1 Ensayos de estrés por alta temperatura	169
7.2 Ensayos de estrés por sequía	169
7.2.1 Ensayos de estrés por sequía para estudiar el efecto de la sequía en la infección viral	170
7.2.2 Ensayo de estrés por sequía para estudiar el efecto de la infección viral en la respuesta al estrés por sequía.....	170
7.2.3 Ensayo de estrés por sequía en plantas de <i>A. thaliana</i>	171
7.3 Ensayos de estrés por salinidad.....	171
7.3.1 Ensayo de estrés por salinidad para estudiar el efecto de la salinidad en el virus	171
7.3.2 Ensayo de estrés por salinidad para estudiar el efecto del virus en la respuesta al estrés por salinidad	172
8. Ensayos de interacción con ABA.....	172
8.1 Ensayo de germinación en ABA	172
8.2 Cuantificación de ABA.....	173
Conclusions	175
Bibliografía.....	179
Anexo I	
Publicaciones.....	237
Anexo II	
Bibliografía recomendada sobre interacciones entre estreses abióticos y bióticos.....	241
Anexo III	
Índice de tablas y figuras.....	245

Summary

Geminiviruses constitute a family of non-enveloped viruses which possess single stranded (ss) circular DNA genomes and they are transmitted by different insects such as leafhoppers and, specially, whiteflies like *Bemisia tabaci* (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Jeske, 2009; Navas-Castillo *et al.*, 2011). Geminivirus cause billions of dollars economic losses around the world, affecting different crops such as pepper, cassava or tomato, in warm and tropical climates (Shepherd 2010, Legg y Fauquet 2004). This family of viruses includes nine genera, classified by insect vector, genome organization, host range and nucleotide similarity. Begomovirus is the most studied genera, viruses of this family are transmitted by whiteflies and could be divided in monopartite (a genome of one molecule) or bipartite (a genome of two molecules). Begomovirus family includes some of the most widespread virus species, such as *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Zerbini *et al.*, Varsani *et al.*, 2017). TYLCV has colonized different crops in countries around the world, and is the main causal agent of *Tomato yellow leaf curl disease* (TYLCD), one of the most devastating plant diseases in tomato (Cohen & Antignus, 2011; García-Arenal & Zerbini, 2019).

In the field, geminivirus infection is started when an insect, used by the virus as vector, feeds on the phloem of a host plant. Then, the virions are transmitted and infect the host; the ssDNA is uncoated and the CS strand is synthesised. In the nucleus, the double strand (ds) DNA will be replicated by host polymerases by two different mechanisms: rolling circle replication (RCR) and recombination-dependent replication (RDR), allowing the synthesis of new ssDNA molecules which will be encapsulated and transported to other host cells or the saliva glands of a new vector insect (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Jeske *et al.*, 2001).

The dsDNA molecule also serves as template for the polymerase II of the host, allowing the transcription of viral genes *Rep*, *C2*, *C3*, *C4*, *CP* and *V2* (Borah *et al.*, 2016). The protein *Rep* is the protein which initiates the replication (Fondong *et al.*, 2013), *C2* has been associated with late viral gene expression and gene silencing suppression (Trink *et al.*, 2020; Guerrero *et al.*, 2020), *C4* is a small and versatile protein with two cellular localizations (plasma membrane and chloroplast) due to a myristoylation site in its N-terminal sequence (Rosas-Díaz *et al.*, 2018). *C4* has been associated with symptoms development, gene silencing suppression and DNA transport (Mei *et al.*, 2018a; Rosas-Díaz *et al.*, 2018; Luna & Lozano-Durán, 2020). *CP* is the capsid protein, which conforms the capsid of the virions. *CP* has the ability of bind to DNA and it has an active role in virion transport (Liu *et al.*, 1997; Noris *et al.*, 1998). *V2* is the main gene silencing suppressor protein of geminivirus (Luna *et al.*, 2017, 2020) and is also related to cell-to-cell and long distances DNA transport (Boulton *et al.*, 1989, 1993; Mullineaux *et al.*, 1988; Wartig *et al.*, 1997). Finally, in bipartite begomovirus the

protein NSP is related to cellular trafficking, suppression of plant defence allowing systemic infection (Fontes *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2020).

Recently, an increase number of studies have discovered that begomovirus genomes could present small DNA molecules associated. These molecules are divided into three types: alphasatellites, betasatellites and deltasatellites (Briddon *et al.*, 2003b; Briddon *et al.*, 2004; Lozano *et al.*, 2016). Alphasatellites depend of its viral host for movement and insect transmission, but they encode their own Rep protein, and for this reason alphasatellites have an autonomous replication in plant cells (Mansoor *et al.*, 1999; Saunders y Stanley, 1999). Betasatellites encode for one protein (β C1) related to gene silencing suppression and symptom development and it depends on helper begomoviruses for movement and replication (Zhou, 2013). Deltasatellites are small size non-coding DNA molecules, which are completely dependent on their helper virus (Fiallo-Olivé *et al.*, 2016).

Due to the fact that geminiviruses are obligated parasites, they depend on the molecular machinery of the host to replicate and transmit. The plants have evolved to develop different strategies to defend against this virus; one of the most important defence mechanisms is gene silencing, which block the expression of viral genes (Bologna y Voinnet, 2014; Castel y Martienssen, 2013; Wang *et al.* 2012). We can divide gene silencing in two types: transcriptional gene silencing (TGS) and posttranscriptional gene silencing (PTGS) (Bologna & Voinnet, 2014). But, in this “arm race”, geminivirus have created proteins with gene silencing suppression activity, allowing the infection. For this reason, begomovirus and their satellites posses proteins such as C2, C4, V2 and β C1 which supress PTGS and proteins such as Rep, C2, V2 and β C1 that also supress TGS (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Raja *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2021).

In field conditions, plants develop responses to biotic stresses such as viral infections, but they are also exposed to abiotic stresses. For this reason, plants have developed a wide range of mechanisms to respond stresses, for example drought, salinity or high temperatures.

In this way, the most known response to drought stress in plants is the abscisic acid (ABA)-dependent response, which implies, throughout the synthesis, activation and transport of ABA, stomata closing to limit the water loss caused by transpiration, osmoprotectants accumulation and changes in plant physiology to increase water accumulation and avoid transpiration (Hossain *et al.*, 2016).

Salt stress is another abiotic stress, common in areas close to the seas and oceans. In plants, there are two principal pathways involved in salt stress response; the Salt Overly Sensitive (SOS) response and the ethylene mediated

response. On the one hand, the effects of SOS response imply cellular ion channels closing and the activation of different ion exchangers which expulse Na⁺ and Cl⁻ ions to the apoplast and the vacuoles. On the other hand, the ethylene mediated response triggers the osmoprotectants synthesis and the activation of proteins which act as Reactive Oxygen Species (ROS) scavengers (Tao *et al.*, 2015; Kukreja *et al.*, 2005; Cheng & Lin, 2013).

Heat stress is one of the most common abiotic stresses in field. Plants have developed a complex network of interactors that are activated by an impulse of Ca⁺² in the cell, triggering the activation of HEAT SHOCK PROTEINS (HSP), with different functions such as conserving the protein native structure, stabilizing the plasma membrane or activating physiological changes (Finka *et al.*, 2012; Kotak *et al.*, 2007; Mittler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Ohama *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2011).

Since plants respond to both, abiotic and biotic stresses in field, they are subjected to the interactions among both stresses. It has been demonstrated that there are difficulties to predict the outputs of these interactions due to the fact that they are dependent on plant species, the pathogen, the type of abiotic stress and the intensity of the abiotic stress. In fact, it has been reported that some viruses improve their accumulation in abiotic stress conditions whereas other viruses can benefit their hosts during abiotic stress episodes (Makarova *et al.*, 2018; Velázquez *et al.*, 2010; Gharsallah *et al.*, 2020, Moldakimova *et al.*, 2012; Bergès *et al.*, 2018).

Due to the fact that there is a rising number of evidences which suggest that, in a climate change context, there will be an increase in temperature, drought episodes and salted soil areas, all these changes will certainly affect plant viruses spread, transmission and infection (Prasch & Sonnewald, 2013; Aguilar *et al.*, 2017).

TYLCV is the only begomovirus which is ubiquitous and future changes in drought episodes, soil salinity and temperature could change the interactions between TYLCV and its hosts, including crops with high economical value such as tomato. For this reason, it is a key feature to understand how abiotic stresses affect the TYLCV- plant pathosystem.

The main goal of this thesis is to study the interactions between TYLCV and the abiotic stresses of drought (**chapter 1**), salinity (**chapter 2**) and heat (**chapter 3**) in two species of the *Solanaceae* family, *Nicotiana benthamiana* and tomato.

We started studying the interactions between TYLCV infection and drought (**chapter 1**). Drought causes important decreases in crop yield, producing a negative impact in plant physiology, growth and reproduction (Khan *et al.*, 2018).

For this reason, in a context of climate change, it is essential to study the mechanisms that produce tolerance to dehydration stress in order to obtain crops which can tolerate future drought episodes.

Plants have adopted a wide range of strategies to fight against the negative effects of drought, including optimization of the root system to increase water uptake, closing stomata, reducing transpiration, accumulating osmoprotectants, or producing ABA (Fang & Xiong, 2015).

A growing number of studies suggest that viral infections can result in an improved plant tolerance to abiotic stresses, therefore the identification of the molecular mechanisms which cause these effects, could imply the development of new strategies to generate stress-resistant crops (Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2017).

In order to characterize the interaction between drought stress and geminivirus infection in its natural host, *Solanum lycopersicum* (tomato), as well as in the model plant of the *Solanaceae* family, *N. benthamiana*, we performed two different experimental approaches. First, we determined the effect of drought stress on the plant-virus interaction by applying a drought treatment in the early stages of viral infection (5 days post-infection, dpi). Second, we studied the effect that viral infection has on the plant-drought stress interaction by applying a drought treatment in plants with an established infection (21 dpi).

With the aim of determining the effect of drought stress on the plant-virus interaction, we used the following experimental method. 3-week-old *N. benthamiana* and tomato plants (12 plants of each species) were agroinoculated with an infective TYLCV clone (day 0) or with a binary vector without virus (pGWB501) as negative control (mock). Half of these plants began to undergo a drought treatment at 5 dpi that consisted in the suppression of irrigation for three days to keep the substrate of all plants dry. Since 8 dpi, 5 ml of water were added daily to each plant, both infected and mock. Thus, the mock plants received the same water treatment as the infected plants, dividing at 5 dpi into a group of 6 plants under drought treatment and into a group of 6 plants under control treatment. To characterize the infection in each group of plants, their physiological status was evaluated by measuring: (i) the intensity of the drought symptoms every two days and (ii) the amount of virus in the apical leaves at 14 and 21 dpi. For each experiment, three biological replicates were performed using twenty-four plants in each of the replicates (six per condition).

In order to analyze the effect of the viral infection in drought tolerance, a value was assigned to each plant throughout the experiment according to the intensity of the symptoms due to drought stress. Both mock and infected plants showed intense drought stress phenotypes at 21 dpi: fallen leaves, lack of turgor in the leaves, wilting and less growth than their respective controls, with conventional water treatment. The analysis of the symptoms of drought stress did not show significant differences in the appearance, nor in their intensity, between the plants

infected with TYLCV and the mock plants. In the three replicates, all the plants showed drought symptoms at 21 dpi; the intensity of the drought symptoms were similar among the plants of the same replica. On the opposite, the plants under control treatment (without drought stress) maintained the turgor of their leaves, as well as an intense green color throughout the duration of the experiment, showing the plants infected with TYLCV a smaller size than the mock plants under control treatment.

In order to analyze the effect of drought stress on viral accumulation, the relative amount of TYLCV was measured by qPCR, from apical tissue at 14 and 21 dpi. The amount of viral DNA at 21 dpi was significantly lower in plants subjected to drought stress than in those cultivated under control treatment.

After studying the effect of drought on TYLCV infection in *N. benthamiana*, we studied the effect of drought on TYLCV infection in tomato. Tomato plants showed evident symptoms of drought stress at approximately 10 dpi that increased until 21 dpi, showing both the mock group and the TYLCV-infected plants fallen leaves, lack of turgor in the leaves, wilting and less growth than their respective controls (without water stress). Like in *N. benthamiana*, the analysis of drought stress symptoms did not show significant differences in the appearance, nor in their intensity, between TYLCV-infected tomato plants and mock plants. In the three replicates, all the plants showed symptoms of drought stress at 21 dpi.

In the same way as in *N. benthamiana* plants, the amount of TYLCV DNA detected at 21 dpi is significantly lower in tomato plants grown under drought stress than in those grown under control treatment. In fact, there is a statistically significant difference in viral accumulation at 21 dpi in two of the three biological replicates performed. Our data suggest that, in tomato and *N. benthamiana* plants, episodes of drought stress affect the plant-geminivirus interaction, reducing the accumulation of viral DNA.

In order to study if TYLCV infection can affect drought stress response in tomato and *N. benthamiana*, we agroinoculated tomato and *N. benthamiana* plants with the TYLCV infective clone or the vector pGWB501. We subjected half of the infected and uninfected plants (mock) of each species to a drought treatment at 21 dpi. Irrigation was interrupted for 3 days to remove any remaining moisture from the substrate, after which, at 24 dpi, each plant was watered daily with 5 ml of water. The other half of the plants, infected and uninfected, had abundant irrigation and they represent the control group of the experiments. For each experiment, three biological replicates were performed using twenty-four plants in each of the replicates (six per condition).

Surprisingly, TYLCV-infected plants from both species, wilted more slowly after the drought treatment and displayed milder drought-related symptoms, suggesting that the presence of TYLCV promotes drought tolerance.

In order to find out whether one of the virus-encoded proteins is enough to confer the observed enhanced drought response, we subjected transgenic *Arabidopsis thaliana* lines, which constitutively express the viral genes (*C2*, *C3*, *C4*, *V2* and *CP*) from a 35S promoter, to drought treatment and evaluated their performance. Constitutive expression of Rep renders plants non-viable; hence, this protein was not included in this study. Drought did not affect expression of the transgenes. Among the viral proteins tested, only *C4* had an impact on the tolerance of *A. thaliana* to drought: 35S:*C4* transgenic plants stayed green and turgid after water deprivation, while transgenic plants expressing other viral proteins or control plants wilted and eventually died.

C4 localizes both at the plasma membrane and in chloroplasts. Given this double subcellular localization pattern, we wondered whether *C4* is promoting drought tolerance through its specific activity at one of these two locations. In order to answer this question, we tested the drought tolerance of transgenic *A. thaliana* plants expressing a mutated *C4* version, *C4_{G2A}*, which accumulates exclusively in chloroplasts. Despite showing transgene expression levels similar to those observed in 35S:*C4* plants, 35S:*C4_{G2A}* plants displayed sensitivity to drought comparable to that of wildtype plants, indicating that chloroplastic *C4* is not enough to confer drought tolerance and suggesting that its plasma membrane localization is required for this effect.

Transgenic expression of *C4* in *Arabidopsis* has been recently shown to interfere with xylem patterning in the root. With the purpose to determine whether the effect of *C4* on drought tolerance could be uncoupled from its impact on xylem patterning, we evaluated the drought tolerance of *SCR:C4* transgenic *A. thaliana* plants, which express *C4* under the endodermis-specific SCARECROW (*SCR*) promoter. *SCR:C4* plants do not show the same phenotype to those observed in 35S:*C4* plants, but display similar xylem patterning defects. *SCR:C4* plants did not show enhanced drought response, which indicates that the effects of *C4* on xylem patterning and drought tolerance are independent. In fact, the results suggested that drought stress tolerance induced by *C4* requires the expression of *C4* outside of the *SCR* expression domain.

Since ABA is the main hormone regulating drought responses in plants, we decided to assess the effect of *C4* on ABA accumulation and responses by (i) quantifying ABA accumulation in wild-type, 35S:*C4* and 35S:*C4_{G2A}* plants (ii) measuring the expression of ABA-responsive genes in basal and drought conditions in 35S:GFP and 35S:*C4* plants and (iii) evaluating the ability of 35S:*C4* and 35S:*C4_{G2A}* plants to respond to exogenously applied ABA, compared with the wild-type control. Interestingly, *C4*-expressing plants did not differ from wild-type plants in any of the readouts measured. Taken together, our results indicate that *C4* does not significantly affect the ABA pathway and therefore must be promoting drought tolerance in an ABA-independent manner.

Although others studies suggest that virus could improve plant drought stress crops (Xu *et al.*, 2008; Westwood *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2017), the current data suggest that this improvement is caused by an ABA-dependent manner, suggesting that TYLCV modulates the response of the plant interacting with a yet-unknown mechanism.

After having studied the interactions between TYLCV infection and drought stress, we carried on studying the effects of TYLCV infection and salt stress interactions in *N. benthamiana* and tomato (**chapter 2**).

Recent predictions indicate that global temperature and episodes of drought will increase due to climate change. In this scenario, different studies indicate that the salinity of soils will increase during the next decades, affecting the productivity of many crops. Although there are numerous data about the responses of plants to salt stress or viral infections separately, the information about the effect of salt stress and infections, at the same time, is very limited. Moreover, these studies show different results. For example, in *N. benthamiana* plants infected with *Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV), a drastic reduction in viral accumulation has been observed (Moldakimova *et al.*, 2012). On the other hand, pea plants cv. BRS-Maratoa, resistant to *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), show a higher viral accumulation of CPSMV when they are subjected to salinity stress prior to viral infection (24 hours). Furthermore, after 6 days of salinity treatment (dps), the infected plants under salinity stress showed a lower dry weight of roots and leaves than that observed in both uninfected plants under salinity treatment and in infected plants under control conditions. However, when salinity stress is applied simultaneously with infection, no further viral accumulation occurs. When both stresses are applied simultaneously, a reduction in the dry weight of roots and leaves is not observed at 6 dps, compared to uninfected plants and under salinity treatment, although there is a decrease in weight compared to infected plants under treatment control (Varela *et al.*, 2019). There is a research carried out by Gharsallah and collaborators in which they studied the interactions between viral infections and salinity stress in plants resistant to the pathogen. In this study they used two tomato cultivars: tomato plants cv. Mouna HF1, sensitive both to salinity stress and to *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* (TYLCSV), and tomato plants cv. San Miguel, resistant to both salinity stress and TYLCSV. When the authors quantified the amount of virus, it was observed that, regardless of the cultivar, the plants under salinity stress treatment presented a greater accumulation of viral DNA than the infected plants under control treatment (Gharsallah *et al.*, 2020).

In order to study the effect of saline stress on the infection of the TYLCV geminivirus in the model plant *N. benthamiana*, we agroinoculated *N. benthamiana* plants with TYLCV and in very early stages of the infection, the plants were subjected to salt stress. 3-week-old *N. benthamiana* (12 plants) were inoculated with a TYLCV infective clone (day 0) or with a binary vector without

virus (pGWB501) as a negative control (mock). Half of these plants started a salinity treatment at 9 dpi (figure 2.1A). The salinity treatment consisted of supplementation of the irrigation with NaCl. It was started by applying 50 ml of water supplemented with NaCl at 0.8M, increasing the saline concentration twice every two days until it stabilized at a NaCl concentration of 2M at 12 dpi, a concentration that would remain until 21 dpi. Thus, the mock plants received the same water treatment as the infected plants, dividing them at 9 dpi into a group of 6 plants under salinity treatment (NaCl) and a group of 6 plants under control treatment (H₂O, without salt stress). Control plants received the same volume of water without NaCl as plants under salt stress. To characterize the infection in each group of plants, their physiological state was evaluated by quantifying: (i) the intensity of the salt stress symptoms every two days, (ii) the growth of the plants, measuring the height of each plant from the neck of root to apex at 14 and 21 dpi, (iii) the amount of virus in the apical leaves at 14 and 21 dpi, and (iv) the efficiency of photosystem II (PSII) at 14 and 21 dpi. For each experiment, three biological replicates were performed using twenty-four plants in each of the replicates.

No significant differences were observed in the severity of the symptoms of salinity stress between the infected and the mock plants under treatment by saline stress; both infected plants and mock plants showed symptoms of salt stress with the same intensity at 21 dpi. While the control plants maintained the turgor of their tissues and an intense green color, all the plants under saline stress treatment (infected and mock) lost turgor.

Since salinity stress affects photosynthetic efficiency (Arif *et al.*, 2020), a non-destructive method that allows to quantify plant stress under salinity conditions is the measurement of photosystem II (PSII) efficiency. Both, plants with mock-NaCl and TYLCV-NaCl, showed a decrease in PSII efficiency at 21 dpi, compared to the mock-control and TYLCV-control plants respectively. However, no significant and consistent differences were detected between mock and infected plants. Therefore, our data suggest that all plants under salt stress treatment were homogeneously stressed.

Growth analysis showed a differential effect of salt stress compared to the control treatment; plants under saline stress showed less growth than control plants. The effect of salt stress was similar in mock and infected plants; plants under salinity stress presented a similar growth, regardless of whether they belong to the group of infected or mock plants.

Finally, the viral load of the infected *N. benthamiana* plants was analyzed. The amount of virus detected during the infection of *N. benthamiana* plants did not show statistically significant changes between plants under salinity stress treatment and control plants at 14 dpi. However, the amount viral DNA was significantly lower in salt stress plant group than in control plants group at 21 dpi.

To continue our research, we studied the effect of salt stress on the infection of the TYLCV in tomato. We followed an approach similar to the one used in *N. benthamiana*; we agroinoculate tomato plants with TYLCV, subjecting the plants to salt stress in the early stages of infection. 3-week-old tomato plants (12 plants) were agroinoculated with an infective TYLCV clone (day 0) or with a binary vector without virus (pGWB501) as a negative control (mock). Half of these plants began to undergo a salinity treatment at 9 dpi. The salinity treatment consisted of the supplementation of NaCl at irrigation, in the same way as it was done in *N. benthamiana*. The salt stress treatment was started by applying 50 ml of water supplemented with NaCl at 0.8M, increasing the saline concentration twice every two days until it stabilized at a NaCl concentration of 2M at 12 dpi, a concentration which would be maintained until 21 dpi. In this way, the mock plants received the same water treatment as the infected plants, dividing at 9 dpi into a group of 6 plants under salinity treatment (NaCl) and in a group of 6 plants under control treatment (H₂O, without stress saline). Control plants received the same volume of water without NaCl as plants under salt stress. To characterize the infection in each group of tomato plants, their physiological status was evaluated by measuring: (i) the growth of the plants, for this the height of each plant from root neck to apex at 14 and 21 dpi, (ii) the amount of virus in the apical leaves at 14 and 21 dpi and (iii) the efficiency of the PSII at 14 and 21 dpi.

No significant differences were observed in the severity of the salinity stress phenotype between infected tomato plants and mock plants under saline stress treatment; both infected and mock plants showed symptoms of salt stress with the same intensity at 21 dpi. While the control plants (infected and mock) maintained the turgor of their tissues and an intense green color at the end of the experiment, all plants under salt stress treatment (infected and mock) lost turgor, their leaves turned yellow and they lost the ability to stand upright.

To evaluate the stress of the plant, the efficiency of the PSII was analyzed. We observed a dramatic decrease in the efficiency of the PSII at 21 dpi in the mock-NaCl and TYLCV-NaCl plants compared to the mock-control and TYLCV-control plants. No consistent differences in PSII efficiency were observed between mock plants and plants infected with TYLCV under saline stress treatment. This result suggested that all tomato plants under salt stress treatment were exposed to a similar salt stress intensity.

The growth data analysis showed that infected tomato plants under control conditions, developed a greater growth than plants under salinity stress. The effect of salt stress was similar in mock and TYLCV infected plants. The same as in *N. benthamiana* plants, tomato plants under salinity stress showed lower growth, regardless of whether they belong to the group of infected plants or mock plants, confirming that salinity stress masked TYLCV growth inhibition.

Finally, the viral load of the infected tomato plants was analyzed. The effect of salinity on viral load during tomato infection was similar to that observed in infection in *N. benthamiana*, we observed a drastic decrease in viral accumulation at 21 dpi in salt stressed tomato plants, in comparison with plants under control treatment. These results suggested a negative effect of salinity stress on TYLCV infection in tomato plants and *N. benthamiana* plants.

The experimental design followed to study the effect of TYLCV infection on the response to saline stress in *N. benthamiana* is similar to previous experiments. We agroinoculated *N. benthamiana* plants with TYLCV and, in late stages of infection, the plants were subjected to salt stress. 3-week-old *N. benthamiana* plants (12 plants) were agroinoculated with a TYLCV infective clone (day 0) or with a binary virus-free vector (pGWB501) as a negative control (mock). Half of these plants started the salinity treatment at 15 dpi. The salinity treatment consisted of the supplementation of NaCl in irrigation. The salinity stress treatment was started by applying 50 ml of water supplemented with NaCl at 0.8M, gradually increasing the saline concentration to 1.6M (17 dpi) and 2M (20 dpi). From 21 dpi, the NaCl concentration was maintained at 2M until 28 dpi (Figure 2.11B). Mock plants received the same water treatment as the infected plants, dividing at 15 dpi into a group of 6 plants under salinity treatment (NaCl) and in a group of 6 plants under control treatment (H₂O, without salt stress). Control plants received the same volume of water without NaCl as plants under salt stress. To characterize the response to salinity stress in each group of plants, their physiological state was evaluated by measuring: (i) the growth of the plants, measuring the height of each plant from the root neck to the apex at 21 and 28 dpi, (ii) the amount of virus in the apical leaves at 21 and 28 dpi and (iii) the efficiency of the PSII at 21 and 28 dpi.

Surprisingly, plants infected under salinity treatment developed less intense salinity stress symptoms than mock plants. While the control plants (infected and mock) maintained the turgor of their tissues and an intense green color at the end of the experiment, the mock plants under salt stress treatment lost turgor, their leaves turned yellow and they showed an intense curling of their leaves. However, the infected plants under salinity treatment presented these symptoms to a lesser extent, their leaves maintaining a greater turgor and a more intense green color. These results were maintained in two of the three replicates, suggesting that TYLCV infection conferred greater tolerance to salinity.

The growth analysis showed, in general, a differential effect of saline stress compared to the control treatment; plants under saline stress showed less growth than control plants. It should be noted that plants under salinity stress presented a similar growth, regardless of whether they belong to the group of infected plants or mock plants.

Then, we decided to study the amount of virus in control and salt stressed plants. All plants showed significant amounts of viral DNA and typical symptoms of TYLCV infection. In all the three replicates and both at 21 dpi and 28 dpi there was a tendency showing less virus in the salt treated plants than in the control ones. This reduction in viral amount was statistically significant in R-I at 28 °C and in R-III at 21 °C.

Finally, we observed the efficiency of PSII. The same that in previous experiments, salt stressed plants showed a decrease in PSII efficiency (mock and infected) in comparison with control plants. These results suggested that, if TYLCV infection confers salt stress tolerance, the effect of this tolerance is non-related to PSII efficiency nor growth.

After studying the effect of TYLCV infection in salt stress response in *N. benthamiana*, we decided to study his interaction in tomato. We performed a similar approach to that used in *N. benthamiana*. We agroinoculate tomato plants with TYLCV, subjecting the plants to salinity stress in late stages of infection. The 3-week-old tomato plants (12 plants) were agroinoculated with an infective TYLCV clone (day 0) or with a binary vector without virus (pGWB501) as a negative control (mock). Half of these plants started a salt stress treatment at 15 dpi (figure 2.16A). The salt stress treatment consisted of the supplementation of the irrigation with NaCl. It was started by applying 50 ml of water supplemented with NaCl at 0.8M, gradually increasing the saline concentration to 1.6M (17 dpi), 2M (20 dpi) and 4M (21 dpi), a concentration that would be maintained until 28 dpi. Mock plants received the same water treatment as the infected plants, dividing at 9 dpi into a group of 6 plants under salinity treatment (NaCl) and in a group of 6 plants under control treatment (H₂O, without stress saline). Control plants received the same volume of water without NaCl the same as plants under salt stress. To characterize the infection in each group of plants, their physiological state was evaluated by measuring: (i) the growth of the plants, measuring the height of each plant from the root neck to the apex at 21 and 28 dpi, (ii) the amount of virus in the apical leaves at 21 and 28 dpi and (iii) the efficiency of photosystem II (PSII) at 21 and 28 dpi.

No significant differences were observed in the severity of the symptoms of salt stress between the infected plants and the mock plants under treatment by saline stress; both infected plants and mock plants, showed intense symptoms of salinity stress at 28 dpi. While the control plants (infected and mock) maintained the turgor of their tissues and an intense green color at the end of the experiment, all the plants under salt stress treatment (infected and mock) lost turgor, their leaves turned yellow and they lost the ability to stand upright, independent of they were in the mock or infected plant group.

The growth analysis also showed a clear effect of salinity stress compared to the control treatment. Salt stressed plants showed a decrease in growth compared

with control plants. Both, mock and TYLCV infected plants, presented an intense decrease of growth or a complete inhibition of growth in comparison with their respective plant groups control.

The effect of salinity on viral load during tomato infection is similar to that observed in infection in *N. benthamiana*; all though we did not observe an effect of salt treatment in viral accumulation at 21 dpi, a tendency was observed at 28 °C, with one of the replicates having a statistically significant reduction in tomato plants under salt stress treatment compared to control plants.

Finally, the efficiency of the PSII of the plants was studied in order to evaluate the degree of stress to which they were subjected. As in *N. benthamiana*, the mock-NaCl and TYLCV-NaCl tomato plants showed a decrease in PSII compared to the mock-control and TYLCV-control plants. Similarly, no statistically significant differences were found in the efficiency of PSII between infected plants and mock plants.

Taken together, our results indicate that, meanwhile *in N. benthamiana*, TYLCV infection could improve plant salt stress tolerance, in tomato TYLCV do not confer any improvement in plant salt stress response. Moreover, the effect of salt stress is different depending on the stage of the infection; salt stress episodes cause an strong inhibition of TYLCV accumulation at early stages of the infection (9 dpi), with no effect or a milder effect on viral load in later stages (15 dpi) of the infection.

In order to complete an analysis of principal abiotic-biotic stresses interactions in the TYLCV pathosystem during a context of climate change, we decide to study the interactions between heat stress and TYLCV infection (**chapter 3**). As we have mentioned before, current predictions suggest a future increase in global temperature (IPCC, 2019); for this reason, it is of vital importance for global food security to know the interactions between high temperature stress and viral infections in crops. Previous studies indicate that high temperature stress could cause changes in different viral species, modifying their ability to establish infections and to spread the disease among crops (Anfoka *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2016; Dáder, *et al.*, 2016; del Toro *et al.*, 2019).

In fact, current studies have presented different results about how heat stress impacts in virus infection by showing a diverse of effects depending of the virus and the intensity and duration of the high temperature stress treatment (Aguilar *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2016; Makarova *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2016).

Although its main host is tomato, TYLCV infects other horticultural crops such as pepper or cassava, and model plants such as *N. benthamiana* or *A. thaliana*. Therefore, TYLCV is an excellent model to study how heat stress modulates virus-plant interaction. The effect of temperature on TYLCV infection in tomato has been the subject of a previous study carried out by Anfoka and collaborators (Anfoka *et al.*, 2016). In the study they compared the infection of two lines

(susceptible and resistant to TYLCV) of plants infected with TYLCV by *Bemisia tabaci*, grown under two temperature conditions: (1) 22–25°C / 18–20°C, day / night and (2) 40–45°C / 20–25°C, day / night. The results indicate that the plants of the two lines (resistant and susceptible) grown at the higher temperature accumulated a greater amount of virus.

With the aim of studying the effect of high temperature stress on TYLCV infection in tomato we used the following experimental method. As the optimal growth temperature is higher than *N. benthamiana*, we carried out the experiments to determine the effect of temperature on TYLCV infection at two temperatures, 24°C (control) and 35°C.

Seedlings of three-to-four-week grown at 24°C under long day conditions (16 hour of light/ 8 hours of darkness) were infiltrated in the axillary buds with a culture of *A. tumefaciens* containing an infective clone of TYLCV or the binary vector without virus (pBINX', mock). Then, all the plants (sixty) were kept for three days at 24°C, allowing the transfer of the *A. tumefaciens* T-DNA to be carried out in all the plants at the same temperature. On the third day post-inoculation (dpi), each group of plants agroinoculated with TYLCV or pBINX' (mock), were subdivided into two groups: a group which was subjected to a heat stress treatment that was applied increasing the temperature at a rate of 4°C per day until reaching 35°C and other group that was kept at 24°C (control). To avoid differences due to possible water stress, a controlled irrigation was carried out, in order to maintain a homogeneous distribution of water in all the plants. The plants were kept under these conditions for four weeks after infection.

To characterize the infection in each group of plants, growth was evaluated by measuring: (i) the intensity of the symptoms every two days, (ii) the amount of virus in the apical leaves at 14, 21 and 28 dpi and (iii) the height of each plant from the root neck to the apex and the number of new leaves developed at 28 dpi from the point of agroinfiltration. For each experiment, three biological replicates were performed using approximately sixty plants in each of the replicates (fifteen per condition).

Although no significant changes were detected in the development of symptoms, the amount of virus that accumulates at 21 and 28 dpi was significantly higher in tomato plants grown at 35°C than in plants cultivated at 24°C. Interestingly the difference in virus DNA accumulation was not reflected in differences in intensity and/or symptoms emergency shown by plants grown at both temperatures.

The analysis of the growth of the tomato plants and the number of new leaves shows a differential behavior according to the temperature tested. Non-infected mock plants grown at 24°C show a higher growth than plants cultivated at 35°C. When the number of new leaves formed from the point of agroinfiltration is analyzed, in mock plants an effect similar to that which occurs with stem growth

is observed: at 35°C, there is a slight decrease in the number of new leaves compared to the control at 24°C. In general, infected plants grown at 35°C show lower stem growth than infected plants grown at 24°C. Moreover, TYLCV infected plants have a less growth than mock plants at the corresponding temperature. Thus, virus accumulation in plants at 28 dpi correlates with a decrease in growth at 35°C. In other words, there is a negative effect on the size of the plant caused from the infection by TYLCV, which is additive to the effect of the temperature at 35°C. We also observed that the effect of the infection on the number of new leaves is also negative.

Next, we decided to study the effect of temperature on the TYLCV infection in *N. benthamiana*. In each replicate, sixty three-to-four week old plants grown at 21 °C under long day conditions (16 hours light/8 hours dark) were infiltrated into the axillary buds with a culture of *A. tumefaciens* containing an infective clone of TYLCV or the binary vector without virus (pBINX', mock). Then, all the plants were kept for three days at 21°C so that the transfer of the *A. tumefaciens* T-DNA was carried out in all the plants at the same temperature. At 3 dpi, each group of plants agroinoculated with TYLCV or pBINX' (mock), were subdivided into two groups, a group to which a heat stress treatment was applied increasing the temperature at a rate of 4°C per day until reaching 28°C or 35°C and another group that was kept at 21°C. To avoid differences due to possible water stress that the plants subjected to high temperatures could suffer, a controlled irrigation was carried out, in order to maintain a homogeneous distribution of water in all the plants. The plants were kept under these conditions for four weeks after infection.

To characterize the infection in each group of plants, growth was evaluated by measuring: (i) the intensity of the symptoms every two days, (ii) the amount of virus in the apical leaves at 14, 21 and 28 dpi and (iii) the height of each plant from the root neck to the apex and the number of new leaves developed at 28 dpi from the point of agroinfiltration. For each experiment, three biological replicates were performed using approximately sixty plants in each of the replicates (fifteen per condition). The results of each replica are displayed independently.

The analysis of the symptoms does not show significant differences in the appearance, nor in their intensity, between the plants grown at 21°C and those grown at 28°C. However, in plants grown at 35°C a significant reduction in the intensity of the symptoms was detected. Although the symptoms appear at the same time (10 dpi) in the two temperatures (21°C and 35°C), the symptoms intensify in plants grown at 21°C until reaching the maximum values used in the scale, while in plants cultivated at 35°C the increase in the intensity of the symptoms is lower and does not reach the maximum level of symptom intensity in any case.

The amount of virus accumulated in infected plants shows a significant correlation with the intensity of the symptoms. The temporal dynamics of virus accumulation differ between 21°C and 28°C. At 21°C an increase in viral DNA accumulation is detected during early steps of infection, reaching the maximum at the last point analyzed (28 dpi). On the opposite, it is observed that in plants kept at 28°C, the maximum accumulation of virus DNA occurs at 21 dpi instead of 28 dpi. Thus, at 21 dpi the viral load in plants grown at 28°C tends to be higher than in plants grown at 21°C which indicates a positive effect of the increase in temperature on the virus propagation capacity, similar to that observed in tomato plants. The comparison in the amount of virus between plants grown at 21°C and 35°C correlates with the difference observed in the intensity of symptoms: plants infected and grown at 35°C have fewer symptoms and less quantity of virus than plants infected and kept at 21°C.

The analysis of the growth of the plant and the number of new leaves shows a differential behavior in the mock plants at the two temperatures tested, 28°C and 35°C. Uninfected plants grown at 28°C have a higher mean increase in height than those grown at 21°C. Interestingly, uninfected plants grown at 35°C do not show significant differences in stem growth with those cultivated at 21°C. However, we do not observe this effect in infected plants. Infected plants at 28°C, 35°C and 21°C show a similar growth (we observed differences only in one replicate)

When the results of the number of new leaves developed from the point of agroinfiltration in mock plants are analyzed, an effect similar to that which occurs with stem growth is observed: at 28°C, there is a significant increase in the number of new leaves formed compared with the control at 21°C, and the plants grown at 35°C. Interestingly, we observe a significant increase of new leaves in infected plants at 28°C in comparison with infected plants at 21°C. Infected plants at 35°C show a trend to develop more new leaves than infected plants at 21°C, but this difference was significant only in one replicate.

These results suggest that the moderate increase (28°C) in temperature in *N. benthamiana* causes a positive effect on the spread of the virus, similar to the results obtained in tomato plants, but a greater temperature increase (35°C) triggers the inhibition of the development of infection with no effect in the phenotype of the plant.



Introducción general

1. Geminivirus

1.1. Familia Geminiviridae: importancia agronómica y taxonomía

Los Geminivirus (familia *Geminiviridae*) constituyen una familia de virus sin envoltura que poseen genomas de DNA monocatenarios (*single-stranded*, ssDNA) de estructura circular que infectan cultivos de gran importancia agroeconómica, plantas ornamentales y semillas. Las infecciones por geminivirus causan elevadas pérdidas anuales de millones de dólares en todo el mundo, y especialmente en zonas tropicales, subtropicales y áreas templadas. Estos patógenos vegetales representan un serio problema para el cultivo de una amplia variedad de cultivos como judía, mandioca, maíz, diversas cucurbitáceas, pimiento y tomate (Figura 1) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Jeske, 2009; Navas-Castillo *et al.*, 2011), causando algunas de las enfermedades virales de mayor importancia, como: la enfermedad del rizado amarillo del tomate (*tomato yellow leaf curl disease*, TYLCD), una de las enfermedades virales más ampliamente diseminadas alrededor del mundo, *Beet curly top disease*, y *Vean golden mosaic disease*, las cuales producen grandes pérdidas en el continente americano en remolacha y habichuela, respectivamente, o *Maize streak disease*, *Cassava mosaic disease*, y *Cotton leaf curl disease*, en áreas de África y Asia (Shepherd 2010, Legg y Fauquet 2004, Briddon 2003a). De hecho, las mayores pérdidas producidas por enfermedades causadas por geminivirus se dan en países en vías de desarrollo como República Dominicana, Cuba, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Venezuela y Brasil, donde las pérdidas oscilan entre el 20% y el 100% de la producción (Rybicki, 2015; Yadira *et al.*, 2011). Además, en India se estiman pérdidas de 300 millones de dólares por daños en cosechas de leguminosas debidas a epidemias de geminivirus (Varma & Malathi, 2003).

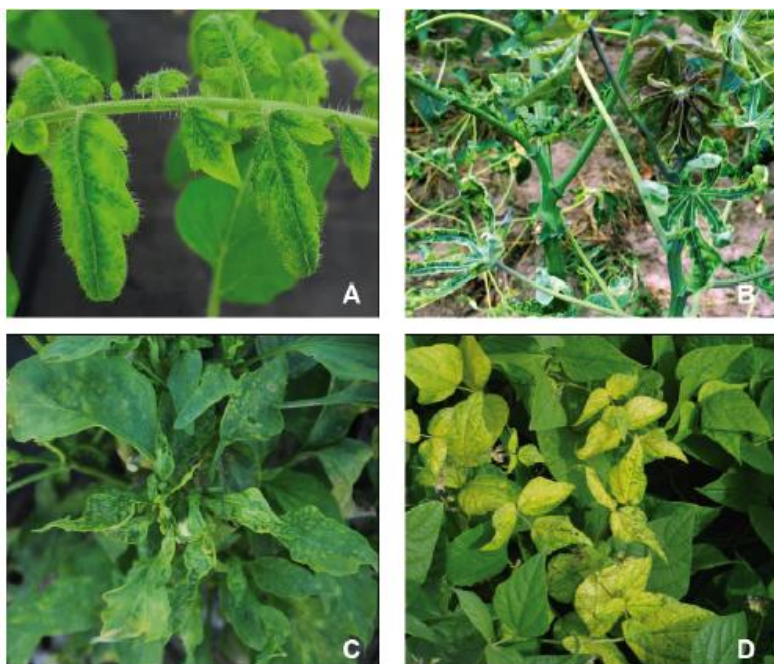


Figura 1. Síntomas de enfermedades causadas por virus en plantas. Síntomas inducidos por Geminivirus en (A) tomate, (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (B) mandioca (*East african cassava mosaic virus*, EACMV), (C) pimiento (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV), y (D) habichuela (*Bean calico Mosaic*, BCaMV). Las imágenes fueron amablemente cedidas por Dr Jose T. Ascencio-Ibáñez (B) y Dr Jesus Mendez-Lozano (C y D). La figura está tomada del libro de Wu *et al.*, 2021 (no publicado).

En el área mediterránea tiene gran importancia agronómica la enfermedad causada por el rizado amarillo del tomate (TYLCD). El primer brote de TYLCD ocurrió en Israel en 1939, pero no fue hasta 1959, momento en el que una severa epidemia destruyó el 100% de los cultivos de tomate, cuando el complejo TYLCD apareció como una nueva amenaza para la producción de alimentos (Cohen & Antignus, 2011). En 1987 se aisló (Czosnek *et al.*, 1987) y en 1991 se secuenció el genoma (Navot *et al.*, 1991) del principal agente causal de este complejo patogénico; *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), que es la única especie de geminivirus que se encuentra de forma ubicua a nivel global (García-Arenal & Zerbini, 2019). La especie TYLCV presenta diversos aislados, sin embargo, el de mayor importancia en el área mediterránea y en zonas templadas y subtropicales es el aislado ISRAEL (IL), que es el aislado caracterizado en esta tesis doctoral. Entre los síntomas provocados por TYLCV-IL se encuentra la curvatura y amarilleamiento de hojas, reducción del crecimiento y la biomasa, aborto floral y un menor desarrollo y aparición de frutos (Moriones & Navas-Castillo, 2000) (figura 2).



Figura 2. Síntomas de TYLCV **(A)** En *N. benthamiana* TYLCV produce amarilleamiento de las hojas, abarquillamiento y disminución del tamaño de la hoja. Además, produce una reducción en el crecimiento de la planta y abortos florales. **(B)** En tomate, TYLCV produce un intenso amarilleamiento de la hoja, un completo rizado y una drástica disminución del tamaño de la hoja. También reduce el crecimiento de la planta e inhibe la aparición de flores. La fotografía A fue realizada con una cámara Nikon COOLPIX P250. La fotografía B ha sido modificada de Osei *et al.*, 2012.

Los geminivirus son transmitidos por varios tipos de insectos, como la mosca blanca, los cicadélidos, los membrácidos y los áfidos (Zerbini *et al.*, 2017, Varsani *et al.*, 2017) y su aparición se ha asociado con un incremento en la predominancia de sus insectos vectores, especialmente la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Navas-castillo *et al.* 2011, Chen *et al.*, 2019). Puesto que los geminivirus comparten la arquitectura de la cápside, el tamaño y estructura del genoma y una característica región intergénica (*Intergenic Region*, IR) (descrita en la siguiente sección, 1.2), las distinciones a nivel de género se hacen en base a la organización genómica, similitud de secuencia, insecto vector y rango de hospedador, distinguiendo el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) nueve géneros: *Begomovirus*, *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Grabovirus*,

Mastrevirus, *Turncurtovirus*, *Topocuvirus*, *Capulavirus*, y *Eragrovirus* (Zerbini *et al.*, Varsani *et al.*, 2017) (Tabla 1). Todos los géneros presentan genomas monopartitos excepto el género *Begomovirus*, cuyos miembros pueden poseer tanto un genoma monopartito como bipartito (Tabla 1). El género *Begomovirus*, con más de 400 especies aceptadas actualmente (revisado en Zhao *et al.*, 2019), es el género de mayor tamaño, y el género mejor estudiado junto con los géneros *Curtovirus* y *Mastrevirus*. La organización genómica de los tres géneros se encuentra representada en la figura 3, mientras que una descripción detallada de los nueve géneros se puede encontrar en la bibliografía (Zerbini *et al.*, Varsani *et al.*, 2017).

Tabla 1. Clasificación de la familia *Geminiviridae*.

Género	Genoma	Vector	Rango de hospedador	Satélites	Número de especies*	Especie tipo
Becurtovirus	Monopartito	Cicadélidos	Dicotiledóneas	No	3	<i>Beet curly top Iran virus</i>
Begomovirus	Mono- o Bipartito	Mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>)	Dicotiledóneas	Sí (alfa, beta, delta)	424	<i>Bean Golden Mosaic virus</i>
Capulavirus	Monopartito	Áfidos	Dicotiledóneas	No	4	<i>Euphorbia caput-medusae latent virus</i>
Curtovirus	Monopartito	Cicadélidos	Dicotiledóneas	No	3	<i>Beet curly top virus</i>
Eragrovirus	Monopartito	ND	Dicotiledóneas	No	1	<i>Eragrostis curvula streak virus</i>
Grabovirus	Monopartito	Membrácidos	Dicotiledóneas	No	3	<i>Grapevine red blotch virus</i>
Mastrevirus	Monopartito	Cicadélidos	Mono- y dicotiledóneas	Sí (alfa, beta)	41	<i>Maize streak virus</i>
Topocuvirus	Monopartito	Membrácidos	Dicotiledóneas	No	1	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>
Turncurtovirus	Monopartito	Cicadélidos	Dicotiledóneas	No	3	<i>Turnip curly top virus</i>

ND. No identificado

* Virus Taxonomy 2019 (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae)

1.2. Estructura y organización del genoma de los geminivirus

Los geminivirus han sido extensamente caracterizados a nivel molecular, siendo uno de los virus de plantas más estudiados. Presentan el genoma más reducido de todos los virus conocidos con capacidad de replicación independiente, siendo de un tamaño de aproximadamente 3 kb, pero variando en torno al 2,5-5,2 kb

(Zerbini *et al.*, 2017). El genoma de los geminivirus consta de uno (monopartitos) o dos (bipartitos) componentes de DNA, los cuales son encapsidados individualmente en partículas gemelas icosaédricas incompletas o hemicápsides (Noris *et al.*, 1998), cada una formada por 110 unidades de la proteína de la cápside (CP) que constituyen un total de 22 capsómeros pentagonales (Varsani *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). El tamaño total de la cápside es de 18x30 nm y mediante criomicroscopía electrónica se ha conseguido describir la estructura de la cápside con una precisión de 3,3 Å (Hesketh *et al.*, 2018). En geminivirus bipartitos, ambos componentes, nombrados como DNA-A y DNA-B, son necesarios para la infección sistémica de la planta. Todos los geminivirus presentan al menos una región intergénica (*Intergenic Region*, IR, o *Large Intergenic Region*, LIR) de aproximadamente 300 pb, que contiene el origen de replicación junto a una estructura de bucle conservada que es necesaria para el corte y unión del DNA viral durante la replicación (Laufs *et al.*, 1995). Los miembros de algunos géneros, como los Mastrevirus, también contienen una pequeña región intergénica (*Short Intergenic Region*, SIR), que incluye señales requeridas para el primer paso de la replicación viral (Donson *et al.*, 1984; Saunders *et al.*, 1992). La IR/LIR también incluye promotores de la RNA-polimerasa II que solapan con los marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, ORFs) del virus, orientados bidireccionalmente en la hebra en el sentido del virión (en colores amarillos, marrón y magenta en la figura 3) y en el sentido complementario (en tonos azules, rojo y verde en la figura 3). Además, se han descrito promotores y elementos reguladores fuera de la IR en algunos geminivirus (revisado en Borah *et al.*, 2016). Los geminivirus codifican entre cuatro y ocho proteínas multifuncionales relacionadas con la replicación viral, el movimiento, la transmisión y la patogénesis (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Fondong, 2013; Luna y Lozano-Durán 2020). Debido a su limitado tamaño, estos virus necesitan utilizar obligatoriamente la maquinaria celular de su hospedador para completar su ciclo de vida, por lo que las proteínas virales interactúan con un amplio rango de proteínas de la planta durante la infección, interfiriendo con una plétora de rutas de señalización y metabólicas de la planta (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2020). El componente DNA-A de los virus bipartitos codifica para proteínas asociadas con la replicación del DNA viral, la transcripción, supresión del silenciamiento génico, encapsidación y transmisión por el vector, denominadas Rep (*Replication-associated protein*), Ren (*Replication Enhancer protein*), TrAP (*Transcriptional Activator Protein*), C4, y CP (*Coat Protein*) (figura 3). Por otro lado, el componente DNA-B codifica tan sólo para dos proteínas, MP (*Movement Protein*) y NSP (*Nuclear Shuttle Protein*), las cuales están relacionadas con el movimiento intercelular e intracelular del virus, respectivamente. El genoma de los geminivirus monopartitos es homólogo

al DNA-A de los geminivirus bipartitos, y dos de sus proteínas (CP y V2) están relacionadas con el movimiento viral (descritas en la sección 1.5) (figura 3).

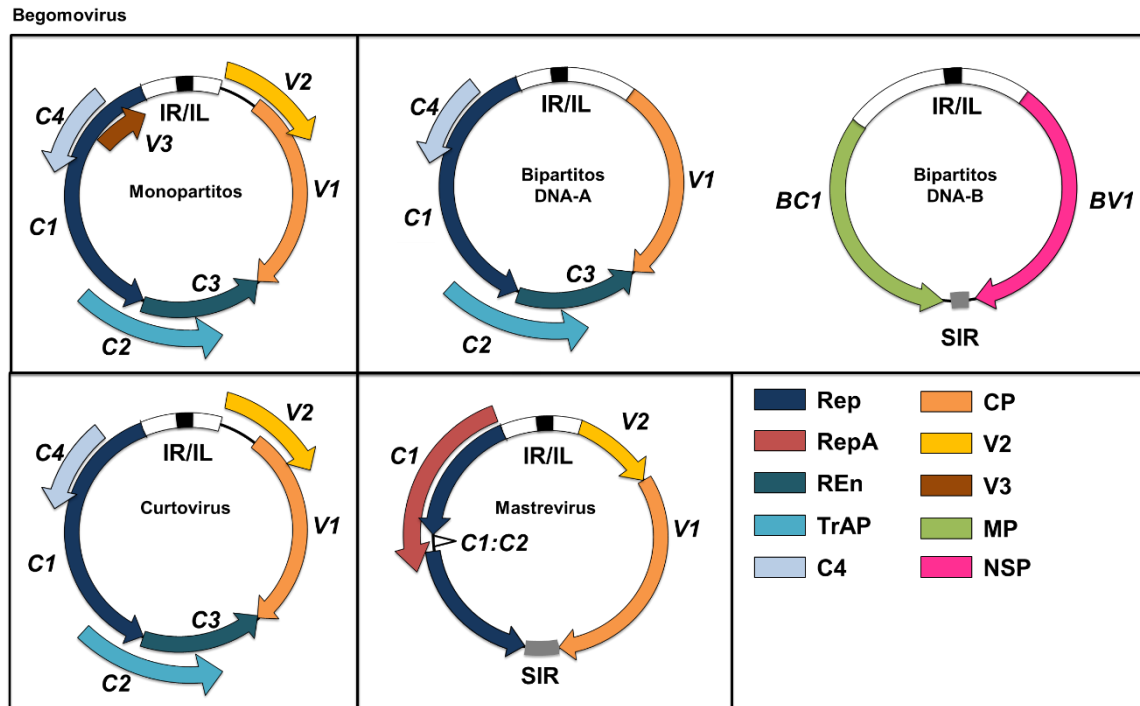


Figura 3. Organización genómica de los geminivirus. Se ha representado la organización genómica de los tres géneros de geminivirus mejor caracterizados: *Begomovirus*, *Curtovirus*, y *Mastrevirus*. Los ORFs (C1, C2, C3, C4, V1, V2... etc.) se muestran según un código de colores en base a sus productos génicos: Rep, la proteína asociada a la replicación; REn, la proteína potenciadora de la replicación, TrAP, la proteína de activación transcripcional; CP, la proteína de la cápside; NSP, la proteína de transporte al núcleo, MP, la proteína del movimiento. C4 y V2 son proteínas nombradas después del gen codificante. Los elementos en *cis* relacionados con la replicación del DNA están indicados: IR, la región intergénica, LIR, la región intergénica larga, SIR, la región intergénica corta, y la estructura en forma de bucle, que se encuentra incluida en el origen de replicación.

1.3. Ciclo de vida de los geminivirus

1.3.1. El virus y la planta hospedadora

En el campo, la infección por geminivirus es iniciada cuando un insecto portador de viriones se alimenta del floema de la planta hospedadora. El genoma viral ssDNA es liberado al desensamblarse la cápside, siendo la cadena complementaria polimerizada a partir de la cadena del virión por DNA polimerasas celulares desconocidas hasta la fecha y empaquetado por los nucleosomas celulares formando un minicromosoma. A continuación, el dsDNA es replicado por el mecanismo de replicación por círculo rodante (*Rolling-Circle Replication*) para formar nuevas moléculas circulares de ssDNA que serán encapsidadas por la proteína CP, formando los viriones (Morris-Krsinich *et al.*, 1985, Boulton *et al.*, 1989). La molécula viral de dsDNA, también denominada

“intermediario de replicación”, sirve de molde para iniciar otro mecanismo de replicación dependiente de recombinación (RDR, recombination-dependent replication) (Jeske *et al.*, 2001) a partir del cual también se generarán moléculas circulares de ssDNA que pueden pasar de nuevo a dsDNA y ser replicadas de nuevo por RCR o RDR. La proteína Rep es la única proteína viral esencial para la replicación ya que es responsable de la iniciación y terminación de la replicación por círculo rodante, cortando y ligando el DNA viral en una secuencia conservada de la zona IR/LIR. Sin embargo, la replicación viral es dependiente de la maquinaria de replicación de la planta ya que ninguna de las proteínas virales tienen función de DNA polimerasas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Aguilar *et al.*, 2020) (figura 4) (se hablará más detalladamente de este proceso en la sección 1.5.1). A partir del minicromosoma viral formado por el dsDNA, la RNA-polimerasa II genera transcritos de ambas cadenas virales que permitirán la expresión de las proteínas virales en el citoplasma (Borah *et al.*, 2016) (figura 4).

Como la replicación del DNA viral ocurre en el núcleo de células infectadas, la subsecuente infección sistémica implica el transporte del DNA viral a través de

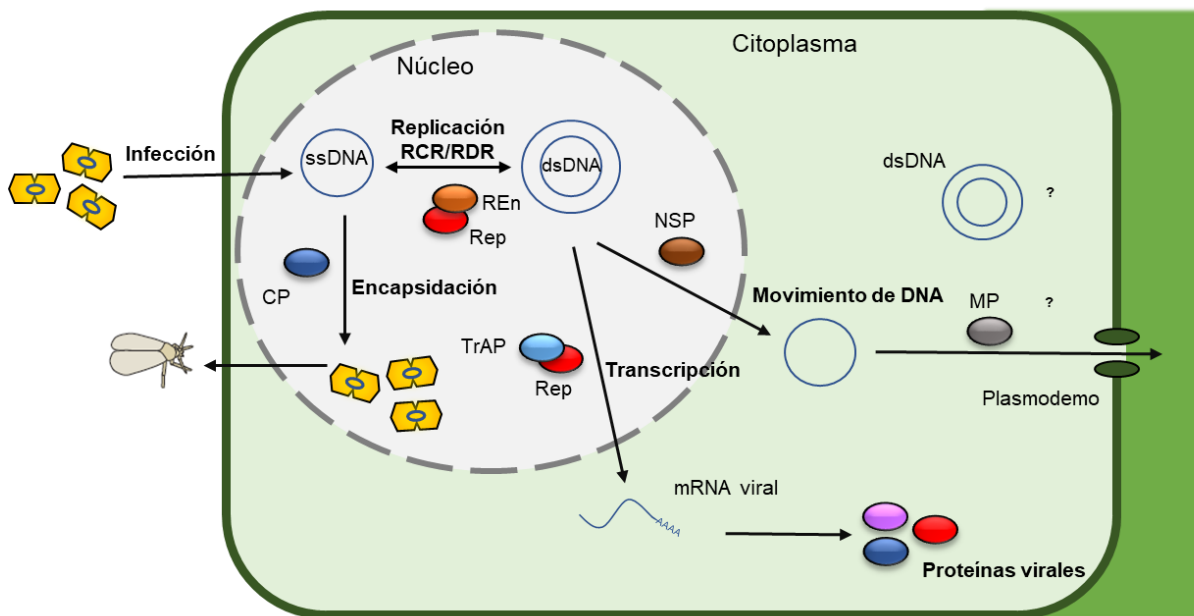


Figura 4. El ciclo de vida de los geminivirus. La infección comienza en una célula vegetal cuando una molécula de DNA monocatenario (ssDNA) es liberada desde el virión y copiada para generar una molécula de DNA de doble cadena (dsDNA). El dsDNA es transcrito por la RNA-polimerasa II del hospedador, permitiendo la producción de la proteína iniciadora de la replicación (Rep). Rep inicia la replicación siendo su actividad potenciada por C3. La molécula de ssDNA hija es convertida en dsDNA, ensamblándose en el nucleosoma viral (dsDNA). Rep inhibe su propia transcripción, lo que conduce a la activación de la expresión de la proteína iniciadora de la transcripción (TrAP), la cual activa la expresión tanto de la proteína de la cápside (CP), como de la proteína transportadora del núcleo (NSP). La molécula de ssDNA circular puede ser encapsulada por CP dando lugar a nuevos viriones, los cuales pueden ser adquiridos por la mosca blanca durante su alimentación. Además, NSP se puede unir al DNA viral, transportándolo a través de la envoltura nuclear, mientras que la proteína del movimiento (MP) dirige el transporte a través de los plasmodesmos. Es conocido que el DNA viral se puede transportar tanto como ssDNA como dsDNA.

dos barreras celulares: la envoltura nuclear y la pared celular (figura 4). Para el transporte célula-célula del DNA viral (vDNA), se han sugerido dos mecanismos que difieren en la composición del complejo DNA-proteína translocado a las células cercanas; el modelo de “carrera de relevos” (*relay race*) y el modelo de “patinaje en pareja” (*couple-skating*). En el modelo de “carrera de relevos” la proteína NSP participa en la translocación del vDNA desde el núcleo al citoplasma, siendo posteriormente reemplazada por MP, la cual dirige el movimiento del vDNA de célula a célula a través del plasmodesmo (Noueiry *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998, 2005). En el modelo de “patinaje en pareja”, la proteína MP permite el transporte núcleocitoplasmático del complejo vDNA-NSP e induce su translocación a la siguiente célula a través de la inducción de la polimerización de túbulos originados desde el retículo endoplasmático (Pascal *et al.*, 1994; Sanderfoot y Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2008a,b; Zhang *et al.*, 2001; Aberle *et al.*, 2002; Hehnle *et al.*, 2004; Frischmuth *et al.*, 2007).

Independientemente de la vía de transporte célula-célula, el mecanismo tras el que se oculta el movimiento intracitoplasmático retrógrado y anterógrado de los complejos de vDNA sigue sin determinar. Se ha demostrado que las proteínas MPs de dos begomovirus interactúan con synaptotagmina A (SYTA), una proteína de la planta localizada en puntos de contacto entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático (ER) y necesaria para el transporte célula-célula de las proteínas MPs codificadas por otros virus (Uchiyama *et al.*, 2014). Puesto que se ha demostrado que SYTA está implicada en la vía de reciclaje de los endosomas (Lewis & Lazarowitz, 2010), estos descubrimientos sugieren que las proteínas MPs pueden realizar el transporte intracitoplasmático desde las zonas de replicación viral a los plasmodesmos mediante la vía de reciclaje del endosoma. Además, se ha descrito que la proteína MP altera el ensamblaje y estabilidad de los microtúbulos, lo cual podría conectar la red de microtúbulos con el movimiento de esta proteína (y/o el virus) a través de los plasmodesmos (Krapp *et al.*, 2017). Finalmente, también se ha propuesto una vía no convencional de movimiento intra- e intercelular por cloroplastos y estrómulos basada en las interacciones de la proteína MP (Krenz *et al.*, 2010, 2012).

La mayoría de geminivirus están restringidos al tejido vascular. Aunque la causa de este tropismo tisular podría ser debida a la restricción del movimiento viral a ciertos tipos celulares, no se pueden descartar otros mecanismos limitantes de la propagación viral como la transcripción específica de los promotores virales o la necesidad de factores específicos del hospedador durante la infección. La replicación viral, expresión, y movimiento tanto en la célula como en la planta hospedadora provocan múltiples interacciones planta-virus a nivel molecular y genético que se pueden visualizar como síntomas en las plantas infectadas. La infección por geminivirus se correlaciona con malformaciones

florales y foliares, inducción de un patrón de mosaico o punteado amarillo y, en algunos casos, engrosamiento de las venas y enanismo. Estos síntomas reflejan los dramáticos cambios en la expresión génica de la planta que conducen a modificaciones de la homeostasis celular y el desarrollo. En el perfil transcriptómico de las plantas infectadas se ha observado un amplio número de genes y miRNAs relacionados con la defensa de la planta, señalización hormonal, modificaciones postranscripcionales, replicación del DNA, control del ciclo celular, etc., expresados diferencialmente (Allie *et al.*, 2014; Ascensio-Ibañez *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2013, Góngora-Castillo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Louis *et al.*, 2015; Naqvi *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2018; Pierce *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2019).

1.3.2. El virus y el insecto vector

La transmisión mediada por vector de los geminivirus es un paso clave en su propagación. La mayoría de los mecanismos relacionados con la adquisición y transmisión de estos virus han sido descubiertos estudiando la propagación de begomovirus por la mosca blanca *B. tabaci* (Czosnek *et al.*, 2017; Fiallo-Olive *et al.*, 2019). Para la transmisión persistente de estos virus, la retención por parte de la mosca blanca parece ser más importante que la absorción por parte de la planta (Czosnek *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2015, 2018; Pan *et al.*, 2018, 2020). La proteína CP es la única proteína estructural de los begomovirus que determina la especificidad de la transmisión por mosca blanca (Harrison *et al.*, 2002; Höfer *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2018; Pan *et al.* 2020; Wei *et al.* 2014). Para conseguir la transmisión efectiva desde el insecto, los begomovirus circulan, desde el lumen del intestino medio hasta la hemolinfa y, finalmente, entran en las glándulas salivarias primarias, desde donde son inyectados en la planta durante la alimentación del insecto (Czosnek *et al.*, 2017). Además, recientemente se ha descrito que algunos begomovirus se replican en la mosca blanca (He *et al.*, 2020).

La interacción de los geminivirus con sus insectos vectores ha recibido menos atención que las interacciones con su hospedador. Varios estudios, especialmente con el begomovirus TYLCV, han demostrado que determinadas proteínas de *B. tabaci* juegan un papel determinante en la transmisión circulativa del virus en su vector. De hecho, la presencia del virus en el insecto induce cambios en las rutas de señalización y defensa del mismo. La interacción física de TYLCV ha sido descrita, entre otras, con dos proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSPs), GroEL, una chaperona codificada por una bacteria endosimbionte y cyclophilina B (CypB) (Morin *et al.*, 1999; Gottlieb *et al.*, 2010; Ghanim, 2014; Rosen *et al.*, 2015; Kanakala y Ghanim, 2016, 2019). La inhibición de estas proteínas afecta a la persistencia, circulación y transmisión de los virus, indicando que son requeridas para la adecuada propagación del mismo (Kanakala y Ghanim, 2016).

Las interacciones triples entre la planta, el virus, y el insecto vector ejercen importantes cambios en la epidemiología de las enfermedades virales. Durante los últimos años, diversos estudios han explorado las interacciones múltiples entre estos tres actores, enfocándose principalmente en el impacto que la presencia del virus tiene en la interacción planta-insecto, demostrando que los geminivirus alteran el contenido nutricional del tejido foliar y la savia del floema en beneficio de la mosca blanca. De hecho, el virus también tiene un impacto indirecto en la actuación de diferentes artrópodos, suprimiendo las defensas mediadas por jasmonatos (JA) (Zhang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

1.4. Transcripción de los genes virales

Los geminivirus han soportado una intensa presión selectiva sobre el tamaño de su material genético (Gilbertson *et al.*, 2003), dando lugar a un genoma muy reducido. Por ello, presentan una serie de características que les permite maximizar la información contenida en su genoma, como el presentar proteínas multifuncionales, ORFs solapados o un único promotor bidireccional (Eagle & Hanley-Bowdoin, 1997).

El promotor de los geminivirus se encuentra en la zona de la IR, por lo que la mayoría de los elementos reguladores de la transcripción y la replicación se encuentran en una misma zona del genoma (Eagle & Hanley-Bowdoin, 1997), aunque se ha observado que la transcripción viral es independiente de la replicación (Hanley-bowdoin *et al.*, 1999).

Al poseer un promotor bidireccional, los geminivirus presentan una división espacial de sus genes dependiente de su período de expresión: los genes presentes en la hebra complementaria (Rep, C2, C3 y C4) son de expresión temprana mientras que los genes situados en la hebra del virión (CP y V2) son de expresión tardía (Brough *et al.*, 1992; Shimada-Beltrán & Rivera-Bustamante, 2007). De hecho, el producto del gen C2, que se encuentra en el sentido complementario, regula la transcripción de los genes tardíos (Borah *et al.*, 2016; Sunter & Bisaro, 1997) mientras que la regulación de los genes tempranos se realiza de forma independiente a C2.

Esta regulación paralela induce no sólo una expresión temporal y ordenada a lo largo de la infección, sino también diferentes niveles de expresión. Sin embargo, estos niveles de expresión varían entre diferentes especies, por ejemplo, en *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) y *Mung bean yellow mosaic india virus* (MYMIV) la expresión del promotor en sentido Rep (sentido complementario) es mayor que en el sentido CP (sentido del virión) (Usharani *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2001), mientras que en *Chloris striate mosaic virus* (CSMV) y en *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) es el promotor en sentido Rep el que presenta una menor actividad en comparación con el sentido CP (Shivaprasad *et al.*, 2005; Zhan *et al.*, 1993).

1.5. Proteínas virales

En esta sección presentamos un resumen de las funciones e interactores de las diferentes proteínas virales.

1.5.1. C1/Rep

La proteína asociada a la replicación (Rep), codificada por el ORF C1/AC1, está conservada tanto en secuencia, como posición y función entre los diferentes geminivirus (figura 3). Además, es la única proteína viral esencial para la replicación (Elmer *et al.*, 1988; Rogers y Elmer, 1990). Los mastrevirus expresan Rep desde un mRNA que sufre *splicing*, dando lugar el extremo 5' del ORF del transcrito a RepA, por lo que ambas proteínas comparten 200 aminoácidos del extremo N-terminal. Tanto Rep como RepA son necesarias para la replicación viral y comparten funciones e interactores del hospedador (Fondong *et al.*, 2013). Rep es una proteína oligomérica multifuncional que media el reconocimiento virus específico de su origen de replicación, permitiendo la iniciación y terminación de la síntesis de DNA durante la replicación en círculo rodante (RCR) mediante su capacidad de unirse al DNA y su actividad ATPasa, ligasa y helicasa (Fontes *et al.*, 1994a; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995; Laufs *et al.*, 1995; Orozco y Hanley-Bowdoin, 1996).

Rep y la replicación viral.

El origen de replicación de los geminivirus consiste en una región de alrededor de 200 nt localizada en la IR, la cual incluye un grupo de elementos de regulación en *cis* esenciales para la replicación (Fontes *et al.*, 1992; Lazarowitz *et al.*, 1992) (figura 5). Esta región contiene una estructura de bucle de aproximadamente 30 nucleótidos que se encuentra conservada. La estructura de bucle está formada por una zona rica en repeticiones inversas GC y un lazo conformado por una secuencia conservada (TAATAT↓AC), donde la flecha indica el sitio de iniciación

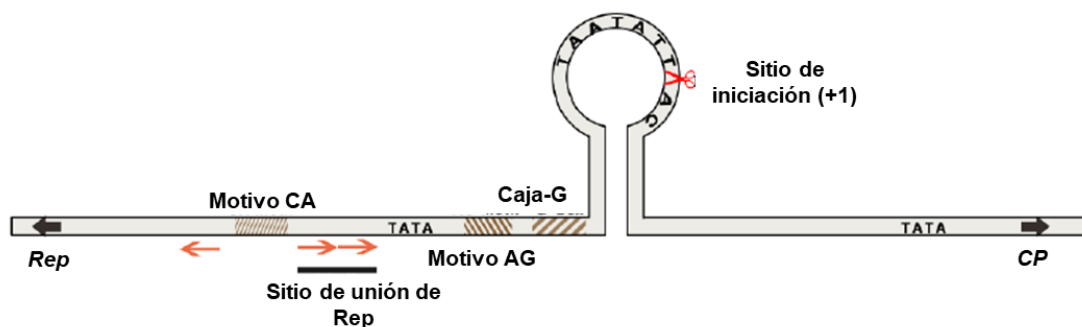


Figura 5. El origen de replicación geminiviral. Se representa el origen de replicación de los begomovirus. La estructura de bucle con la región de 9 nt conservada es mostrada. El sitio de iniciación (+1) indica la posición donde la RCR comienza. Los iterones se muestran con flechas naranjas tanto en **A** como en **B**. El sitio de unión de Rep es indicado con una línea subyacente. Otros elementos, como el motivo CA, el motivo AG, y la caja-G en begomovirus, así como los extremos 5'-aux y 3'-aux son mostrados. La figura ha sido modificada a partir de Wu *et al.* 2021. (no publicado)

de la replicación (Harrison, 1985; Stenger *et al.*, 1991; Lazarowitz *et al.*, 1992). Esta secuencia motivo conservada es cortada por Rep en la hebra del virión.

Además de la estructura de bucle, una serie de elementos iterados (iterones) son componentes esenciales del origen de replicación. Los iterones de begomovirus, los cuales son el sitio de unión de Rep, están localizados en la región *upstream* de la estructura de bucle (Fontes *et al.*, 1992; Fontes *et al.*, 1994a, b). Estos iterones son específicos de la especie viral, y muestran un patrón de organización conservado, incluyendo su posición relativa, orientación y espaciado. Las proteínas Rep presentan una alta especificidad con su origen de replicación respectivo, pero no respecto al origen de replicación de genomas heterólogos, lo cual se correlaciona con la alta heterogeneidad de elementos de unión a Rep. El iterón 5'-proximal del sitio de unión a Rep parece mejorar la replicación, mientras que el 3'-proximal es esencial para este proceso (Arguello-Astorga *et al.*, 1994a, b; Behjatnia *et al.*, 1998; Orozco *et al.*, 1998). Otros motivos, denominados como caja TATA, caja G, y motivos CA y AG, pueden también regular la replicación del DNA viral (Eagle *et al.*, 1997, Gutiérrez, 1999).

Puesto que los geminivirus no codifican proteínas con las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo la replicación del DNA, los componentes del replisoma viral, con la excepción de Rep y REn, deben de provenir de la célula infectada. Un aspecto clave de la replicación de los geminivirus, identificar las DNA polimerasas que median la replicación de los geminivirus, ha sido una incógnita durante años. La alta ratio de mutación de los geminivirus ha llevado a especular que las DNA polimerasas de menor fidelidad deben de ser las implicadas en la síntesis del DNA viral; estas polimerasas son expresadas ampliamente, por lo que están disponibles durante la infección viral. Sin embargo, las DNA polimerasas replicativas α y δ han sido identificadas recientemente como necesarias para la acumulación de TYLCV y BCTV en *N. benthamiana* (Wu *et al.*, 2020). Además, se ha descrito que TYLCV posee la capacidad de replicarse en su insecto vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci*, de forma dependiente de la DNA polimerasa- δ (He *et al.*, 2020), sugiriendo que los mecanismos moleculares que permiten la replicación del DNA geminiviral podrían estar conservados en plantas y animales.

Modelo actual de replicación de geminivirus

Los geminivirus replican su material genético a través de intermediarios de dsDNA, y posteriormente, estas moléculas son introducidas en un ciclo de replicación por círculo rodante (RCR) y, eventualmente, en replicación dependiente de recombinación (RDR) (figura 6). Por lo tanto, durante la invasión de la célula vegetal, el ssDNA debe de ser transformado en dsDNA, un proceso denominado replicación de hebra complementaria (CSR) y que debe de llevarse a cabo sin la contribución de proteínas virales, ya que aún no han podido ser sintetizadas (figura 6). Se ha propuesto que la síntesis de la hebra complementaria sea iniciada mediante la extensión de un cebador de DNA o

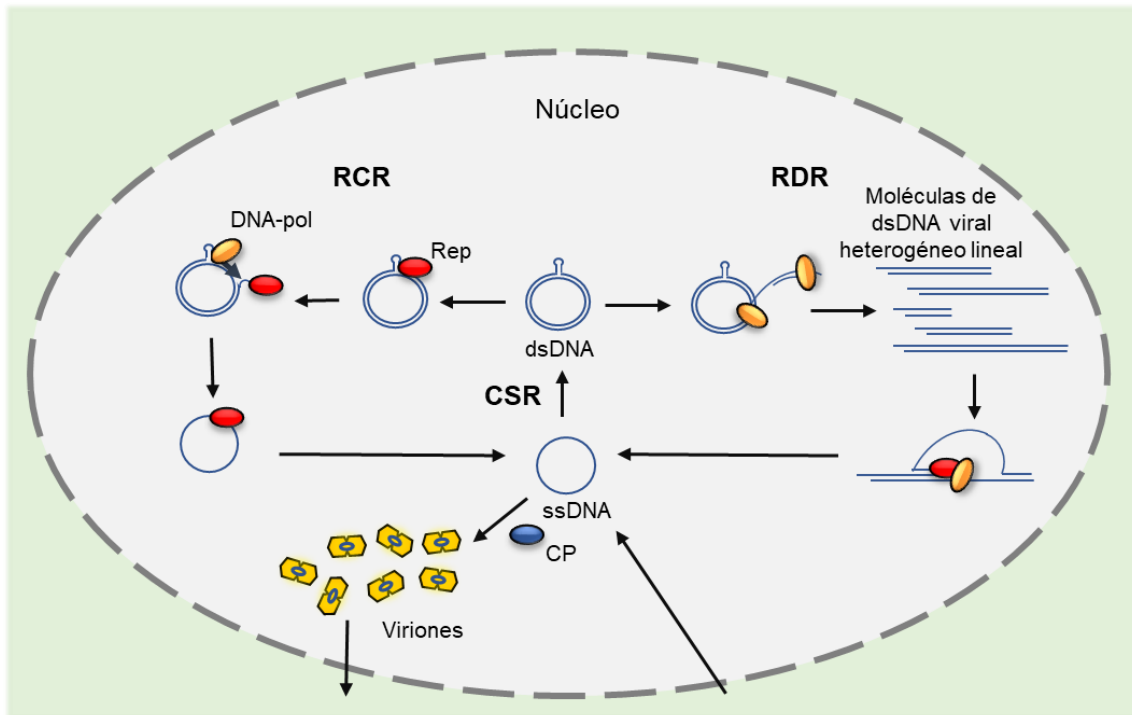


Figura 6. Tipos de replicación de los geminivirus. Los geminivirus presentan 3 tipos de replicación: replicación por hebra complementaria (CSR), replicación dependiente de recombinación (RDR) y replicación por círculo rodante (RCR). La CSR se produce al infectar el virus la célula, donde, utilizando la maquinaria molecular del hospedador, replicará la hebra complementaria de su molécula de ssDNA para formar una molécula de dsDNA. En la RDR, una molécula de ssDNA invade una región homóloga de una molécula de dsDNA. La maquinaria celular se dirige a la molécula de ssDNA, utilizándola como hebra molde. Finalmente, la DNA polimerasa del hospedador convierte la molécula de ssDNA resultante en una molécula de dsDNA que será circularizada por Rep. Por último, en la RCR, Rep reconoce una secuencia que se encuentra en la zona IR del genoma viral, iniciando el corte de la hebra del virión y dando lugar a un extremo 3'-hidroxil libre, lo que permite a la DNA polimerasa II del hospedador replicar la hebra complementaria. Una vez finalizado el proceso, Rep une los extremos de la nueva molécula de ssDNA; esta molécula puede ser encapsulada o reiniciar otro ciclo de replicación.

RNA (Donson *et al.*, 1984; Saunders *et al.*, 1992). De acuerdo con resultados recientes, la síntesis de la hebra complementaria debe requerir de la DNA polimerasa α (Wu *et al.*, 2020), aunque la participación de DNA polimerasas adicionales en este paso no debe de ser descartada.

Durante la RCR, la replicación de la hebra del virión es iniciada mediante la unión de Rep al DNA viral y su posterior corte en una secuencia nonucleotídica conservada en el origen de replicación. Seguidamente a este corte, Rep se mantiene unida al extremo 5' libre (Laufs *et al.*, 1995), y la maquinaria de replicación del DNA necesita ser reclutada para ensamblar el replisoma viral e iniciar la RCR. Aunque la composición del replisoma viral sigue sin conocerse, probablemente incluye interactores de Rep y REn, así como otras proteínas de la planta necesarias para la replicación viral, como por ejemplo *replication factor C* (RFC), *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), y *replication factor A* (RPA32) (Luque *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2007), así como la DNA polimerasa δ , la cual se ha demostrado que es esencial en este proceso (Wu *et*

al., 2020). Por otro lado, aún se desconoce si la DNA polimerasa α o las DNA polimerasas no replicativas también participan en el ensamblaje del replisoma viral. Rep/REn podría reclutar la maquinaria celular de replicación gracias a su interacción con RFC y PCNA. RPA podría unirse al ssDNA durante la replicación del proceso. Rep contiene un dominio helicasa y se ha demostrado que los oligómeros de Rep presentan actividad DNA helicasa (Choudhury *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2008), pero la subunidad MCM2 de la DNA helicasa es requerida por la replicación de los geminivirus, por lo que parece que el complejo de la DNA helicasa de la planta también es necesario para la replicación del DNA viral (Suyal *et al.*, 2013). La finalización de la RCR ocurre cuando Rep corta la secuencia de nonanucleótidos reparada y la liga con la hebra parental, liberando, por lo tanto, una copia del genoma de ssDNA (Laufs *et al.*, 1995). Esta copia puede ser convertida en un intermediario de dsDNA, permitiendo su reentrada en el ciclo de replicación, o ser encapsidada o/y transportada (figura 6).

Además de la RCR, los geminivirus se pueden replicar mediante otro mecanismo en el que también participa Rep que se denomina replicación dependiente de recombinación (RDR). En este tipo de replicación se inicia cuando diversos fragmentos de ssDNA lineal se alinean junto a secuencias homólogas del genoma viral de dsDNA, permitiendo, mediante las DNA polimerasas de la planta, la síntesis de moléculas de dsDNA lineal a partir de estos fragmentos de ssDNA. Se pueden producir numerosas copias de cada una de estas moléculas de dsDNA lineal heterogéneas, siendo cada una de ellas una potencial hebra molde para la síntesis de DNA mediante Rep.

Rep y la reactivación del ciclo celular.

Los geminivirus infectan células diferenciadas, donde la maquinaria de replicación del DNA no está disponible. Diversas especies de geminivirus (como TYLCV), presentan restringida su movilidad en la planta durante la infección, detectándose su DNA tan sólo en las células acompañantes del floema, mientras que otras especies pueden infectar otros tipos celulares, incluyendo células del mesófilo. Debido a que la disponibilidad de la maquinaria de replicación del DNA del hospedador es condición *sine qua non* para la replicación de los geminivirus, estos virus deben reprogramar el ciclo celular para desencadenar la reentrada en la fase S, creando de esta forma un ambiente celular adecuado para la síntesis de DNA. Esta función es dada por la proteína Rep, o RepA en el caso de los mastrevirus, aunque proteínas virales adicionales también pueden contribuir (Caracruel *et al.*, 2012, Mei *et al.*, 2018b, Lai *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que algunas especies de geminivirus pueden desencadenar la replicación del DNA en las células a las que afectan sin inducir la proliferación celular. Estos datos sugieren que el patógeno puede alterar el endociclo sin modificar la división mitótica (Nagar *et al.*, 2002; Bass *et al.*, 2000). En cualquier caso, algunas combinaciones geminivirus/hospedador resultan en hiperplasia y

malformaciones (Bridson & Stanley; 2006; Latham *et al.*, 1997), y la expresión de ciertas proteínas de determinadas especies de geminivirus inducen la formación de callos, indicando que los geminivirus pueden potencialmente estimular la proliferación celular (Mills-Lujan *et al.*, 2010; Gordon-Kamm *et al.*, 2002). Este efecto diferencial dependiente de la especie viral y/o las proteínas sugiere que los geminivirus han desarrollado diferentes estrategias para inducir la disponibilidad de la maquinaria de replicación del DNA y/o que la combinación de diferentes proteínas virales es requerida para el fino ajuste del ciclo celular.

Uno de los mayores reguladores del ciclo celular en eucariotas es la proteína del retinoblastoma (Rb) (o *retinoblastoma-related*, RBR, en plantas)/E2F, la cual actúa equilibrando la proliferación celular y la diferenciación, regulando la entrada en el endociclo mediante el control de la transición desde la fase G1 a la S (revisado por Desvoves y Gutiérrez, 2020). Los factores de transcripción E2F, junto a la dimerización de sus proteínas compañeras DP, controlan (generalmente mediante activación) la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. RBR se une a E2Fs, secuestrándolos e impidiendo su función como reguladores transcripcionales. Tras la reactivación del ciclo celular, RBR es fosforilada por CDK/cyclinas, una modificación que impide su interacción con E2Fs, que son dimerizados con las proteínas DP y actúan en sus genes diana (revisado por Desvoves y Gutiérrez, 2020). De forma similar a como se ha observado en estudios previos en virus de DNA inductores de tumores en mamíferos, los geminivirus alteran la vía RBR/E2F para manipular el ciclo celular y permitir la replicación viral: las proteínas Rep y REn pueden interactuar directamente con RBR, (Ach *et al.*, 1997, Settlage *et al.*, 2001, Arguello-Astorga *et al.*, 2004; Grafi *et al.* 1996, Horváth *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1996; *et al.*, 1999). En mastrevirus, se ha descrito que la proteína RepA de WDV, MSV y *Bean yellow dwarf virus* (BYDV) presentan la habilidad de unirse a RBR, a través de un motivo de unión a RBR LXCXE canónico. En begomovirus, la proteína Rep de *Tomato Golden Mosaic virus* (TGMV), *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV), y TYLCV presentan la capacidad de unirse a RBR, al igual que la proteína AL3 de TGMV (Ach *et al.*, 1997a; Settlage *et al.*, 2005; Arguello-Astorga *et al.*, 2004), aunque ninguna de estas proteínas presenta un motivo LXCXE, indicando la existencia de una forma diferente de unión que debe permitir esta interacción.

1.5.2. C3/REn

La proteína potenciadora de la replicación (REn), codificada por el ORF C3/AC3, está ausente en algunos géneros, como Mastrevirus, pero está presente en Begomovirus y Curtovirus (figura 3) (Zerbini *et al.*, 2017). Aunque REn no es esencial para la replicación viral, potencia la acumulación de DNA viral. REn también oligomeriza (Settlage *et al.*, 2005) e interactúa con Rep y con otros interactores de Rep tales como PCNA (Castillo *et al.*, 2003) y RBR (Settlage *et al.*, 2001).

1.5.3. C2/TrAP

La proteína activadora de la transcripción (TrAP) es expresada desde un transcrito dicistrónico que incluye los ORFs C2/AC2 y C3/AC3, conducidos por un promotor monodireccional localizado en la secuencia de C1 (Shivaprasad *et al.*, 2005) (figura 3). TrAP fue inicialmente descrita como una proteína activadora de la transcripción y un factor de patogenicidad, pero numerosos trabajos han descubierto nuevas funciones para esta proteína viral multifuncional (revisados por Guerrero *et al.*, 2020). TrAP de begomovirus, pero no de curtovirus, es un activador transcripcional que regula la expresión de los genes virales tardíos (CP y NSP) de una forma virus-no específica (Saunders y Stanley, 1995; Sunter *et al.*, 1994). Esta proteína no puede unirse a dsDNA, por lo que es dirigida a los promotores de CP y NSP mediante su interacción con diversos factores celulares (Hartitz *et al.*, 1999; Lacatus y Sunter, 2009). TrAP de begomovirus y curtovirus compromete la actividad de numerosas SCF-ubiquitin E3 ligasas relacionadas en la defensa de la planta y señalización hormonal (Lozano-Durán *et al.*, 2011). Además, TrAP puede suprimir el silenciamiento postranscripcional (PTGS) mediante la activación de la transcripción de genes del hospedador que parecen codificar a reguladores negativos del silenciamiento de RNAs (Trinks *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2014) o mediante la inactivación de ADK (Wang *et al.*, 2003), y el silenciamiento transcripcional (TGS) mediante interferencia en el ciclo del metilo (Buchmann *et al.*, 2009; Jackel *et al.*, 2015; Castillo-González *et al.*, 2015).

1.5.4. C4

La proteína C4 está incluida dentro de la región codificante de Rep pero en un ORF diferente (figura 3). C4 es la menos conservada de todas las proteínas de geminivirus, presenta funciones biológicas divergentes tanto en geminivirus monopartitos como bipartitos, y está ausente en cuatro de los nueve géneros de geminivirus (Luna y Lozano-Durán, 2020). Muchas proteínas C4 son meristoiladas en un motivo N-terminal que está altamente conservado; la modificación postraduccionale irreversible del grupo miristoilo dota a la proteína de un carácter hidrofóbico que facilita su unión a las membranas celulares. Sorprendentemente, esta modificación de C4, la cual necesita de la fosforilación por SK η (una proteína de la familia de las SHAGGY-like kinasas), parece ocurrir en el núcleo, y, por lo tanto, la proteína necesita ser enviada de vuelta al citoplasma mediante su interacción con una exportina- α a través de su dominio C-terminal (Mei *et al.*, 2018a, 2018b). Esta pequeña y versátil proteína juega diferentes papeles durante la infección. De forma similar a Rep, C4 puede desregular el avance del ciclo celular, induciendo o estabilizando la fase S mediante su interacción con diferentes proteínas del hospedador que regulan las ciclinas celulares (Mei *et al.*, 2018b, Cheng *et al.*, 2013). C4 también actúa como un supresor del silenciamiento génico, utilizando diferentes estrategias para interferir en este mecanismo de defensa: interactuando con el receptor *like*

kinases (RLK) BARELY ANY MERISTEM 1 y 2 (BAM1/2) en la membrana plasmática y regulando la dispersión célula-célula de la señal de silenciamiento génico (Carluccio *et al.*, 2018, Rosas-Díaz *et al.*, 2018); e interactuando con, e inhibiendo, la S-adenosil metionina sintetasa (SAMS), una enzima central en el ciclo del metilo (Ismayil *et al.* 2018). Inicialmente, C4 fue relacionada con el movimiento en virus monopartitos (Rojas *et al.*, 2001) y un reciente trabajo sugiere que C4 coopera con CP y/o MP en el transporte del vDNA desde el núcleo hasta el citoplasma y desde célula a célula (Mei *et al.*, 2018a).

1.5.5. V1/CP

La proteína CP es expresada desde el ORF V1/AV1, un gen de expresión tardía codificado en la hebra del virión (figura 3). CP presenta la función conservada de ensamblar los viriones geminados, pero es divergente en términos de especificidad de transmisión del insecto vector (Briddon *et al.*, 1990). La parte central de CP contiene secuencias relacionadas con la multimerización, la cual es crítica para el ensamblado de la cápside viral y la transmisión a través del insecto vector (Hohnle *et al.*, 2001; Kheyr-Pour *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Noris *et al.*, 1998; Hallan y Gafni, 2001). CP se une tanto a ssDNA como dsDNA (Liu *et al.*, 1997), y, aunque no es esencial para la replicación viral, la ausencia de CP provoca una reducción en los niveles de ssDNA viral. En mastrevirus y begomovirus monopartitos, CP actúa como la proteína de transporte nuclear (NSP), facilitando la translocación nucleocitoplasmática del DNA viral a través de los poros nucleares (Liu *et al.*, 1999, 2001; Kunik *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001). Esta función parece ser dependiente de su unión a ssDNA a través de su dominio N-terminal (Pitaksutheepong *et al.*, 2007). CP contiene diferentes señales de localización nuclear (NLS), localizadas en los extremos N-, C-terminal y en la región central de la proteína (Unselde *et al.*, 2001), y una señal de exportación nuclear rica en leucina (NES) en su región central que media el tráfico nucleocitoplasmático (Ward y Lazarowitz, 1999). Además del transporte nuclear, la interacción de la proteína CP de begomovirus monopartitos y mastrevirus con la proteína del movimiento (MP, en el ORF de V2) está relacionada con el movimiento célula a célula y la dispersión sistémica del DNA viral (Briddon *et al.*, 1989; Padidam *et al.* 1996; Rigden *et al.*, 1993, Liu *et al.*, 2001, Poornima *et al.*, 2011). Aunque la proteína CP de los begomovirus bipartitos no es requerida para la infección de la planta, mejora la dispersión célula a célula y/o sistémica de diversos virus, lo cual sugiere que las proteínas CPs de begomovirus bipartitos han mantenido su papel en el tráfico viral durante la evolución de sus ancestros monopartitos (Ingham *et al.*, 1995; Stanley y Townsend, 1985; Guevara-González *et al.*, 1999; Poorna *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2008b; Gillette *et al.*, 1998).

1.5.6. V2/MP

La proteína del movimiento (MP) es codificada por tres ORFs diferentes dependiendo de la estructura del genoma viral y el género: V2 en los geminivirus monopartitos, BC1 en los begomovirus bipartitos, y V3 en algunos géneros similares a curtovirus (figura 3). La proteína V2 (MP) de geminivirus monopartitos es codificada en la hebra del virión y su ORF precede al ORF de CP (figura 3). El ORF de V2 no está presente en begomovirus bipartitos, excepto aquellos del “Viejo Mundo” (Europa y Asia), en los cuales es denominado como el ORF AV2. V2 de mastrevirus y begomovirus monopartitos actúa como proteína del movimiento (MP), relacionada en el movimiento célula-célula y a larga distancia del DNA viral (Boulton *et al.*, 1989, 1993; Mullineaux *et al.*, 1988; Wartig *et al.*, 1997). Además, V2 de begomovirus monopartitos y curtovirus es un supresor del silenciamiento génico y un determinante de la patogenicidad que desencadena la respuesta hipersensible (HR) en células infectadas (Wartig *et al.*, 1997, Chowda-Reddy *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2017; Luna *et al.*, 2020; Zrachya *et al.*, 2007). La proteína MP de begomovirus bipartitos está codificada en el ORF de BC1, localizado en la hebra complementaria del componente B del genoma. Como ocurre con la proteína V2 de begomovirus monopartitos, que interactúa con CP (descrito anteriormente), la proteína MP de geminivirus monopartitos también necesita de la interacción cooperativa con la correspondiente proteína NSP para permitir la dispersión sistémica del virus (Noueiry *et al.*, 1994; Ward *et al.*, 1997).

1.5.7. V3

Recientemente se han descrito nuevos ORFs codificantes de pequeñas proteínas en el genoma de TYLCV (Gong *et al.*, 2021). De entre estos ORFs se ha caracterizado la proteína codificada en el ORF 6 (V3) que es una proteína de menos de 10 kDa que se localiza principalmente en el *cis*-Golgi. En este mismo trabajo se ha demostrado que V3 presenta actividad supresora del silenciamiento génico a nivel transcripcional y postranscripcional, siendo necesaria para el desarrollo de la infección (Gong *et al.*, 2021). Puesto que se ha descrito que el ORF de V3 está conservado en numerosos geminivirus, es probable que otras especies virales presenten esta proteína con funciones similares.

1.5.8. BV1/NSP

La proteína NSP de begomovirus bipartitos está codificada en el ORF BV1 que se localiza en la hebra del virión del componente B del genoma (figura 3). De forma consistente con su función en el transporte nucleocitoplasmático de moléculas de ssDNA viral, las proteínas NSPs de diferentes begomovirus bipartitos interactúan con ssDNA y dsDNA, probablemente en el núcleo de células infectadas (Pascal *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998). La expresión

transitoria de diferentes NSPs de begomovirus ha demostrado que esta proteína es redireccionada desde el núcleo a la periferia celular en presencia de MP cuando ambas son coexpresadas (Sanderfoot y Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996; Lazarowitz y Beachy, 1999; Zhang *et al.*, 2001). MP y NSP son necesarias para la infección sistémica y actúan unidas para mediar en el tráfico de vDNA intra- e intercelular (Lazarowitz y Beachy, 1999; Gafni y Epel, 2002; Sanderfoot *et al.*, 1996, revisado por Martins *et al.*, 2020) La interacción de NSP con diferentes proteínas celulares, como NIG (NSP-*interacting GTPase*), AtNSI (interactor de NSP), una acetiltransferasa nuclear, y la histona H3, facilita la función, aún en parte desconocida, de transporte nuclear de NSP (McGarry *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2008a,b; Zhou *et al.*, 2011). Además de su papel en el tráfico celular, NSP es un supresor de las defensas de la planta a través de su interacción con diversos miembros de la familia de receptores transmembrana *leucine-rich repeat receptor like kinases* (LRR-RLK) como NIKs y BAK1 (*brassinosteroid insensitive 1- associated kinase 1*) (Fontes *et al.*, 2004; Mariano *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2019).

1.6. Satélites asociados a geminivirus

Los begomovirus monopartitos, y, en determinadas ocasiones, algunos bipartitos, pueden asociarse con componentes de ssDNA adicionales denominados como “satélites”. El incremento en el uso de la técnica de amplificación por círculo rodante (RCA), un procedimiento que permite la amplificación de moléculas de ssDNA sin conocer previamente las secuencias nucleotídicas utilizadas como molde (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Haible *et al.*, 2006), ha incrementado en gran medida el número de satélites identificados en los últimos años. De hecho, el Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus (ICTV) ha creado una familia de satélites de ssDNA asociados a begomovirus denominada *Toleusatellitidae* (Briddon *et al.*, 2016; Adams *et al.*, 2017), la cual incluye dos géneros de *Betasatellites* y *Deltasatellites*. En general, existen tres tipos de satélites de DNA asociados con los begomovirus, betasatélites (Briddon *et al.*, 2003b), alfasatélites (Briddon *et al.*, 2004), y deltasatélites (Lozano *et al.*, 2016). Todos ellos contienen una estructura de bucle que permite su replicación dependiente de Rep (figura 3). Los betasatélites presentan alrededor de la mitad del tamaño del genoma de los begomovirus y dependen de un begomovirus “*helper*” para su replicación y movimiento en la planta y a través de diferentes plantas. Los betasatélites codifican una única proteína en la hebra complementaria, β C1, la cual es un determinante de los síntomas y un supresor del silenciamiento génico (Zhou, 2013). Los deltasatélites son satélites no codificantes de alrededor de un cuarto del tamaño del genoma de los begomovirus a los que se asocian. Dependen de un limitado rango de begomovirus para su conservación en la planta y pueden ser

transmitidos por la mosca blanca *B. tabaci* (Fiallo-Olivé *et al.*, 2016). Además, aunque los deltasatélites no afectan a los síntomas inducidos por sus begomovirus “*helper*”, pueden reducir la acumulación viral. Los alfasatélites también son dependientes de su begomovirus “*helper*” tanto para el movimiento sistémico a través de la planta y como para su transmisión por insecto, pero tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma en células vegetales debido a que codifican para su propia proteína Rep (Mansoor *et al.*, 1999; Saunders y Stanley, 1999) (figura 3), la cual puede suprimir el silenciamiento génico (Nawaz-UI-Rehman *et al.*, 2010). Los alfasatélites son frecuentemente asociados con complejos de begomovirus/betasatélites.

1.7. Mecanismos de defensa frente a geminivirus

Los geminivirus, al ser parásitos obligados, han evolucionado para modular la maquinaria molecular de las células vegetales a su favor, provocando diferentes cambios fisiológicos que pueden repercutir de forma negativa en su hospedador. Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos para inhibir la replicación y el movimiento viral, disminuyendo la propagación del virus y la severidad de los síntomas asociados al mismo (Incarbone y Dunoyer, 2013). Entre estos mecanismos encontramos el silenciamiento génico, la señalización mediada por receptores inmunes, la defensa mediada por hormonas, la degradación de proteínas y la regulación del metabolismo (Calil y Fontes, 2017). Aunque se ha detectado que las proteínas C4 de diferentes geminivirus pueden bloquear diversos receptores *like kinases* (RLK) (Macho y Lozano, 2019), así como que algunos geminivirus pueden inhibir la respuesta inmune de la planta mediada por jasmonatos (Rosas Díaz *et al.*, 2016), diversos estudios sugieren que el silenciamiento génico mediado por pequeños RNA (sRNA, small RNA) es el principal mecanismo implicado en la defensa frente a geminivirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Raja *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2021).

En el reino de las plantas, el silenciamiento génico mediado por RNA es un importante mecanismo antiviral. Este silenciamiento se desencadena en presencia de moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA). Durante la infección por geminivirus las moléculas de dsRNA pueden formarse debido a estructuras secundarias en RNAs virales aberrantes, por solapamiento entre dos secuencias de RNA de una hebra (ssRNA) o debido a la acumulación de moléculas de mRNA con una secuencia similar (Vanitharani *et al.*, 2005). En los dos últimos casos, las polimerasas de RNA dependientes de RNA (RDRs) detectan las moléculas de RNA alineadas y generan las moléculas de dsRNA. Una vez formado el RNA de doble hebra, éste es reconocido por un grupo de proteínas con actividad ribonucleasa denominadas Dicer-like (DLC). Las proteínas DCL reconocen y procesan las moléculas de dsRNA formando pequeños RNA virales

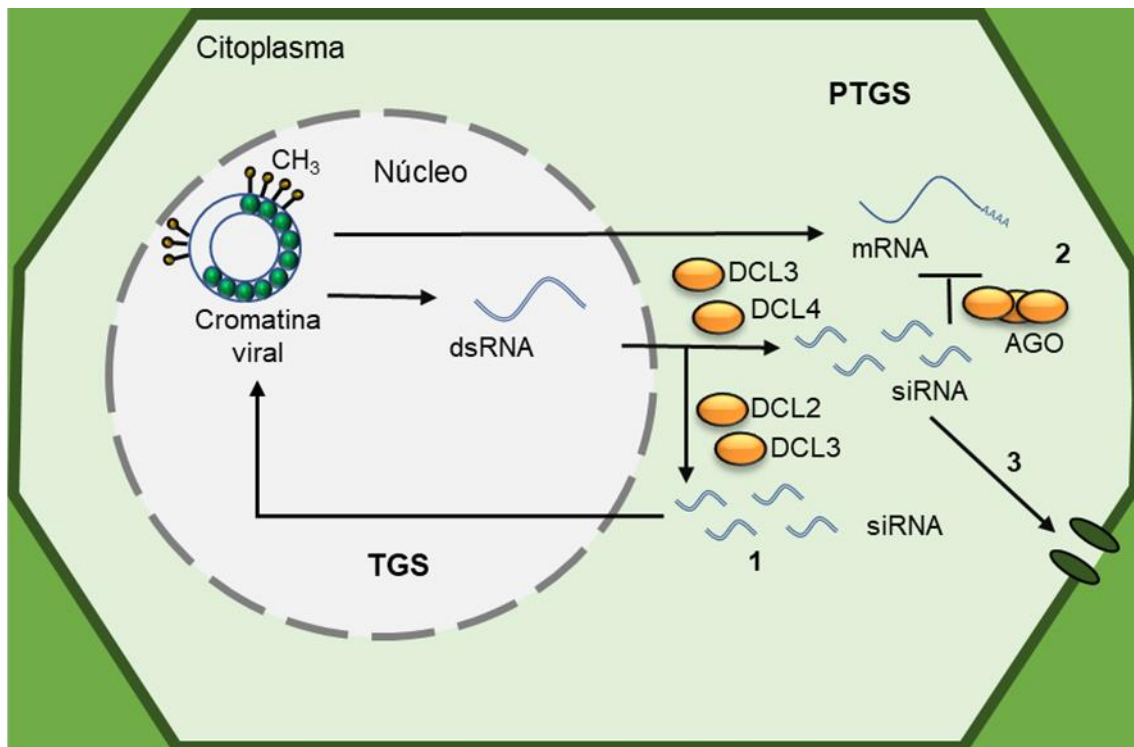


Figura 7. Principales rutas de silenciamiento génico. La planta usa el silenciamiento transcripcional (TGS) y el silenciamiento postranscripcional (PTGS) para defenderse de patógenos virales. En el TGS, las proteínas DCL2 y DCL3 cortan moléculas de dsRNA en vsiRNAs de 22 nt y 24 nt respectivamente. Estos siRNA se cargan en el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS) para inducir la metilación del genoma viral e inhibir su transcripción y replicación (1). En el PTGS, las moléculas DCL3 y DCL4 cortan las moléculas de dsRNA virales, produciendo vsiRNA de 24 nt y 21 nt respectivamente. Estos siRNA se cargarán en el complejo formado por las proteínas AGO y marcarán las moléculas virales de RNAm para su degradación (2). Además, las moléculas de vsiRNA se transmiten célula a célula, disparando la señal de silenciamiento a nivel local (3).

primarios (vsiRNA, viral small interfering RNA) de entre 21 nt y 24 nt. En *Arabidopsis thaliana* son tres las proteínas DCL con acción anti-viral: DCL4, la cual produce vsiRNAs de 21 nt, DCL2 forma vsiRNAs de 22 nt, mientras que DCL3 actúa sobre dsRNA virales generando vsiRNAs de 24 nt (figura 7). Las moléculas de vsiRNAs se asocian con diferentes complejos efectores que contienen a las proteínas Argonauta (AGO), cuya interacción con las moléculas de RNA virales complementarias provoca el corte y degradación de los RNAs diana complementarios a los vsiRNA, en un proceso llamado silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) o la inhibición de la transcripción de los genes virales en un proceso llamado silenciamiento génico transcripcional (TGS). En este segundo proceso, la interacción de los vsiRNA de 24 nt con el RNA complementario durante su transcripción, guían la metilación del DNA y modificaciones en la cromatina, que causan el TGS (figura 7) (revisado en Bologna y Voinnet, 2014; Castel y Martienssen, 2013; Wang *et al.* 2012).

Todos los virus de planta examinados en la literatura científica codifican para al menos una proteína que suprime el silenciamiento antiviral de su hospedador mediante diferentes mecanismos (Csorba *et al.*, 2015; Pumplin y Voinnet, 2013). Los geminivirus deben enfrentarse tanto al TGS como al PTGS para conseguir realizar infecciones exitosas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Pooggin, 2013).

Desde la primera descripción de la proteína C2 como un supresor del silenciamiento génico (Voinnet *et al.*, 1999), diferentes artículos han demostrado que las proteínas de begomovirus y sus satélites, C2, C4, V2 y β C1 actúan como supresores de PTGS mientras que C2, Rep, V2 y β C1 suprimen el también TGS (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013; Saeed *et al.*, 2014; Rodríguez Negrete *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2017; Prigigallo *et al.*, 2018; Raja *et al.*, 2008; Rosas Díaz *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2011).

2 Estreses abióticos

2.1 Estrés por sequía

Actualmente, la sequía es uno de los principales agentes limitantes para la agricultura; se ha estimado que en los diez años comprendidos entre 2010 y 2020 la sequía ha producido pérdidas de 30000 millones de dólares a nivel global (Gupta *et al.*, 2020). Además, debido al cambio climático, se espera que el número de días sin lluvia aumente en todo el mundo (Dewes *et al.*, 2017; Yusa *et al.*, 2015), por lo que el problema se agudizará en un futuro.

Las plantas han desarrollado numerosas adaptaciones para poder hacer frente a períodos de sequía mediante la expresión de genes específicos que provoquen cambios a nivel bioquímico y fisiológico. Mediante la regulación de la expresión génica y la actividad de las proteínas, las plantas pueden sobrevivir durante tiempos prolongados de falta de agua (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

Tradicionalmente se ha asociado la respuesta a sequía con el ácido abscísico (ABA), aunque también existen otras rutas de señalización que dan lugar a respuestas por parte de la planta ante el estrés hídrico.

2.1.1 Respuesta a sequía dependiente de ABA

El ABA es la principal hormona que regula la respuesta de la planta al estrés por sequía. Descubierta hace más de 50 años como un inhibidor del crecimiento en algodón (Andicott & Lyon, 1965), actualmente conocemos que la producción de ABA desencadena una amplia gama de respuestas en la planta, estando finamente regulada (Hossain *et al.*, 2016).

Biosíntesis de ABA

La síntesis de ABA empieza en el cloroplasto (figura 8), donde los carotenoides son transformados en zeaxantina por las enzimas β -caroteno hidroxilasa 1 (BCH1) y BCH2 (Finkelstein, 2013). La zeaxantina es transformada en violaxantina mediante la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), que está codificada en el gen *ABA1* (Rock & Zeevaart, 1991). A su vez, la violaxantina puede ser transformada en 9-cis-violaxantina o en trans-neoxantina, estando implicado el gen *ABA4* en la síntesis de este último, que es transformado en 9-

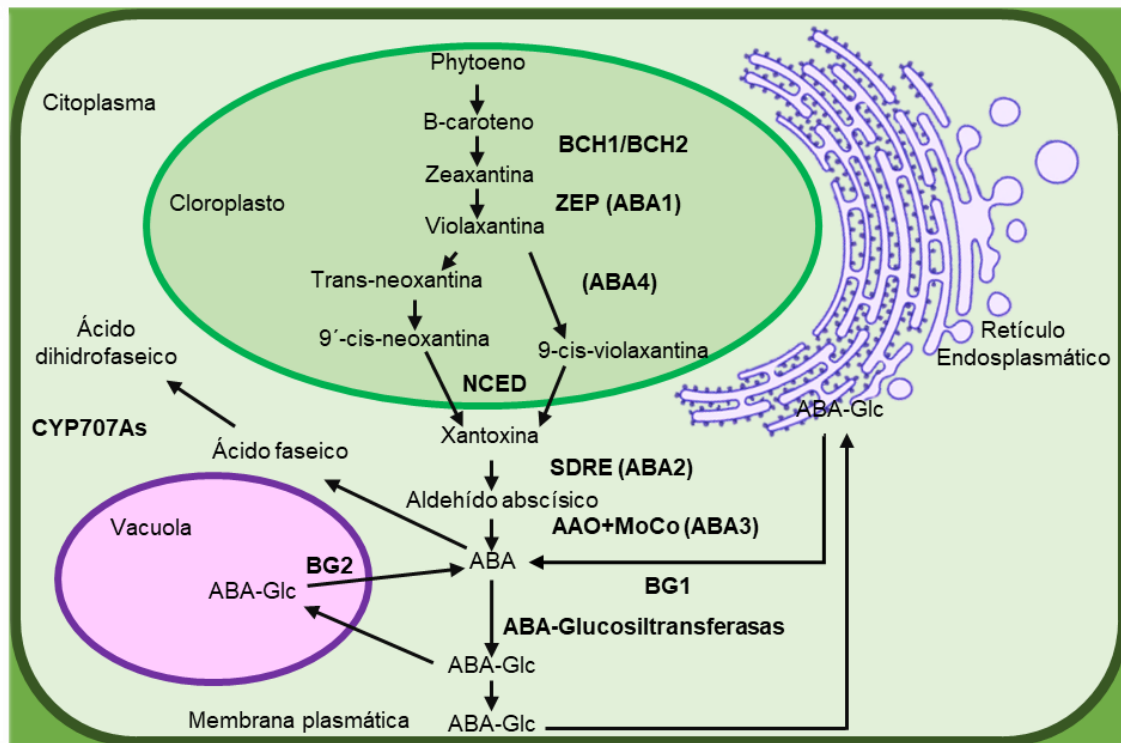


Figura 8. Síntesis de ABA. La molécula precursora del ABA es el phytoeno, que es sucesivamente transformado en β -caroteno, zeaxantina y violaxantina. La violaxantina puede ser modificada en 9'-cis-neoxantina o 9'-cisviolaxantina, que son cortadas por NCED en xantoxina, un paso clave en la síntesis del ABA. Finalmente, la xantoxina forma el aldehído abscísico, que es modificado en ABA. Esta hormona puede ser degradada a ácido faseico o glicosilarse, siendo almacenada en el retículo endoplasmático (RE) o en la vacuola. En respuesta a determinadas señales, las enzimas BG1 y BG2 eliminarán su glicosilación y la volverán activa. Figura modificada de Finkelstein, 2013.

cis-neoxantina. Tanto la 9-cis-violaxantina como la 9-cis-neoxantina son sustrato para la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxygenasa (NCED) que las utiliza para formar xantoxina (Finkelstein, 2013; Schwartz *et al.*, 1997). La xantoxina es transportada fuera del cloroplasto y, una vez en el citoplasma, sirve de sustrato a la enzima dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (SDR) (ABA2) que catalizará una reacción cuyo producto será el aldehído abscísico. Finalmente, una enzima de la familia de las ácido abscísico oxidasa junto a una molécula de molibdeno como cofactor (AAO+MoCo) (ABA3) usa el aldehído abscísico para dar lugar a ácido abscísico (ABA) (figura 8).

La actividad de la enzima NCED constituye el principal factor limitante en la ruta de biosíntesis del ABA. De hecho, en *Arabidopsis thaliana* existen 5 NCED diferentes que se expresan en diversos tejidos en respuesta a diferentes señales, siendo la expresión de *NCED3* inducida por sequía (Ma *et al.*, 2018).

El ácido abscísico puede oxidarse mediante la acción de la enzima CYP707As dando lugar a ácido faseico, que se catabolizará hasta ácido dihidrofaseico (Saito *et al.*, 2004). El ácido abscísico también puede conjugarse con azúcares mediante una ABA glucosyl-transferasa dando lugar a ABA-Glc, que se dirige a la vacuola, donde la enzima β -glucosidasa 2 (BG2) la volverá a convertir en ácido

abscísico, o a la membrana plasmática. En la membrana plasmática, la molécula de ABA-Glc será redirigida al retículo endoplasmático (ER), donde la enzima BG1 eliminará la glucosa, activando y enviando al ácido abscísico al citoplasma (Kim *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018).

El hecho de que el ABA pueda ser glucosilado para su almacenamiento provee a la planta de una mayor velocidad a la hora de responder al estrés por sequía. De hecho, se ha descrito que la actividad de la enzima BG1 aumenta en condiciones de estrés hídrico (Lee *et al.*, 2006) mientras que la sequía induce la acumulación de la glucosidasa BG2 (Xu *et al.*, 2012).

La biosíntesis de ABA no sólo requiere de los diversos compartimentos celulares, sino que también involucra diversos tejidos; sin embargo, aún no se comprenden todos los aspectos de la regulación de la síntesis de ABA. Por ejemplo, aunque es conocido que es en las células guarda donde se encuentra la mayor concentración de ABA gracias a la alta expresión de *AAO3* y *NCED3*, el lugar donde hay una mayor expresión de *NCED3* es en las células del parénquima vascular (Endo *et al.*, 2008), mientras que los genes que codifican las enzimas ZEP, ABA3, ABA2 y AAO3 se expresan en todos los tejidos. La presencia en altas cantidades del importador de ABA ABCG40 en las células guarda y del exportador ABCG25 en células provenientes de la vasculatura foliar podría implicar que los flujos de ABA entre células podrían ejercer también una función regulatoria aún por describir (Ma *et al.*, 2018; Merilo *et al.*, 2015; Zhang, 2014). Recientemente se han descubierto dos receptores-kinasa en la membrana plasmática (Receptor-like kinases - RLKs), *BARELY ANY MERISTEM1/3* (BAM1/3), que funcionan como receptores del péptido CLE25, induciendo una mayor expresión de *NCED3*. El péptido CL25 se ha asociado con el movimiento a larga distancia de la señal de respuesta a estrés hídrico. La expresión de *CLE25* aumenta en las raíces ante estrés por sequía, siendo transportado a través de los tejidos vasculares a las hojas. Una vez CLE25 se encuentra en los tejidos foliares, su interacción con los receptores BAM1/3 modula la respuesta a sequía. Entre los procesos inducidos por CLE25 se encuentra, además de aumentar la expresión de genes de respuesta a sequía como *NCED3*, el cierre de estomas y la acumulación de ABA en las hojas (Takahashi *et al.*, 2018).

Se conoce que la relación entre la expresión de *NCED3*, que codifica la enzima limitante en la biosíntesis de ABA inducida por sequía, y la expresión de *CYP707A3*, que codifica la enzima limitante del catabolismo e inducida por la rehidratación, es el principal factor regulador de la síntesis de ABA. La expresión de *NCED3* es inducida por sequía en diversos cultivos (Chernys & Zeevaart, 2000; Iuchi *et al.*, 2001; Qin & Zeevaart, 1999; Schwartz *et al.*, 1997), llegando a ser la velocidad de esta inducción entre 15 y 30 minutos después del estrés (Qin & Zeevaart, 1999). También se ha observado que en *A. thaliana*, *NCED3* es regulado por diferentes factores de transcripción inducidos por estrés osmótico o estrés hídrico, como WRKY57, BDG1, ANAC2 o SVP (Frey *et al.*, 2012; Jensen

et al., 2013; Wang *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2012). El resto de enzimas de la biosíntesis de ABA son también sobreexpresadas durante el estrés por sequía, a excepción de SDR (Iuchi *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2001; Xiong *et al.*, 2002; Xiong & Zhu, 2003). Hay estudios que muestran que el propio producto de la ruta de biosíntesis, la molécula de ABA, puede funcionar como regulador positivo de las enzimas de su biosíntesis, dando lugar a un circuito de retroalimentación positivo (Xiong *et al.*, 2002).

Transducción de la señal de ABA

Los principales receptores de ABA se encuentran en el citoplasma, siendo éstos la familia de receptores PYRABACTIN RESISTANCE1 (PYR1)/PYR1-LIKE (PYL)/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (RCAR) o receptores PYR/PYL/RCAR (figura 9). La unión con la molécula de ABA permite la estabilización de estos receptores con las PROTEIN PHOSPHATASES 2C (PP2C) (Chan, 2012; Fujii *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2009a; Santiago *et al.*, 2009b). Una vez la proteína PP2C se encuentra en el complejo receptor-ligando, su actividad inhibitoria de la actividad de SNF1-RELATED PROTEIN KINASES (SnRKs) es suprimida, permitiendo la actividad de estas kinasas, que activan diversos sustratos como factores de transcripción MYB o WRKY, que finalmente activarán la transcripción *ABI4*, *ABI5*, *ABF4* y *MYB2* (Umezawa *et al.*, 2009; Vlad *et al.*, 2010, 2009). Estos genes codifican factores de transcripción que transcribirán genes con secuencias de ABA-RESPONSIVE ELEMENTS (ABRE) en su zona promotora. Esta secuencia nucleotídica conservada suele estar acompañada del *coupling element* (CE), formando el *ABA-responsive complex* (ABRC) (Hobo *et al.*, 1999) (figura 9).

Otra ruta de señalización implica a la proteína MAGNESIUM-CHELATASE H SUBUNIT (CHLH) (Shen *et al.*, 2006; Tsuzuki *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2009), que se encuentra en la membrana del cloroplasto. Una vez el ABA es sintetizado inhibe a la proteína CPN20, la cual suprime la interacción de CHLH con CHLH1 en el interior del cloroplasto. Una vez CHLH se une a CHLH1 se produce un cambio conformacional en CHLH que provoca una fuerte afinidad por las proteínas WRKY18, WRKY40 y WRKY60, que una vez unidas al complejo de CHLH no pueden inhibir la transcripción de los diversos genes cuya transcripción es activada por ABA (Zhan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014) (figura 9).

El complejo ABA-PYR/RCAR–PP2C–SnRK, o complejo central de señalización de ABA, también modula la activación de los transportadores S-TYPE ANION CHANNEL (SLAC1) (Geiger *et al.*, 2010; Matschi *et al.*, 2009) y KAT1 (Hubbard *et al.*, 2010) mediante su fosforilación por la SnRK OST1, así como la de RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN F (RbohF), una NADPH oxidasa en la membrana plasmática que genera especies reactivas de oxígeno en el

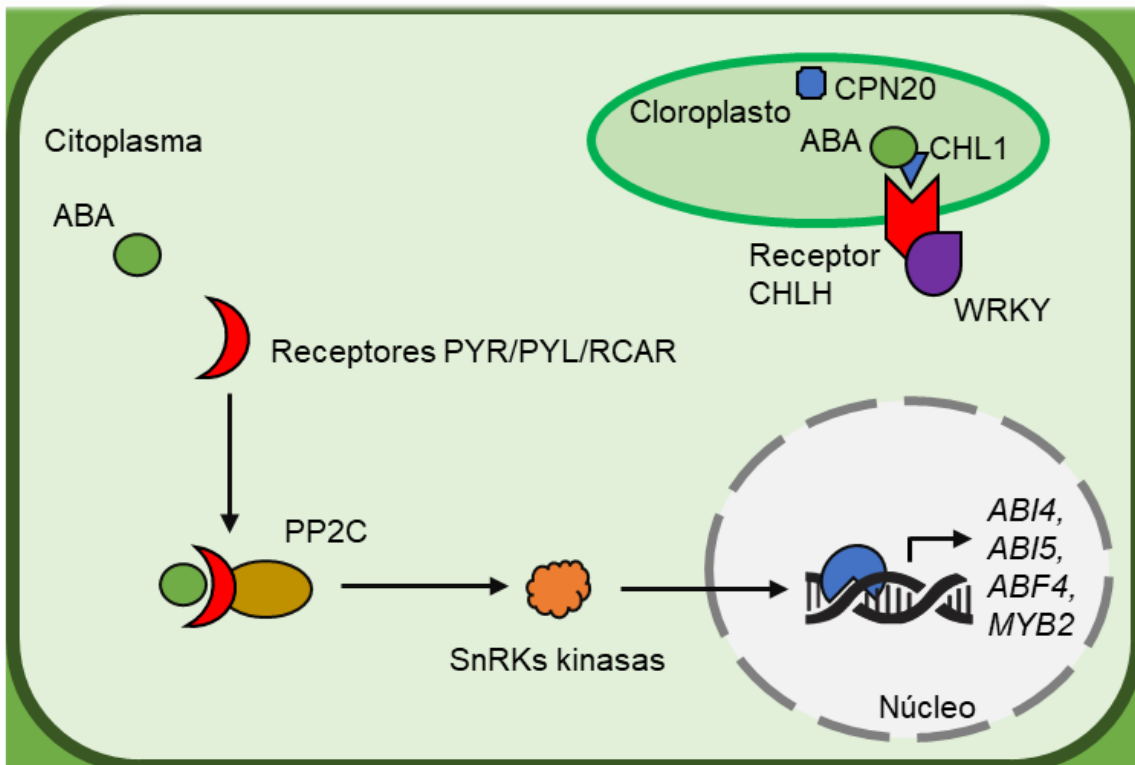


Figura 9. Transducción de la señal de ABA. La hormona es captada por la célula, uniéndose a los receptores PYR/PYL/RCAR. Una vez unidos, el complejo atrae a la proteína PP2C, liberando las SnRKs kinasas que activan a diversos factores de transcripción que activarán la transcripción de genes relacionados con la respuesta a ABA como *ABI4*, *ABI5*, *ABF4* o *MYB2*. En el cloroplasto, ABA evita la inhibición de CHL1 producida por CPN20, permitiendo que CHL1 se una al receptor subunidad CHLH. Esta interacción provoca un cambio conformacional en el receptor, permitiendo que secuestre factores de transcripción como WRKY, que inhiben la respuesta a ABA.

apoplasto que funcionan como segundo mensajero de otras respuestas (Sirichandra *et al.*, 2009). En las células guarda, estas proteínas modulan el cierre estomático mediante la creación de gradientes iónicos. Las proteínas SnRK, además, fosforilan numerosos *ABA Response Binding Factors* (ABFs) (Kobayashi *et al.*, 2005) que activan la transcripción de genes que contengan la secuencia ABRE.

2.1.2 Respuesta a sequía independiente de ABA

Aunque un gran número de genes que responden a estrés son inducidos por ABA, también se han encontrado genes inducidos por estrés por sequía que no responden a esta hormona, indicando que existen al menos dos cascadas de señalización (Agarwal *et al.*, 2011; Rao *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha observado que el gen *RAD29A*, cuya expresión es inducida por ABA, también es transcrito en plantas mutantes deficientes en la síntesis de ABA (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1992). Un análisis más detallado del promotor de *RAD29A* mostró que esta regulación es modulada por la secuencia ACCGACA, denominada *dehydration-responsive element* (DRE) (Yamaguchi-Shinozaki &

Shinozaki, 1994). A estas secuencias se les unen factores de transcripción como DRE-BINDING PROTEIN 1/C-REPEAT BINDING FACTOR (DREB1/CBF) y DREB2 (Liu *et al.*, 1998; Stockinger *et al.*, 1997). Mientras que la expresión de la familia de proteínas DREB1 es inducida en condiciones de bajas temperaturas (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Stockinger *et al.*, 1997), las proteínas de la familia DREB2 son inducidas por estrés por sequía, salinidad y alta temperatura (Liu *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2006a; Shinwari *et al.*, 1998), indicando un solapamiento en la ruta de respuesta a estos estreses. Se ha observado que DREB2A presenta un dominio que regula negativamente su actividad (*negative regulatory domain* o NRD). Plantas transgénicas que sobreexpresan un mutante de esta proteína sin el dominio NRD presentan inducidos numerosos genes relacionados con la respuesta a alta temperatura, la salinidad y la sequía (Reis *et al.*, 2014; Sakuma *et al.*, 2006a; Sakuma *et al.*, 2006b). Aunque parecen existir varias vías por las que se regula a DREB2A, la principal es mediante control postraducciona, siendo degradada tras ser ubiquitinada en condiciones normales y fosforilada en condiciones de estrés por alta temperatura (Mizoi *et al.*, 2019; Mizoi *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2008).

Aunque la vía independiente de ABA más estudiada implica a diversas proteínas del grupo DREB2, se han observado otras proteínas relacionadas con la respuesta a sequía que no son inducidas por ABA (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006). Por ejemplo, se ha observado que la expresión de *ERD1*, una proteasa reguladora de la respuesta al estrés por sequía, es inducida en plantas transgénicas que sobreexpresan una proteína con homeodominios de dedos de zinc (ZFHD1) y factores de transcripción NAC (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006), indicando otra posible ruta de señalización de respuestas frente a estrés hídrico independiente de ABA.

2.2 Estrés por salinidad

La salinidad es uno de los estreses abióticos más dañinos para los cultivos, afectando a alrededor de un 23% de la tierra cultivable (Tuteja, 2007). Las predicciones actuales auguran la pérdida del 50% de la tierra cultivable en el siglo XXI debido a un incremento de la salinidad en las mismas (Mahajan & Tuteja, 2005). El estrés por salinidad produce cuantiosas pérdidas económicas y numerosos daños en los cultivos. Algunos de los síntomas provocados por el estrés salino son inhibición del crecimiento, reducción de la producción y muerte bajo estrés prolongado (Chinnusamy *et al.*, 2006). Por todo ello el encontrar mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas se ha convertido en un foco de interés para la investigación biotecnológica.

Las plantas responden a la salinidad en dos fases principales: una primera etapa de reducción del crecimiento, que puede durar días, y que está causada por el

cierre estomático y la inhibición de la expansión celular, particularmente en el tallo; y una segunda etapa, que puede abarcar semanas, y que se deriva de la acumulación de iones a niveles citotóxicos, con la consiguiente reducción del metabolismo (Munns & Termaat, 1986; Munns & Tester, 2008; Passioura & Munns, 1984; Rajendran *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2014; revisado en Isayenkov & Maathuis, 2019). Esta segunda fase resulta en senescencia prematura, y termina causando la muerte de la planta. La tolerancia al estrés salino se pueden dividir tres tipos de tolerancia a la salinidad (Munns & Tester, 2008): tolerancia al estrés osmótico (producido al no poder absorber agua la planta y que suele dar lugar a un mayor área de la hoja y un aumento de la conductancia estomática); tolerancia iónica, que implica la exclusión de la sal de las hojas (siendo el almacenamiento de sal en la raíz una de las principales respuestas frente a una alta salinidad); y tolerancia a la acumulación de Na⁺ en los tejidos (lo cual implica la compartimentalización de los iones para evitar la toxicidad asociada a su acumulación) (Rajendran *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2014)

2.2.1 Respuesta a estrés por salinidad: ruta Salt Overly Sensitive

La respuesta más conocida a nivel de señalización e interacción de proteínas es la ruta *Salt Overly Sensitive* (SOS) (Zhu, 2016; Zhu *et al.*, 1998) (figura 10).

Aunque el receptor de estrés salino de esta ruta es desconocido, se sabe que el primer señalizador de la ruta es un incremento en la concentración de calcio citoplasmático. Las moléculas de Ca²⁺ se unen a la proteína meristoilada SOS3 aumentando su afinidad por la kinasa SOS2 (Halfter *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998), a la que recluta a la membrana plasmática y activa. La activación de SOS2 hace que libere proteínas 14-3-3 con las que formaba un complejo y que la mantenían inactiva, siguiendo la fosforilación por parte del regulador negativo PKS5 (Yang *et al.*, 2019). Las proteínas 14-3-3 se unen entonces a PKS5, suprimiendo su actividad kinasa y por tanto inhibidora de la ruta (Yang *et al.*, 2019). La proteína SOS2 activada fosforila a SOS1, un antiportador de Na⁺/H⁺ en la membrana plasmática, lo que lleva a la extrusión del exceso de sodio del citosol (Liu *et al.*, 2000; Qiu *et al.*, 2004; Quintero *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2002; revisado en Ji *et al.*, 2013; Zhu, 2016) (Figura 10).

El complejo Ca²⁺-SOS3/SOS2 también activa distintos transportadores de iones de la vacuola como CATION EXCHANGER 1 (CAX1), la familia de transportadores NHX o ATPasas de la vacuola (Batelli *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2004), que transportan los iones de sodio, calcio y protones hacia el interior vacuolar (figura 10).

Se puede resumir el mecanismo de funcionamiento de la ruta SOS como una vía de señalización que disminuye la concentración de Na⁺ en el citoplasma de la célula mediante la activación o inhibición de transportadores específicos y la creación de un gradiente de protones que facilite el antiporte de Na⁺.

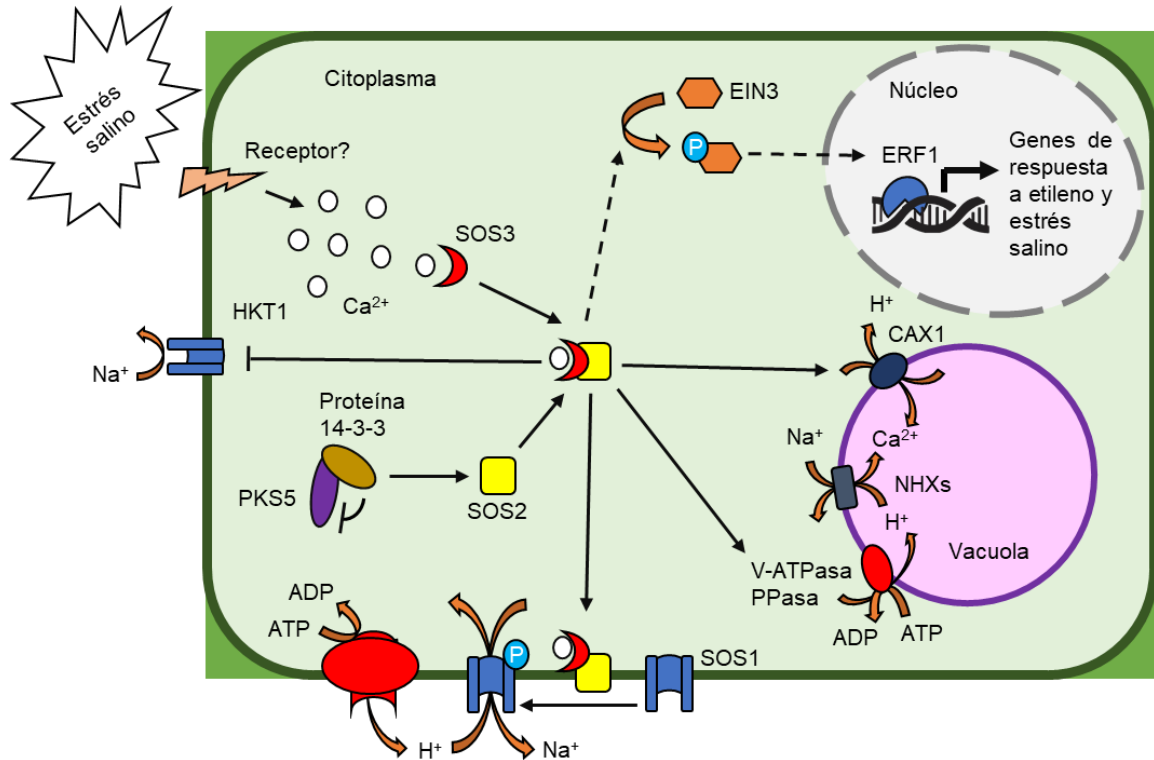


Figura 10. Ruta SOS de respuesta a salinidad. Aunque no se conoce un receptor de estrés salino, se ha demostrado que el estrés salino produce un aumento de iones Ca^{2+} en el citoplasma. Estos iones se unen al receptor SOS3, aumentando su afinidad por SOS2 y liberando a la proteína 14-3-3. La proteína 14-3-3 se une e inhibe a PKS5, permitiendo la activación de ATPasas liberen iones H^+ al apoplasto. El complejo Ca^{2+} -SOS2-SOS3 fosforila a SOS1, activándolo y permitiendo que mediante antiporte de H^+ pueda expulsar Na^+ del citoplasma. Además, el complejo Ca^{2+} -SOS2-SOS3 inhibe transportadores de ión Na^+ y activa transportadores de iones y ATPasas de la vacuola. Por último, mediante una cascada de kinasas, activa a EIN3 mediante fosforilación, permitiendo que factores de transcripción como ERF1 expresen genes relacionados con la respuesta a estrés salino y etileno.

Los genes que codifican SOS1, SOS2 y SOS3 son inducidos en condiciones de estrés salino por igual en todos los tejidos de la raíz. Sin embargo, SOS1 presenta una mayor expresión en células de la epidermis de la raíz, indicando que posiblemente SOS1 pueda expulsar Na^+ al suelo (Shi *et al.*, 2002). También se han observado variaciones en la ruta SOS dependiendo del órgano en el que sucede: mientras que en las raíces es SOS3 la proteína implicada en la activación mediante calcio de SOS2, en tejidos aéreos es ScaBP8 la proteína que cumple esta función (Lin *et al.*, 2009; Quan *et al.*, 2007).

2.2.2 Respuesta a estrés por salinidad: vía del etileno

Otra vía menos estudiada y que ha acumulado un considerable interés es la vía de respuesta al estrés salino mediada por etileno (Cao *et al.*, 2008) (figura 11). Se sabe que ante diversos estreses como salinidad la planta acumula más etileno y su precursor 1-ácido carboxílico (ACC) (Morgan & Drew, 1997), y la aplicación de etileno o ACC aumenta la tolerancia al estrés por salinidad (Cao *et al.*, 2006a). La biosíntesis de etileno surge a partir S-AdoMet, el cual es

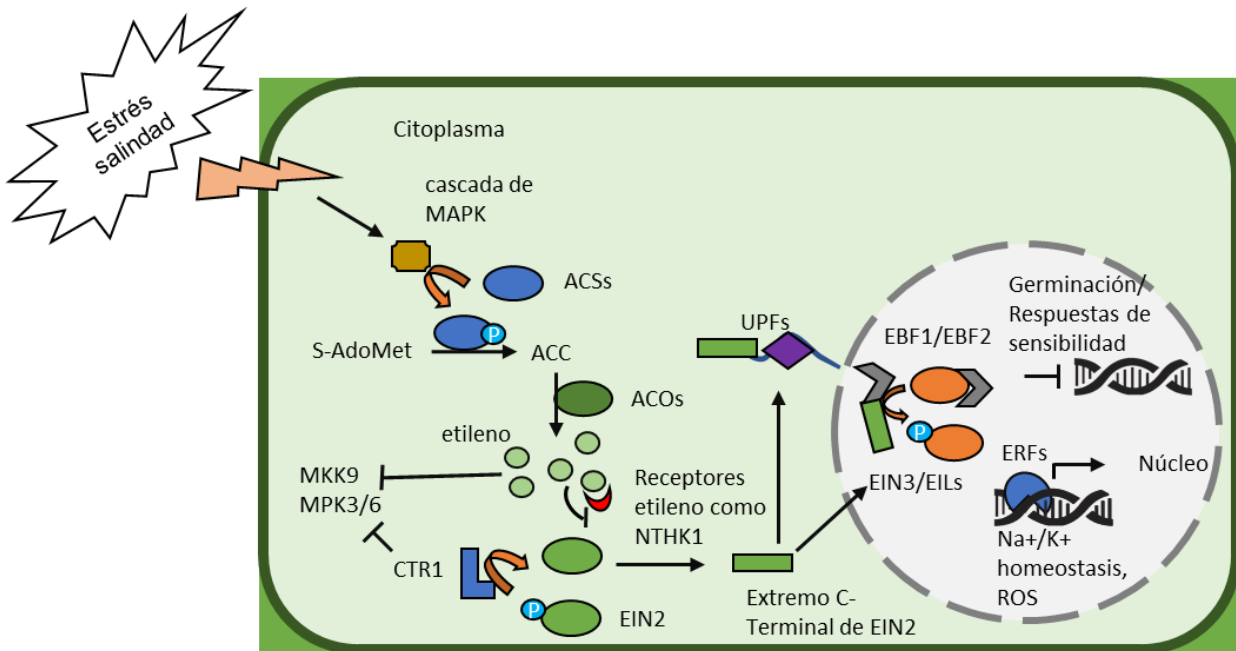


Figura 11. Ruta del etileno de respuesta a estrés por salinidad. Una cascada de MAP-quinasas activa a la enzima ACS sintasa, que cataliza la modificación de S-AdoMet en ACC, el cual es transformado en etileno gracias a la enzima ACO sintasa. El etileno se une a receptores específicos como NTHK1, suprimiendo la actividad de CTR1 y permitiendo la defosforilación de EIN2, liberando su extremo C-terminal. El fragmento C-terminal de EIN2 es transportado al núcleo, donde se marca para la degradación a EBF1/EBF2, permitiendo la liberación de EIN3 y la activación de factores de transcripción de respuesta al etileno (ERFs). Los ERFs iniciarán la transcripción de genes relacionados con el equilibrio iónico, la producción de especies reactivas de oxígeno y la respuesta a estrés por salinidad, y la inhibición de la transcripción de genes relacionados con la germinación. El extremo C-terminal de EIN2 también puede unirse al mRNA mensajero de EBF2, permitiendo su unión al complejo UPF y su posterior degradación.

transformado por la ACC sintasa en ACC, que será oxidado por ACO sintasa en etileno. La 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintasa (ACS), la enzima limitante del proceso de biosíntesis, es diana de numerosas moléculas mensajeras (figura 11). Hay 8 ACCs redundantes en la biosíntesis de etileno codificadas en el genoma de *A. thaliana* (ACS1-8). En condiciones de alta salinidad, los genes que codifican ACS2, ACS6, ACS7, y ACS8 se inducen (Archard *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2005). También se ha visto que los transcritos de ACS1 se acumulan en condiciones de salinidad en células de tabaco (Cao *et al.*, 2006). Sin embargo, plantas de *A. thaliana* transgénicas que expresan constitutivamente el gen ACO1, una enzima ACC oxidasa que regula la conversión de ACC a etileno, de trigo presentan una mayor sensibilidad a salinidad (Chen *et al.*, 2014), mientras que mutantes de *A. thaliana* en ACS7 dan lugar a plantas tolerantes a estrés salino y a otros estreses abióticos (Dong *et al.*, 2011). En base a estos resultados contradictorios algunos autores han propuesto que los genes de biosíntesis de etileno dan lugar a una mayor tolerancia al estrés salino en los estadios tempranos de respuesta al estrés pero, a largo plazo, estas respuestas pueden ser negativas para la planta al inhibir el etileno el crecimiento y desarrollo de la planta (Tao *et al.*, 2015).

El etileno, una vez sintetizado, se une a receptores de etileno, como el receptor de *Nicotiana tabacum* HISTIDINA KINASA 1 (NTHK1), inhibiéndolos. Esto provoca la supresión de la proteína CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) que, en condiciones normales, fosforila y estabiliza a EIN2. Una vez inhibido CTR1, EIN2 es desfosforilado y su extremo C-terminal escindido y translocado al núcleo, donde estabilizará a los factores de transcripción EIN3/EILs (Qiao *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012; Yidong & Shuqun, 2004), evitando su ubiquitinación por parte de complejos ubiquitin ligasas que contienen EBF1/EBF2 y su posterior degradación (Guo & Ecker, 2003). Este proceso está regulado también a nivel traduccional, produciendo el extremo C-carboxilo de EIN2 la degradación del mRNA de EBF2 (Li *et al.*, 2015; Merchante *et al.*, 2015) (Figura 11). Finalmente, EIN3/EILs activan la expresión de genes de respuesta a etileno (Dolgikh *et al.*, 2019). Tratamientos de salinidad también promueven la degradación de EBF1/EBF2 y la actividad transcripcional de EIN3 (Peng *et al.*, 2014). De hecho, los mutantes *ebf1-1* y *ebf1-1 ebf2-1* presentan una acusada tolerancia a la salinidad (Archard *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2014). Se ha descrito cómo la salinidad reprime la expresión del receptor ETR1 (Zhao *et al.*, 2004). Además, mutantes de pérdida de función de receptores de etileno como ETHYLENE RESPONSE (ETR1) dan lugar a plantas tolerantes a salinidad mientras que el mutante de ganancia de función *etr1-1* recupera el fenotipo de sensibilidad a la salinidad (Cao *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2006). Al ser sobreexpresado el receptor *NHKT1* también se da lugar a un incremento en la sensibilidad a salinidad (Cao *et al.*, 2006). Mutantes de pérdida de función en *EIN2* presentan una mayor sensibilidad a salinidad, mientras que la sobreexpresión del extremo C-terminal de EIN2 suprime dicho fenotipo en el mutante *ein2-5* (Cao *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014). El mutante de pérdida de función *ein3-1* también presenta una mayor sensibilidad a salinidad, mientras que la sobreexpresión de *EIN3* da lugar a un fenotipo de tolerancia a sequía (Archard *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2014).

Los genes activados en la respuesta a estrés salino mediada por etileno se pueden dividir en tres tipos (Tao *et al.*, 2015): captadores de especies reactivas de oxígeno como la superóxido dismutasa (SOD) (Kukreja *et al.*, 2005), transportadores de iones como los de la familia HKTs (Jiang *et al.*, 2013) y enzimas sintetizadoras de osmolitos como P5CS (Cheng & Lin, 2013).

2.3 Estrés por alta temperatura

Se estima que en los últimos 55 años los períodos de sequía y altas temperaturas han costado 237 billones de dólares de pérdidas a nivel global (Mehrabi & Ramankutty, 2017). Puesto que numerosos estudios predicen un aumento en el número e intensidad de períodos de altas temperaturas y sequía en los próximos

años como consecuencia del cambio climático y estos cambios provocarán daños devastadores en numerosos cultivos de importancia agroeconómica (Lesk *et al.*, 2016; Lobell *et al.*, 2011), es esencial el mejorar nuestro conocimiento de la respuesta ante estrés por alta temperatura en plantas.

2.3.1 Percepción de la temperatura en la planta

Actualmente no se conoce un termorreceptor canónico en plantas, aunque se han identificado diversos citocromos y la histona H2A.Z como posibles receptores térmicos (Jung *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2010; Legris *et al.*, 2016). Recientemente se ha identificado EARLY FLOWERING 3 (ELF3) como un posible sensor de la temperatura en plantas (Alberti, 2020; Jung *et al.*, 2020). ELF3 presenta un dominio poliQ relacionado con la respuesta a estrés por alta temperatura. Aquellas plantas que presentan un crecimiento acelerado a altas temperaturas presentan alelos de *ELF3* con un mayor tamaño del dominio poliQ. Este dominio también se correlaciona con un comportamiento no soluble de la proteína y, de hecho, se ha observado que ELF3 en plantas de *A. thaliana* a 37°C forma agregados insolubles. Puesto que ELF3 es un inhibidor de la transcripción de numerosos genes de respuesta a alta temperatura, los autores sugieren que la temperatura modula la solubilidad de ELF3, regulando la transcripción de los genes de respuesta a alta temperatura. Además, se ha observado que plantas que sobreexpresan *ELF4*, una proteína que interacciona con ELF3 cerca de su dominio poliQ, presentan una supresión de su respuesta a estrés por alta temperatura, sugiriendo que ELF4 también puede regular la respuesta a estrés por alta temperatura mediante el control de la condensación de ELF3 (Jung *et al.*, 2020).

PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4), una proteína implicada en la señalización de la respuesta a luz, parece ser la principal proteína reguladora de la señalización de la temperatura (Li *et al.*, 2018). PIF4 es fosforilada por el fitocromo B, provocando que PIF4 sea degradada por la ruta del proteasoma 26S (Lorrain *et al.*, 2008). Al aumentar la temperatura el fitocromo B pasa a su estado inactivo, permitiendo la acumulación de PIF4 (Jung *et al.*, 2016). Las temperaturas cálidas inducen la unión de PIF4 a los promotores de diversos genes que codifican para la biosíntesis de auxinas, como *YUCCA8* (YUC8), *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS 1* (TAA1) y los citocromos P450 y CYP79B2 (Franklin *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Además, también se ha observado que PIF4 también activa la expresión de genes implicados en la biosíntesis de brasinosteroides, permitiendo la elongación celular a altas temperaturas (Eunkyoo *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2017). Determinadas proteínas relacionadas con la señalización de giberelinas, como las proteínas DELLA, ejercen una actividad inhibitoria de PIF4, uniéndose a ella e impidiendo su unión al DNA (Li *et al.*, 2018); algunos autores han sugerido que

las proteínas DELLA son reguladores negativos de la termomorfogénesis (Koini *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018).

2.3.2 Respuesta a estrés por alta temperatura

El estrés por alta temperatura provoca diversos efectos en la planta, que incluyen una menor eficiencia fotosintética, apertura estomática e inhibición del crecimiento y de la división celular (Ohama *et al.*, 2017; Wahid *et al.*, 2007).

Los principales inductores de la respuesta a estrés por altas temperatura son las especies reactivas de oxígeno y los iones de calcio (Ca^{2+}) (figura 12). Las especies reactivas de oxígeno activan rápidamente a enzimas antioxidantes como la ascorbato peroxidasa (APX) o la catalasa (CAT) que detoxifican estas moléculas. Otras moléculas, como las peroxidases RbohB y RbohD, también provocan la acumulación de NO, que servirá de mensajero para otras respuestas (Wang *et al.*, 2014). Además, las especies reactivas de oxígeno llevan a la metabolización de lípidos mediante su oxidación y la formación de *Reactive short-chain leaf volatiles* (RSCVs). Los RSCVs al acumularse activan diferentes genes relacionados con la respuesta a alta temperatura (Yamauchi *et al.*, 2008; Yamauchi *et al.*, 2015).

Los iones Ca^{2+} entran debido a la mayor fluidez de la membrana plasmática a altas temperaturas, penetrando en la célula a través de los canales CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CALCIUM CHANNELs (CNGCs) (Finka *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012; Saidi *et al.*, 2009; Sangwan *et al.*, 2002). Se cree que también existen canales, como ANEXINNA 1 (ANN1), que ayudan a mantener una alta concentración citosólica de iones Ca^{2+} después de la entrada de iones a través de los canales CNGCs (Li *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). CALMODULIN3 (CaM3) es el receptor intracelular de Ca^{2+} más importante en plantas, resultando su sobreexpresión en fenotipos resistentes a altas temperaturas (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Existen indicios que hacen pensar que CaM3 podría transducir la señal mediante su interacción con WRKY39, activándolo y, con ello, iniciando la transcripción de genes de respuesta a estrés (Li *et al.*, 2010; Mittler *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2005). Puesto que algunas kinasas que pueden estar implicadas en la activación de algunos HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTORS (Hsf), como miembros de la familia CALCIUM DEPENDENT KINASES (CDPKs), son activadas mediante iones Ca^{2+} , se piensa que pueden ser transductores de las señales de Ca^{2+} (Sangwan *et al.*, 2002). También se ha observado que la kinasa CBK es capaz de unirse a CaM3 y a HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A1S (HSfA1s), fosforilando a este último y siendo un posible mensajero de la señal de estrés (Liu *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008).

Las principales proteínas que regulan la respuesta al estrés por alta temperatura son las HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs) y las enzimas antioxidantes. Las HSPs son clasificadas en HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y SMALL HSP (sHSPs). Las HSP presentan diversas funciones, e.g. aumentar la estabilidad de

las estructuras de las proteínas, mantener la integridad de receptores celulares o promover el correcto ensamblaje de complejos proteicos (Kotak *et al.*, 2007; Mittler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016). El principal factor de transcripción en la respuesta a estrés por alta temperatura es HsfA1s, el cual regula numerosos genes que codifican chaperonas y enzimas, y genes implicados en la respuesta y la memoria a estrés por alta temperatura (Ohama *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2011). En condiciones normales la proteína HsfA1s está unida a HSP70 y HSP90, las cuales la inhiben (Hahn *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 2007). Ante un estrés por alta temperatura HSP70 y HSP90 dejan de interactuar con HsfA1s al aumentar la cantidad de proteínas desnaturalizadas, permitiendo que HsfA1s se dirija al núcleo donde transcribirá diversos factores de transcripción como DREB2A, HsfA2, HsfA7a, HsfBs o MBF1C. Estos factores de transcripción amplificarán la señal transcribiendo numerosos genes de respuesta a estrés por alta temperatura (figura 12).

HsfA1 es regulada principalmente a nivel postraduccional (Ohama *et al.*, 2017). De hecho, algunos autores han sugerido que las proteínas CDK1, CBK3 y PP7 pueden fosforilar a HsfA1 para activarla (Liu *et al.*, 2008, 2007; Ohama *et al.*, 2016; Reindl *et al.*, 1997). Sin embargo, la cuestión aún se mantiene abierta ya que existen indicios de que HsfA1 puede estar regulada por sumoilación. De hecho, plantas que sobreexpresan los sistemas de sumoilación presentan un descenso en la acumulación de HsfA2, un factor de transcripción cuya expresión es activada por HsfA1. Además, se ha identificado mediante espectrometría de masas como las proteínas HsfA1d, HsfA2 y HsfBSb pueden ser ubiquitinadas (Miller *et al.*, 2010; Schuster, 2010).

Otros factores de transcripción actúan de forma independiente de HsfA1, como NAC019, que transcribe genes de respuesta a estrés por alta temperatura (Guan *et al.*, 2014) (figura 12).

HsfA4a es inducido por el estrés oxidativo, activándose al aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno en el ambiente celular, y transcribe el gen que codifica la ascorbato peroxidasa 1 (APx1). HsfA5 inhibe a HsfA4a, formando dímeros con él en condiciones normales (Ohama *et al.*, 2017). Un último factor de transcripción que actúa independientemente de HsfA1s es bZIP28, que bajo condiciones normales está inactivo, unido a *CHAPERON-BINDING IMMUNOGLOBIN PROTEIN* (BIP), pero ante una condición de estrés por alta temperatura es liberado y cortado por las proteasas *SITE 1 PROTEASE* (S1P) y S2P, lo cual induce su relocalización al núcleo, donde transcribirá diversos genes de respuesta a estrés (Srivastava *et al.*, 2014).

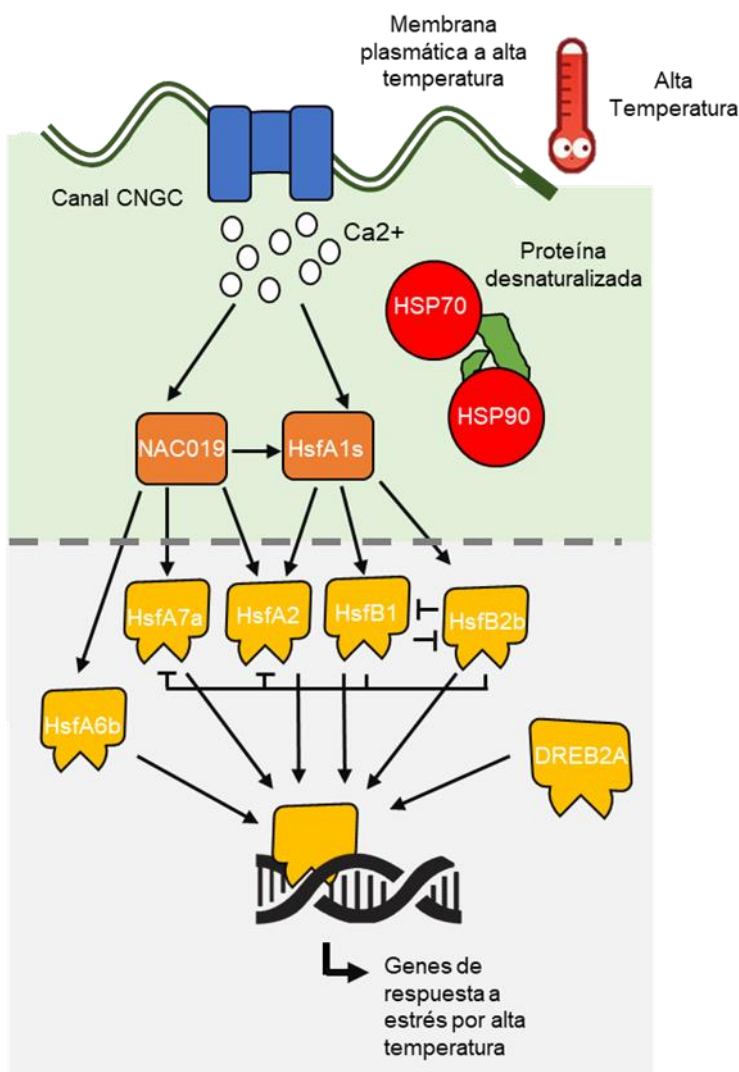


Figura 12. Respuesta a estrés por alta temperatura. Aunque no se conoce un receptor térmico único, se cree que el aumento de fluidez que se da en la membrana plasmática debido al aumento de temperatura provoca la activación de canales CNGC. Estos canales permiten la entrada de iones Ca^{2+} activando a las proteínas NAC019 y HsfA1s que se ven liberadas de las proteínas HSP70 y HSP90 al aumentar el número de proteínas desnaturalizadas. Las proteínas NAC019 y HsfA1s activarán una compleja red de factores de transcripción como HsfA7a, HsfA2, HsfB1 y HsfB2b que transcriben genes de respuesta a estrés por alta temperatura.

Se ha observado que el factor de transcripción DREB2A, implicado en la respuesta a estrés por sequía independiente de ABA, también está implicado en la respuesta a estrés por alta temperatura, induciendo la expresión de HsfA3 (Sakuma *et al.*, 2006a). El papel del silenciamiento transcripcional ante el estrés por alta temperatura aún está desvelándose. Se han publicado trabajos que muestran que la hipermetilación de la histona H2K4 sirve de memoria frente a futuros estreses y la proteína HsfA2 está asociada a la modificación postraduccional de esta histona (Ding *et al.*, 2012; Lämke *et al.*, 2016). También se sabe que a alta temperatura se desencadenan numerosos mecanismos de silenciamiento transcripcional, entre los que se incluye la activación de proteínas como HIT4, DDM1 o MOM1, para evitar la proliferación de los transposones insertos en el genoma de la planta. Además, se ha observado que la vía de silenciamiento transcripcional por RdDM modula la respuesta a estrés por alta temperatura (Popova *et al.*, 2013).

También es conocido el papel de varios miRNAs en la regulación de la respuesta a estrés por alta temperatura; por ejemplo, miR398 reduce la acumulación de transcritos codificantes de numerosas enzimas antioxidantes, permitiendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno y, con ello, induce la activación de HsfAs (Guan *et al.*, 2013). miR156 tiene un papel relevante en la memoria del estrés por alta temperatura que depende de sus dianas, factores de transcripción de la familia SQUAMOSA-PROMOTER BINDING-LIKE (SPL) (Stief *et al.*, 2014).

Aunque se ha comunicado que las temperaturas cálidas inhiben la formación de los siRNAs provenientes de secuencias en sentido y antisentido, los siRNAs provenientes de repeticiones invertidas no parecen verse afectados por la temperatura (Zhong *et al.*, 2013). También se ha observado una disminución de la proteína SGS3, pudiendo ser la causante de la menor biogénesis de siRNAs observada en algunas especies vegetales a temperaturas cálidas (He & Li, 2015; Zhong *et al.*, 2013). Además, los genes *HEAT INDUCED TAS1 TARGET1 (HTT1)* y *HTT2* están sobreexpresados en plantas que presentan termotolerancia, estando regulados por TAS1-siRNAs que lo degradan en condiciones normales. Estos genes también son inducidos por Hsf1a, activando la transcripción numerosos genes *Hsf* e interaccionando y activando diversas HSPs (Li *et al.*, 2014).

Sin embargo, el efecto de la temperatura en el silenciamiento génico parece ser dependiente de la especie estudiada. Por ejemplo, mientras en *N. benthamiana* se ha demostrado que el estrés por alta temperatura aumenta la actividad de silenciamiento génico (Chellappan *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2010), en plantas de tomate y algodón se ha observado el efecto contrario, siendo a baja temperatura cuando se induce una mayor intensidad del silenciamiento génico (Cai *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2006; Tuttle *et al.*, 2008).

En *N. benthamiana*, condiciones de estrés por alta temperatura fomentan la acumulación de siRNAs, lo que provoca una mejora en los sistema de silenciamiento de las plantas (Chellappan *et al.*, 2005). Esta acumulación puede ser debida a una inducción de la transcripción de *RDR6* y *DCL2* (Qu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012), permitiendo una mayor eficiencia de la maquinaria de silenciamiento bajo estrés por alta temperatura.

También se han observado respuestas comunes entre la respuesta a estrés por alta temperatura y el estrés por sequía al estar, en muchos casos, correlacionados. De hecho, la inducción de DREBA2 genera termotolerancia (Mizoi *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2014).

La producción de ABA induce la expresión de varios genes de respuesta a altas temperaturas, como *HSFA6b*, *HSFA2c* o *HSP70* (Huang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017). De hecho, mutantes de *A. thaliana* para genes de la biosíntesis de ABA suelen presentar una mayor sensibilidad a las altas temperaturas y mutantes en la proteínas de estrés por alta temperatura muestran

hipersensibilidad a ABA (Larkindale *et al.*, 2005; Larkindale & Knight, 2002; Leonhardt *et al.*, 2011). Otras relaciones entre las proteínas de respuesta a estrés por alta temperatura y ABA la encontramos en la interacción de sHSP22 y la proteína ABI1 en el control del transporte polar de auxinas (Li *et al.*, 2017).

Además, el ABA coordina la acumulación espacial de ácido salicílico (SA) mediante la liberación de iones de calcio y especies reactivas de oxígeno, que provocan la apertura estomática. Se cree que este mecanismo sirve para dar una respuesta rápida de sucesivo cierre y apertura de los estomas frente a un incremento de la temperatura (Mittler & Blumwald, 2015; Zandalinas *et al.*, 2016).

La hormona ABA también controla la farnesilación de diversas proteínas, entre las que se incluyen proteínas de respuesta a estrés por alta temperatura (Barghetti *et al.*, 2017; Cutler *et al.*, 1996).

Finalmente, algunos autores también han teorizado sobre el posible impacto que el ABA puede tener en la respuesta de la memoria de estrés a través de la interacción de diversas HSFs y proteínas implicadas en la señalización de la respuesta de ABA con proteínas remodeladoras de la cromatina (Bulgakov *et al.*, 2019).

3. Interacciones entre estreses abióticos y bióticos en planta

3.1 Enfermedades virales en plantas en los tiempos del cambio climático

Actualmente, el Panel Internacional para el Cambio Climático (IPCC) prevé un incremento en la temperatura global, episodios de sequía y aumento de la salinidad de los suelos (Shukla *et al.*, 2019). Estos cambios se espera que afecten no solo a los cultivos, sino también a las enfermedades virales que los afectan, que verán alteraciones en la tasa de supervivencia del hospedador, el rango de hospedador, y la severidad, incidencia y difusión de las enfermedades (Eastburn *et al.*, 2011; Elad & Pertot, 2014; Jones, 2016).

Los virus son parásitos intracelulares obligados; necesitan de la maquinaria molecular del hospedador para replicarse. Por ello, alteran los mecanismos moleculares de la planta para completar su propio ciclo de replicación, provocando efectos deletéreos en su hospedador.

En condiciones de campo, los patógenos vegetales y los estreses abióticos interactúan de diferentes maneras. Se han llegado a documentar en la naturaleza complejas interacciones entre virus, plantas y estreses abióticos, que pueden dar lugar a una mayor tolerancia a uno de los estreses (Roossinck, 2015; Roossinck & Bazán, 2017), provocando la necesidad de un replanteamiento de los conceptos de parasitismo, simbiosis y el valor ecológico de los virus en la naturaleza (González *et al.*, 2020; Rouhier & Jacquot, 2008). Estas interacciones

pueden proveer tanto de resistencia como susceptibilidad a uno o ambos estreses dependiendo de la especie vegetal, el patógeno y la intensidad del estrés (Aguilar *et al.*, 2017). De hecho, investigaciones sobre el efecto de un estrés y la suma de varios de ellos indican que no se puede predecir la respuesta de la planta a varios estreses simultáneos en base a la respuesta que da por separado a cada uno de ellos (Atkinson & Urwin, 2012).

El estudio de las interacciones entre virus y estreses abióticos ha generado numerosos artículos que muestran las complejas interacciones que se producen en diversos patosistemas, avanzando en el conocimiento de la ecología viral y las relaciones patógeno-hospedador (Malmstrom *et al.*, 2011; Tennant & Fermin, 2018). A continuación, se discutirán los artículos publicados en este campo, profundizando en las interacciones entre la infección viral y la respuesta a estrés térmico e hídrico y las interacciones entre patógenos y respuesta a estrés salino.

3.1.1 Interacciones entre virus y estrés por sequía en planta

Algunos estudios sugieren que el efecto de la sequía puede inhibir la respuesta defensiva de la planta (Goel *et al.*, 2008; Mohr & Cahill, 2003), sugiriendo que el estrés por sequía induciría una mayor acumulación viral. Sin embargo, se ha observado que durante el estrés por sequía plantas de *A. thaliana* infectadas con *Turnip mosaic virus* (TuMV) no muestran un incremento en la acumulación viral (Prasch & Sonnewald, 2013). De hecho, la combinación del estrés por sequía y por alta temperatura, induce una menor severidad de los síntomas de TYLCV en tomate (Wafa'a Odeh, 2018). Por otro lado, no se han observado interacciones entre la respuesta al estrés por sequía y la infección por *Peanut stunt virus* (PSV) en el hospedador *Trifolium repens* (McLaughlin & Windham, 1996). Tampoco se han observado alteraciones en la carga viral de plantas de *Zea mays* infectadas con *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) en condiciones de estrés por sequía (Olson *et al.*, 1990). El estrés por sequía tampoco afecta a *Citrus tristeza virus* (CTV), manteniéndose una carga viral similar entre plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) sometidas a estrés hídrico y plantas en condiciones control. Aunque se ha observado un cierto aumento de la cantidad de prolina, un conocido aminoácido osmoprotectante, en plantas de naranja dulce infectadas, no parecen existir diferencias significativas en la acumulación de prolina entre plantas infectadas con CTV y plantas control bajo estrés hídrico (Silva *et al.*, 2019).

Esta divergencia de resultados se debe a que distintos virus pueden dar lugar a diferentes respuestas, dependiendo también del hospedador. Por ejemplo, se ha mostrado que diferentes ecotipos de *A. thaliana* infectados con *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) y sometidos a estrés por sequía tienen diferentes respuestas a ambos estreses. La carga viral y el porcentaje de transmisión se ven afectados en diferente intensidad en cada ecotipo, siendo estas diferencias

posiblemente debidas a cambios en floración, desarrollo, y velocidad de flujo del floema (Bergès *et al.*, 2018).

Se conocen varios virus que inducen una mayor tolerancia a períodos de sequía. Por ejemplo, plantas de *N. benthamiana* infectadas con *Tobacco mosaic virus* (TMV) muestran una mayor tolerancia a estrés hídrico, al igual que plantas de remolacha y *Chenopodium amaranticolor* infectadas con *Cucumber mosaic Virus* (CMV), plantas de arroz infectadas con *Brome mosaic virus* (BMV) y plantas de *N. benthamiana* infectadas con *Tobacco rattle virus* (TRV) (Xu *et al.*, 2008). CMV también parece inducir una mayor tolerancia a estrés por sequía en plantas de tomate. Se ha observado cómo plantas de tomate infectadas en condiciones de sequía presentan una mayor acumulación de agua en los tejidos que plantas sin infectar (Hosseini *et al.*, 2018). Recientemente, también se ha demostrado como el virus asintomático *Rice tungro spherical virus* (RTSV) induce una mayor tolerancia a sequía en arroz (Encabo *et al.*, 2020).

Sin embargo, también se han publicado estudios de campo en los que no se observa una mayor tolerancia o sensibilidad a episodios de estrés hídrico en plantas de remolacha azucarera infectadas con *Beet cryptic virus* (BCV) (Xie *et al.*, 1994), sugiriendo que la respuesta de la planta a la combinación de estreses abióticos no se puede predecir, dependiendo de numerosos factores como la especie hospedadora, la especie viral, y la duración e intensidad del estrés abiótico (Aguilar *et al.*, 2017).

La aparición de estos efectos beneficiosos en situaciones de estrés ha sido denominado mutualismo condicionado, presentando la capacidad de dar lugar a importantes eventos evolutivos (Hily *et al.*, 2016; Michalakis *et al.*, 1992; Roossinck, 2011).

Diversos estudios sugieren que no hay un mecanismo conservado por el que las infecciones virales desencadenen una mayor tolerancia al estrés por sequía. Por ejemplo, se ha observado que plantas de *N. benthamiana* infectadas con *Tailflower mild mottle virus* aislado Cervantes presentan una mayor tolerancia a estrés hídrico, correlacionándose con una mayor acumulación de osmolitos como la prolina, una mayor actividad de enzimas antioxidantes y una mayor expresión de genes inductores de la respuesta a estrés por sequía (Dastogeer *et al.*, 2018). También se ha observado cómo plantas de tomate infectadas en condiciones de sequía presentan una mayor concentración de carotenoides y clorofila-a en comparación con plantas no infectadas, dando lugar a una mayor acumulación de agua en los tejidos de las plantas infectadas (Hosseini *et al.*, 2018).

Los virus también pueden alterar las respuestas fisiológicas al estrés por sequía. Por ejemplo, viñedos infectados con *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) y expuestos a episodios de sequía muestran un incremento en su conductancia estomática (*gs*), asimilación de CO₂ (*AN*) y acumulación de

diferentes aminoácidos como treonina, isoleucina y prolina (El Aou-ouad *et al.*, 2018). También se ha observado que GLRaV-3 induce cambios en la conductancia hidráulica de la planta, provocando el cierre estomático; sin embargo, el efecto en la conductancia hidráulica es despreciable en condiciones de sequía. Tampoco se ha observado que las plantas de vid presenten cambios en la eficiencia del uso de agua entre plantas infectadas y no infectadas en condiciones control y de sequía (El Aou-ouad *et al.*, 2017). Además, algunos estudios sugieren que MDMV podría mantener la turgencia de la hoja durante cortos períodos de estrés hídrico, concediendo una mayor tolerancia al estrés por sequía (Lindsay & Gudauskas, 1974; Olson *et al.*, 1990). También se ha observado que algunos virus, como *Barley yellow dwarf virus* (BYDV), provocan un aumento en el potencial hídrico de las raíces de plantas infectadas, dando lugar a una mayor captación de agua y una reducción de los síntomas de estrés hídrico durante períodos de sequía (Davis *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha demostrado que el efecto de la tolerancia al estrés por sequía producido por CMV al infectar *A. thaliana* es producido por la proteína viral 2b (Westwood *et al.*, 2013), mostrando que en determinadas condiciones una proteína viral puede provocar la aparición de una característica beneficiosa para el hospedador. La proteína 2b induce una mayor tolerancia a la sequía en *A. thaliana* interfiriendo en la transducción de la señal mediada por ABA y produciendo la inhibición de genes de respuesta a estrés hídrico (Westwood *et al.*, 2013). Otros estudios indican que coinfecciones con PVX y *Plum pox virus* (PPV) producen una mayor tolerancia a estrés hídrico en sus hospedadores durante episodios de estrés por sequía, comparándolos con infecciones con sólo uno de los virus y plantas no infectadas (Aguilar *et al.*, 2017). Se ha observado en plantas infectadas con PPV y PVX una mayor producción de rafinosa, serina y treonina, mientras que la proteína P25 de PPV induce una mayor producción de putrescina, siendo todas ellas moléculas relacionadas con la respuesta a estrés hídrico. De hecho, la expresión estable de la proteína P25 produce una mayor concentración de estomas además de incrementar dramáticamente la síntesis de SA, inhibiendo la producción de ABA. Recientemente, el mismo grupo ha demostrado que la inducción de resistencia a sequía observada en plantas infectadas con PPV y PVX, PPV, y PVX expresando la proteína P25 de PPV, es suprimida en condiciones de estrés por alta temperatura y alta concentración de CO₂ (30 °C y 970 ppm de CO₂) (Aguilar *et al.*, 2020). Estos resultados ponen en evidencia cómo la respuesta de la planta a los estreses abióticos y bióticos es específica de la combinación de estreses a la que la planta es sometida.

3.1.2 Interacciones entre virus y estrés por alta temperatura en planta

Desde principios del siglo XX se ha descrito cómo determinados virus presentan un detrimento en su acumulación en ambientes con altas temperaturas (Kassanis, 1952). De hecho, actualmente, mediante la aplicación de altas

temperaturas a callos y ápices vegetales, se ha conseguido la propagación *in vitro* de material vegetal libre de virus (Dahal *et al.*, 1998; Lizárraga *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018, 2021), denominándose a este proceso termoterapia.

Sin embargo, la aplicación de alta temperatura a plantas infectadas puede dar lugar a diferentes resultados, dependiendo de la duración e intensidad del tratamiento (Dahal *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2016), así como del virus y el hospedador (Hily *et al.*, 2016; Llamas-Llamas. *et al.*, 1998). Por ejemplo, *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) presenta un aumento en su acumulación en plantas de *N. tabacum* y *D. stramonium* en condiciones de estrés térmico, mientras que en plantas de *P. ixocarpa* infectadas con TSWV y sometidas a alta temperatura se observa una disminución de la carga viral (Llamas-Llamas *et al.*, 1998). De hecho, se ha observado que el estrés por alta temperatura tiene efectos dispares en la replicación y el movimiento viral (Ghandi *et al.*, 2016; Kido *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2016; Makarova *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016). Los virus *Melon necrotic spot virus* (MNSV) en melón, *Cucumber mosaic virus* (CMV) en *N. tabacum*, *Potato virus Y* en patata, *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) en judía, *Barley yellow dwarf virus-PAV* en trigo, o TYLCV en tomate, presentan un aumento de la acumulación viral al someter al hospedador a un tratamiento de alta temperatura (Ghandi *et al.*, 2016; Kido *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2018; Nancarrow *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016), mientras que *Turnip crinkled virus* en *A. thaliana*, *Potato virus X* y *Potatovirus Y* en *Nicotiana glutinosa* y *N. benthamiana* o *Citrus psorosis virus* (CPsV) en naranja presentan una menor acumulación cuando la infección se produce en condiciones de alta temperatura (Del Toro *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Velázquez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). También se ha demostrado que plantas de banano infectadas con *Banana streak virus* (BSV) a temperaturas de 30-35°C presentan una disminución o la completa desaparición de los síntomas virales (Dahal *et al.*, 1998), de forma similar a lo observado en infecciones de *African cassava mosaic virus* (ACMV) y *Sri Lankan cassava Mosaic virus* (SLCMV-LK) en plantas de *N. benthamiana*, observándose la desaparición de los síntomas virales cuando la infección se produce a 30°C (Patil & Fauquet, 2015).

Además, los efectos del estrés abiótico pueden provocar distintos efectos en la carga viral a lo largo del tiempo, documentándose casos en los que provoca una rápida acumulación viral seguida de un brusco descenso (Obrepalska-Stęplowska *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016), dificultando la interpretación de los resultados. De hecho, diversos estudios indican que, en determinados casos, la acumulación viral es dependiente de la intensidad del estrés abiótico, existiendo un rango de temperatura óptima de infección más allá del cual la acumulación viral disminuye (Chung *et al.*, 2016; González *et al.*, 2020; Harrison, 1956; Roossinck, 1991; Singh *et al.*, 2018).

Existen diversos mecanismos que desencadenan la inhibición de la acumulación viral en determinados patosistemas en condiciones de estrés por alta

temperatura. Por ejemplo, en el momento en el que se descubrieron los mecanismos por los que más tarde se desarrollaría la termoterapia, se estableció que la carga viral es el resultado de la síntesis de partículas virales por parte del virus y su degradación por parte del hospedador. Según este modelo, las altas temperaturas facilitarían la degradación de las moléculas virales por parte del hospedador (Johnstone, 1971). Sin embargo, este modelo no explica por qué temperaturas que no llegan a alcanzar la temperatura de inactivación del virus provocan la práctica inhibición de la replicación viral. El consenso actual establece que el fenómeno de silenciamiento génico produce una disminución de la carga viral en plantas infectadas a altas temperatura (Ma *et al.*, 2016; Zhang, 2012; Zhao *et al.*, 2016). El estrés térmico induce una rápida e intensa respuesta de silenciamiento génico que se superpone al efecto de los supresores del silenciamiento génico virales, promoviendo el silenciamiento de los genes del virus y, por tanto, dificultando su ciclo replicativo y su acumulación en el hospedador (Chellappan *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012).

Hay indicios que sugieren que durante el estrés por alta temperatura la inducción de la expresión de *DCL2* y *RDR6* provocan una acumulación de siRNAs que mejoran la eficiencia del silenciamiento génico de la planta, dando lugar a una mejor defensa del hospedador ante patógenos virales (Chellappan *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, resultados obtenidos con las proteínas supresoras del silenciamiento 2b de CMV y HCPPro de PVY en hojas de *N. benthamiana*, muestran que no hay diferencia en su actividad supresora del silenciamiento génico a partir de los 30°C (Del Toro *et al.*, 2015), indicando que los mecanismos de silenciamiento génico no parecen verse afectados por la temperatura en este patosistema.

Otro mecanismo utilizado por los virus en infecciones producidas durante estrés térmico es la modulación de la respuesta al estrés abiótico mediante cambios en la expresión génica. Por ejemplo, se ha observado que algunos virus también pueden alterar el proteoma de sus hospedadores para mitigar los efectos de las altas temperatura. La proteína CP de TYLCV pueden interactuar con la proteína HSP90, inhibiendo su actividad y provocando una disminución en la acumulación de la proteína HSFA2 (Gorovits & Czosnek, 2017; Gorovits *et al.*, 2017), factor de transcripción de genes de respuesta a estrés por alta temperatura. Además, se ha observado que tanto HSFA2 como HSP90 forman agregados junto a la proteína CP y que la expresión de los genes codificantes para ambas proteínas viene condicionada por la infección de TYLCV y la existencia de resistencia por parte del cultivar de tomate infectado (Anfoka *et al.*, 2016), sugiriendo un mecanismo por el que el virus pueda provocar una mayor tolerancia a las altas temperaturas. De hecho, este mismo estudio sugiere que las proteínas de TYLCV pueden promover una mayor tolerancia al estrés por alta temperatura en tomate (Anfoka *et al.*, 2016). También se ha observado una mayor tolerancia al estrés por alta temperatura en las células colindantes a los puntos necróticos

producidos en hojas de *Phaseolus vulgaris* (judía) por TMV, TSWV, *Tobacco ringspot virus* (TRSV) y *Alfalfa Mosaic virus* (AMV) (Yarwood, 1957).

Por otro lado, los resultados de un estudio reciente llevado a cabo por Farahbakhsh y colaboradores sugieren que los cambios provocados por la infección de *Wheat stripe mosaic virus* (WSMV) en la concentración de diferentes metabolitos en plantas de trigo podría explicar la disrupción de la resistencia viral observada en plantas resistentes a WSMV expuestas a alta temperatura (32°C) (Farahbakhsh *et al.*, 2019).

Además, se ha observado que los virus pueden alterar la síntesis de aminoácidos, provocando la acumulación de aminoácidos osmoprotectores, proteínas de respuesta a estrés oxidativo y chaperonas (Obrępalska-Stęplowska *et al.*, 2015; Gorovits *et al.*, 2017), alterando la respuesta al estrés por alta temperatura mediante el bloqueo de señales de estrés mediadas por ROS, la estabilización de la membrana plasmática o el mantenimiento de la estructura de las proteínas celulares. Esta regulación puede afectar a la producción de hormonas relacionadas con la respuesta a estreses abióticos, como el ABA, o a estreses bióticos, como el JA o el SA, induciendo cambios en la respuesta a ambos tipos de estrés. De hecho, se ha observado que en plantas de *A. thaliana NahG*, el tratamiento con ABA exógeno promueve la disminución de la acumulación del virus TCV (Yang *et al.*, 2013), mientras que la disminución de *Bamboo mosaic virus* mediada por ABA se produce a través de la inducción de AGO2 y AGO3 (Alazem *et al.*, 2017), y el SA inhibe el aumento de la acumulación viral de PVY observado en plantas de patata sometidas a 28°C (Makarova *et al.*, 2018).

3.1.3 Interacciones entre patógenos y estrés por salinidad en planta

Generalmente, se ha considerado que el estrés por salinidad inhibe la acumulación de patógenos vegetales. Sin embargo, debido a la complejidad de las respuestas, es difícil realizar generalizaciones. Por ejemplo, períodos cortos de estrés salino predisponen a tomate a la infección por el patógeno *Phytophthora capsici*, provocando infecciones más intensas, siendo este fenómeno producido por una inducción de la síntesis de ABA, lo que provoca una mayor atracción de las raíces a las zoosporas del patógeno (DiLeo *et al.*, 2018; Pye *et al.*, 2018; Triky-Dotan *et al.*, 2005). También en bacterias como *P. syringae* se ha observado que al aplicar el patógeno junto al estrés salino se produce un efecto aditivo, siendo más pronunciado el impacto de ambos estreses (Chojak-Koźniewska *et al.*, 2018). En pepino también se ha observado que *Pseudoperospora cubensis* tiene un efecto aditivo a la salinidad en la reducción del crecimiento y la actividad fotosintética y un aumento en la actividad de diversas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), así como del malondialdehído, molécula resultante de la oxidación lipídica (Nostar *et al.*, 2013). Estos efectos aditivos que se observan en algunas relaciones

hospedador-patógeno al ser sometidas a estrés salino pueden deberse a un desequilibrio en la capacidad de la planta hospedadora de eliminar los compuestos oxidados provocados por el estrés abiótico de la salinidad y el estrés biótico de la infección (Chojak *et al.*, 2012; Nostar *et al.*, 2013).

También la infección de plantas de guisante del cultivar BRS-Maratoa por *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) tiene un efecto aditivo al interactuar con el estrés salino, provocando una disminución en clorofila total y carotenoides en comparación con plantas expuestas únicamente a estrés salino. Además, cuando la salinidad se produce 24 horas antes de la infección, la acumulación viral de CPSMV aumenta visiblemente, a pesar de ser un cultivar resistente a este patógeno. Esta mayor acumulación viral viene acompañada de una mayor cantidad de H₂O₂ y enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, así como compuestos fenólicos, indicando un mayor daño en las plantas infectadas 24 horas después de la exposición al estrés salino. Los resultados sugieren que el cultivar BRS-Maratoa, resistente al virus, se vuelve sensible a CPSMV tras sufrir episodios de estrés salino (Varela *et al.*, 2019). El virus *Tomato yellow leaf curl sardinia virus* (TYLCSV) también presenta un efecto aditivo al infectar plantas de tomate en condiciones de estrés por salinidad. Se ha observado que plantas de tomate del cultivar Mouna HF1, sensible a salinidad y TYLCSV, presenta una mayor acumulación viral al ser sometidas a períodos de estrés salino. Asimismo, las plantas de tomate del cultivar San Miguel, resistente a salinidad y TYLCSV, presentan una pérdida de resistencia a TYLCSV en condiciones de salinidad, mostrando una mayor acumulación viral (Gharsallah *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha demostrado que *Eggplant mottled crinkle virus* presenta una menor acumulación viral en plantas de *N. benthamiana* bajo tratamiento de estrés por salinidad (Moldakimova *et al.*, 2012).

Aunque no se han encontrado numerosos estudios sobre el efecto de la infección viral en la respuesta a estrés salino, existe una extensa literatura sobre el efecto de organismos simbioses y mutualistas en condiciones de estrés por salinidad. Por ejemplo, rizobacterias como *Pseudomonas putida* y *Novosphingobium* sp. al asociarse a *Citrus macrophylla* Wester promueven un aumento de SA que da lugar a una atenuación de los síntomas provocados por estrés salino (Vives-Peris *et al.*, 2018). De hecho, estudios en suelos salinos indican cambios en la diversidad de hongos que interactúan con las plantas, aumentando el número de especies de géneros como *Fusarium* o *Alternaria* (Hammami *et al.*, 2016). Estudios en *F. culmorum* indican que la relación simbiótica de este hongo con mono y dicotiledóneas da lugar a una mayor tolerancia a estrés salino en plantas que habitan entornos costeros, mitigando el daño producido por ROS (Rodríguez *et al.*, 2008).

Varios microorganismos, principalmente hongos, han mostrado su capacidad de reducir el estrés salino en plantas o establecer relaciones mutualistas en condiciones de estrés salino (Daliakopoulos *et al.*, 2019; Gaiand, 2016; Mastouri,

et al., 2010; Qin *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2008; Sánchez-Montesinos *et al.*, 2019). De hecho, actualmente se comercializan mezclas biológicas que permiten aliviar levemente los síntomas de estrés salino en cultivos de importancia económica como el calabacín (Yildirim *et al.*, 2006).

Se ha observado, por ejemplo, que los hongos endofíticos *Phoma glomerata* LWL2 y *Penicillium sp.* LWL3 inducen una mayor resistencia a estrés salino al infectar plantas de calabacín, manteniendo una relación simbiótica con su hospedador (Waqas *et al.*, 2012). Los hongos simbioses endofíticos como *P. glomerata*, *Penicillium sp.* LWL3, *T. harzianum* o *Serendipita indica*, evitan la toxicidad provocada por las altas concentraciones de iones Na⁺ y Cl⁻ evitando su acumulación en raíz y alterando el balance redox para optimizar la respuesta al estrés (Ahmad *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2012; Rawat *et al.*, 2011; Waqas *et al.*, 2012; Yasmeen & Siddiqui, 2018) o aumentando la producción de ácido ascórbico y de aminoácidos osmoprotectores como la prolina, manteniendo el potencial hídrico de las raíces (Baltruschat *et al.*, 2008; Jogawat *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2012; Rawat *et al.*, 2011; Yasmeen & Siddiqui, 2018).

Por último, también existen bacterias como *A. piechaudii*, *P. putida*, *Bacillus licheniformis* RS656, *Zhihengliuella alba* RS111, y *Brevibacterium iodinum* RS1 que, mediante una disminución de la síntesis de etileno, generan una mayor resistencia a estrés salino en su hospedador (Cheng *et al.*, 2007; Mayak *et al.*, 2004; Siddique *et al.*, 2011).



Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis es analizar la interacción entre diferentes tipos de estreses abióticos y el estrés bióticos producido por una infección viral en el en el patosistema TYLCV-*Solanaceae*. Para abordar este objetivo se han establecido los siguientes subobjetivos:

- Estudio de la interacción entre la infección por TYLCV y el estrés por sequía en *N. benthamiana* y tomate. Para ello, se ha estudiado tanto la influencia del estrés hídrico en la infección por TYLCV como el efecto de la infección en la respuesta del hospedador al estrés por sequía. Los experimentos realizados para la consecución de este objetivo se muestran en el capítulo 1 y en el anexo 1.
- Examen de la interacción entre la infección por TYLCV y el estrés por salinidad en *N. benthamiana* y tomate. Para llevar a cabo este objetivo se ha analizado el efecto del estrés salino en la infección por TYLCV y el efecto de la infección en la respuesta de la planta a estrés por salinidad. Los experimentos desarrollados para alcanzar este objetivo se muestran en el capítulo 2.
- Análisis de la interacción entre la infección por TYLCV y el estrés por alta temperatura en *N. benthamiana* y tomate. Para realizar este objetivo se estudió el efecto del estrés térmico en la infección por TYLCV. Los resultados de los experimentos realizados para conseguir este objetivo se muestran en el capítulo 3.

Resultados



Capítulo 1

Interacción entre el estrés hídrico y la infección por geminivirus en solanáceas.

El contenido de este capítulo ha sido parcialmente publicado en Plant Biotechnology Journal (Corrales-Gutierrez M. *et al.* 2020. The C4 protein from the geminivirus Tomato yellow leaf curl virus confers drought tolerance in Arabidopsis through an ABA-independent mechanism. Plant Biotechnol J. 2019;1–3. doi: 10.1111/pbi.13280). El manuscrito original está incluido en el Anexo I.

INTRODUCCIÓN

Diversos estudios señalan que el actual cambio climático provocará un continuado aumento de la concentración de CO₂, la temperatura y la salinidad en numerosas regiones costeras, así como una disminución en la disponibilidad de agua dulce (Dasgupta *et al.*, 2015; Rhein *et al.*, 2013; Skliris *et al.*, 2018). Estos cambios tendrán un gran impacto en la productividad de diversos cultivos, lo cual, teniendo en cuenta el crecimiento de la población, es un riesgo para la seguridad alimentaria global (Shukla *et al.*, 2019). Se prevé que la escasez de agua, simultánea al aumento de la temperatura, expondrán a los cultivos a intensos períodos de estrés por sequía.

Actualmente, la sequía causa importantes pérdidas en los campos de cultivo, produciendo un impacto negativo en el crecimiento, la fisiología y la reproducción de los mismos (Carr, 2017; Khan *et al.*, 2018). Por ello, es esencial el estudio de los mecanismos que producen tolerancia al estrés hídrico con el fin de obtener cultivos de alto rendimiento que puedan tolerar futuras condiciones ambientales.

Las plantas han adoptado un amplio rango de estrategias para escapar de los efectos negativos causados por la sequía entre los que se incluye la optimización del sistema radicular de captación de agua, el cierre de estomas para limitar la pérdida de agua causada por la transpiración, la acumulación de moléculas osmoprotectoras o la producción de ácido abscísico (ABA) (considerado tradicionalmente como el principal regulador de la respuesta a estrés por sequía en plantas) (Fang & Xiong, 2015; Fujita *et al.*, 2011; Verslues *et al.*, 2006). Este intrincado escenario hace de la resistencia a sequía un rasgo de gran complejidad, de naturaleza poligénica, con baja heredabilidad y fuertemente influenciado por las interacciones genotipo-ambiente (Fang & Xiong, 2015). Como consecuencia, la obtención de variedades resistentes a la sequía por las técnicas de mejora tradicional, incluso con estrategias de retrocruzamiento y genotipado de alto rendimiento, consumen una gran cantidad de recursos y requieren de una inversión prolongada en el tiempo sin que, hasta el momento, hayan producido resultados notables (Hu & Xiong, 2014). Una aproximación complementaria a las técnicas de mejora genética tradicional es la transformación de cultivos mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, las restricciones legales aplicadas a los organismos genéticamente modificados (GMOs) en diversos países, dificultan la aplicación industrial de estos procedimientos de mejora (Telem *et al.*, 2013). Independientemente de la aproximación utilizada, en un escenario de calentamiento global y aumento exponencial de la población, es esencial el conocer las interacciones y redes reguladoras de la respuesta al estrés por sequía en plantas, con el fin de generar cultivos tolerantes al estrés por sequía (Fang & Xiong, 2015).

Por otro lado, cabe mencionar que las interacciones de las plantas con los patógenos pueden modificar la respuesta de la planta a estreses abióticos,

aumentando la complejidad de la respuesta a estrés por sequía en la naturaleza (Aguilar *et al.*, 2017; Prasad & Sonnewald, 2013). Diferentes trabajos han descrito que las infecciones virales pueden inducir resistencia a sequía en su hospedador a partir de diferentes mecanismos dependientes de la combinación virus-hospedador (Aguilar *et al.*, 2017; Anfoka *et al.*, 2016; Westwood *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008). Estos estudios sugieren que la identificación de los mecanismos moleculares tras este efecto viral podría desvelar nuevas estrategias para la generación de plantas resistentes al estrés.

Los datos publicados hasta la fecha sugieren que el mecanismo que induce tolerancia a estrés por sequía difiere según el sistema virus-hospedador. Por ejemplo, se ha descrito que al infectar plantas de *Arabidopsis thaliana*, el virus CMV (*Cucumber mosaic virus*) interfiere en la respuesta a sequía ABA-dependiente mediante la proteína viral 2b (Westwood *et al.*, 2013). Sin embargo, otro estudio (Xu *et al.*, 2008) ha detectado cambios en los niveles de ácido salicílico (SA) seguidos a la infección por CMV, así como un aumento de numerosas moléculas osmoprotectoras y antioxidantes en plantas de arroz infectadas con *Brome Mosaic virus* (BMV) y plantas de remolacha infectadas por CMV previa y posteriormente a períodos de estrés por sequía. Además, se ha demostrado que tanto *Tobacco Mosaic virus* (TMV) como CMV inhiben el desarrollo de estomas en plantas susceptibles a estos patógenos ante situaciones de estrés hídrico (Murray *et al.*, 2016). Estos descubrimientos sugieren que la infección viral genera una mayor tolerancia a sequía, aunque el mecanismo molecular no esté conservado.

Los virus son parásitos intracelulares y necesitan que sus hospedadores les provean de todos los elementos necesarios para su replicación, propagación y supervivencia. Por ello, cualquier estrategia que permita aumentar la tolerancia a un determinado estrés abiótico en su hospedador, como la sequía por ejemplo, también favorecerá al virus durante períodos de estrés ambiental (Westwood *et al.*, 2013). Bajo esta premisa, algunos autores han sugerido que en períodos de estrés abiótico los virus podrían actuar como simbiosis mutualistas, induciendo características beneficiosas en sus hospedadores bajo condiciones de estrés (Groen *et al.*, 2016; Roossinck, 2011). Sin embargo, si la virulencia es demasiado elevada, los efectos beneficiosos conferidos por la tolerancia al estrés abiótico podrían ser excedidos por el coste que tiene la infección, como se sugiere en el trabajo de Aguilar y colaboradores (2017). En este trabajo se muestra como la tolerancia a sequía inducida por el virus podría compensar la disminución en la cantidad de progenie en plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con *Potato virus X* (PVX), pero no en aquellas plantas infectadas con *Plum pox virus* (PPV) o con la combinación PPV y PVX. Esto es debido a que plantas infectadas con PPV o PPV y PVX, aunque presentan mayor tolerancia a la sequía, también presentan una disminución en el número y tamaño de las semillas producidas en comparación con las plantas no infectadas (Aguilar *et al.*, 2017).

La combinación de estrés abiótico-estrés biótico en una misma planta puede modificar la respuesta de la planta a ambos tipos de estrés y de esta forma también se ha descrito que la respuesta de las plantas a estreses bióticos se puede ver alterada por estreses abióticos tales como la sequía, el calor, el frío y la salinidad (Aguilar *et al.*, 2015; Chellappan *et al.*, 2005; Varela *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). A pesar de que algunos autores sugieren que la sequía tiene un efecto supresor sobre la respuesta de defensa de las plantas a los patógenos (Goel *et al.*, 2008; Mohr & Cahill, 2003), se han observado efectos dispares sobre la infección viral (Bergès *et al.*, 2018). Esto es debido a que el efecto del estrés por sequía en la infección es variable según el hospedador y la especie viral utilizados (Aguilar *et al.*, 2017; Bergès *et al.*, 2018).

Con el fin de caracterizar la interacción entre el estrés hídrico y la infección por geminivirus en plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) cv. Moneymaker y *N. benthamiana*, hemos realizado dos aproximaciones experimentales distintas. En primer lugar, determinaremos el efecto que el estrés por sequía tiene sobre la interacción planta-virus mediante la aplicación de un tratamiento de sequía en las primeras etapas de la infección viral (5 días post-infección, dpi). En segundo lugar, estudiaremos el efecto que la infección viral tiene sobre la interacción planta-estrés hídrico, mediante la aplicación de un tratamiento de sequía en plantas con una infección establecida (21 dpi).

RESULTADOS

1.1 Efecto del estrés por sequía en la infección de TYLCV en *N. benthamiana* y tomate.

1.1.1 Diseño experimental.

Con el fin de estudiar el efecto que el estrés hídrico pudiera tener sobre la infección del geminivirus TYLCV en tomate, así como en *N. benthamiana*, agroinoculamos plantas de *N. benthamiana* y de tomate con TYLCV y en estadíos muy tempranos de la infección se sometieron a estrés por sequía. Se agroinocularon plantas de *N. benthamiana* y tomate de 3 semanas de edad (12 plantas de cada especie), con un clon infectivo de TYLCV (día 0) o con un vector binario sin virus (pGWB501) como control negativo (*mock*). La mitad de estas plantas comenzaron a someterse a un tratamiento de sequía a los 5 dpi, para que todas las plantas presentaran condiciones similares durante la transmisión del T-DNA que contiene el clon viral infectivo. El tratamiento de sequía consistía en la supresión del riego durante tres días para mantener seco el sustrato de todas las plantas (figura 1.1.A). A partir de los 8 dpi se añadieron diariamente 5 ml de agua a cada planta, tanto infectadas como *mock* (figura 1.1.B). Así las plantas *mock* recibieron el mismo tratamiento hídrico que las plantas infectadas, dividiéndose a los 5 dpi en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento de sequía (s)

y en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento control (c, sin estrés hídrico). Para caracterizar la infección en cada grupo de plantas se evaluó su estado fisiológico midiéndose: (i) la intensidad de los síntomas de sequía cada dos días y (ii) la cantidad de virus en las hojas apicales a los 14 y 21 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas I, II y III), utilizando veinticuatro

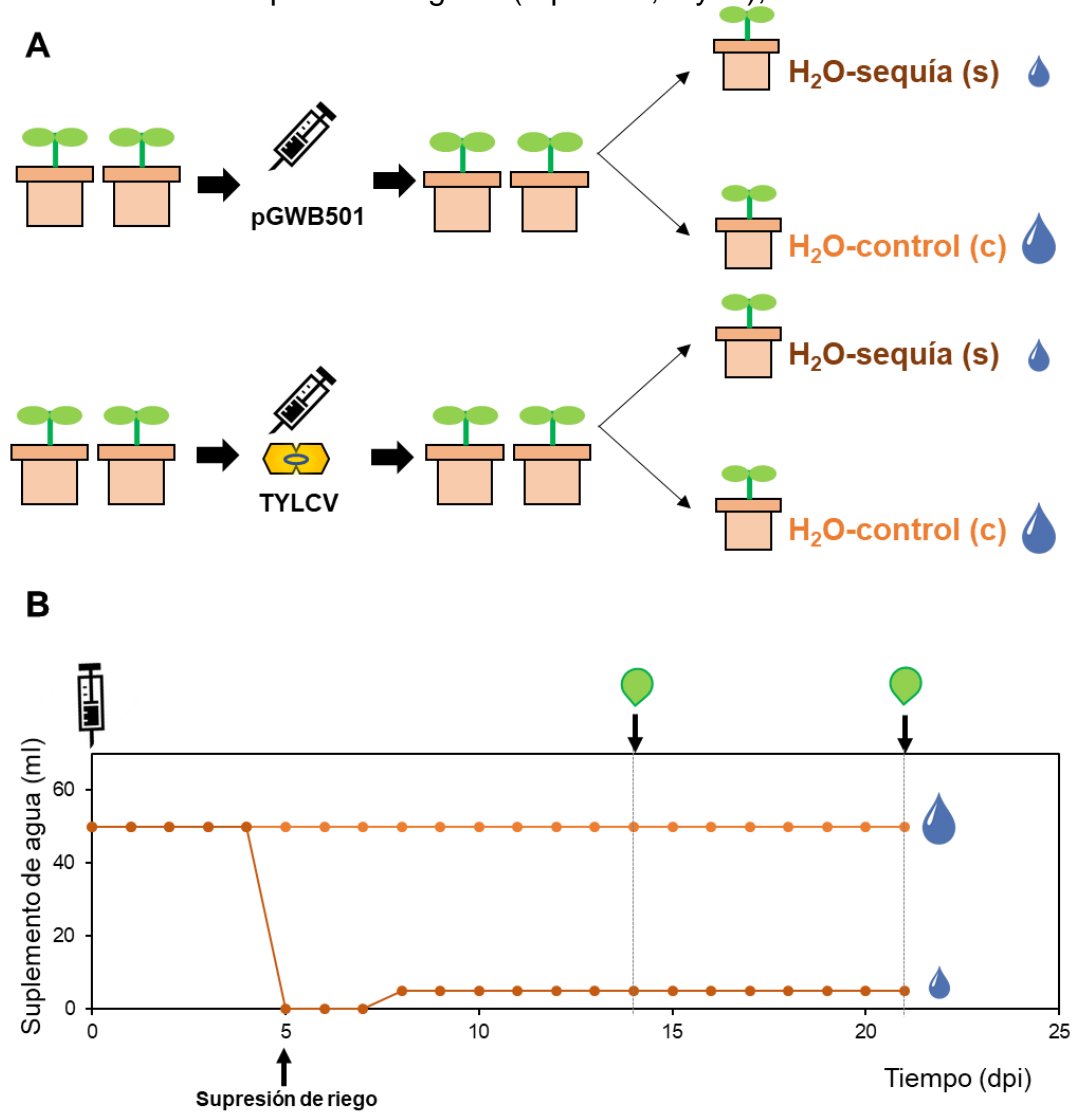


Figura 1.1 Diseño experimental. **(A)** Se sembraron semillas de *N. benthamiana* o tomate en sustrato a 21°C y 24°C respectivamente y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 3-4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron agroinoculados con el vector pGWB501 o con el clon infectivo de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 4 días con el sustrato húmedo para garantizar que la transferencia del T-DNA se realizara en el mismo estado hídrico en todas las plantas. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de sequía (s), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (c). **(B)** A los 5 dpi, se suprimió el riego al grupo de plantas bajo tratamiento de sequía (señalado en marrón). A partir de los 8 dpi las plantas bajo tratamiento de sequía fueron regadas diariamente con 5 ml de agua, mientras que las plantas bajo condiciones control (señalado en naranja) se mantuvieron húmedas durante todo el experimento. Se monitorizaron los síntomas de sequía cada dos días. Además, se recolectaron muestras para cuantificar la cantidad relativa de TYLCV a los 14 dpi y 21 dpi (indicado con una hoja).

plantas en cada una de las réplicas (seis por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

1.1.2 El estrés por sequía dificulta la acumulación de virus en plantas de *N. benthamiana*.

A continuación, se procedió a estudiar el efecto de la sequía en la infección por TYLCV en *N. benthamiana*. Se asignó un valor a cada planta a lo largo del experimento según la intensidad de los síntomas debidos a estrés por sequía (ver Tabla 7 Material y Métodos). Tanto las plantas *mock* como las infectadas con TYLCV, mostraron marcados fenotipos de estrés por sequía a los 21 dpi (se muestran imágenes representativas de la tercera réplica biológica (R-III), figura 1.2A): hojas caídas, falta de turgencia en las hojas, marchitamiento y un menor crecimiento que sus respectivos controles, con tratamiento convencional de agua. El análisis de los síntomas de estrés por sequía no muestra diferencias significativas en la aparición, ni en la intensidad de estos, entre las plantas infectadas con TYLCV y las plantas *mock* (figura 1.2A). En las tres réplicas realizadas, los síntomas por estrés hídrico aparecen al mismo tiempo (10 dpi) en los dos grupos de plantas (infectadas y *mock*) (figura 1.2B). Los síntomas de sequía se intensifican a partir de los 10 dpi, aunque tan sólo en la réplica II y en la réplica III alcanzan su máximo nivel a los 15 y 20 dpi respectivamente. En las tres réplicas todas las plantas mostraron síntomas de sequía a los 21 dpi, siendo la intensidad de los síntomas de sequía similar entre las plantas de la misma réplica. Por otro lado, las plantas bajo tratamiento control (sin estrés hídrico) mantuvieron la turgencia de sus hojas, así como un intenso color verde durante toda la duración del experimento, mostrando las plantas infectadas con TYLCV un menor tamaño que las plantas *mock* bajo tratamiento control (figura 1.2A).

Seguidamente se procedió a analizar la carga viral. Para ello se recolectaron hojas apicales de las plantas infectadas y plantas *mock* a los 14 y 21 dpi, se realizó una extracción DNA y se cuantificó el DNA viral mediante qPCR. Al analizar los resultados, resulta llamativo que la intensidad de los síntomas de estrés por sequía correlacione con una menor acumulación viral. Aunque no se detectan cambios significativos en el desarrollo de los síntomas de estrés por sequía entre plantas infectadas y plantas *mock* (figura 1.2B), la cantidad de virus que se acumula a los 21 dpi es significativamente menor en las plantas sometidas a estrés hídrico que en las cultivadas bajo tratamiento control (figura 1.3A, eje Y en escala logarítmica). Esta misma tendencia ya se observa ligeramente a 14 dpi, aunque la diferencia solamente es estadísticamente significativa en una de las tres réplicas biológicas realizadas (R-II) (figura 1.3B, eje Y en escala logarítmica).

De hecho, a 21 dpi existe una mayor acumulación viral en las plantas control en comparación con las plantas sometidas a estrés hídrico en dos de las tres réplicas biológicas realizadas (figura 1.3B).

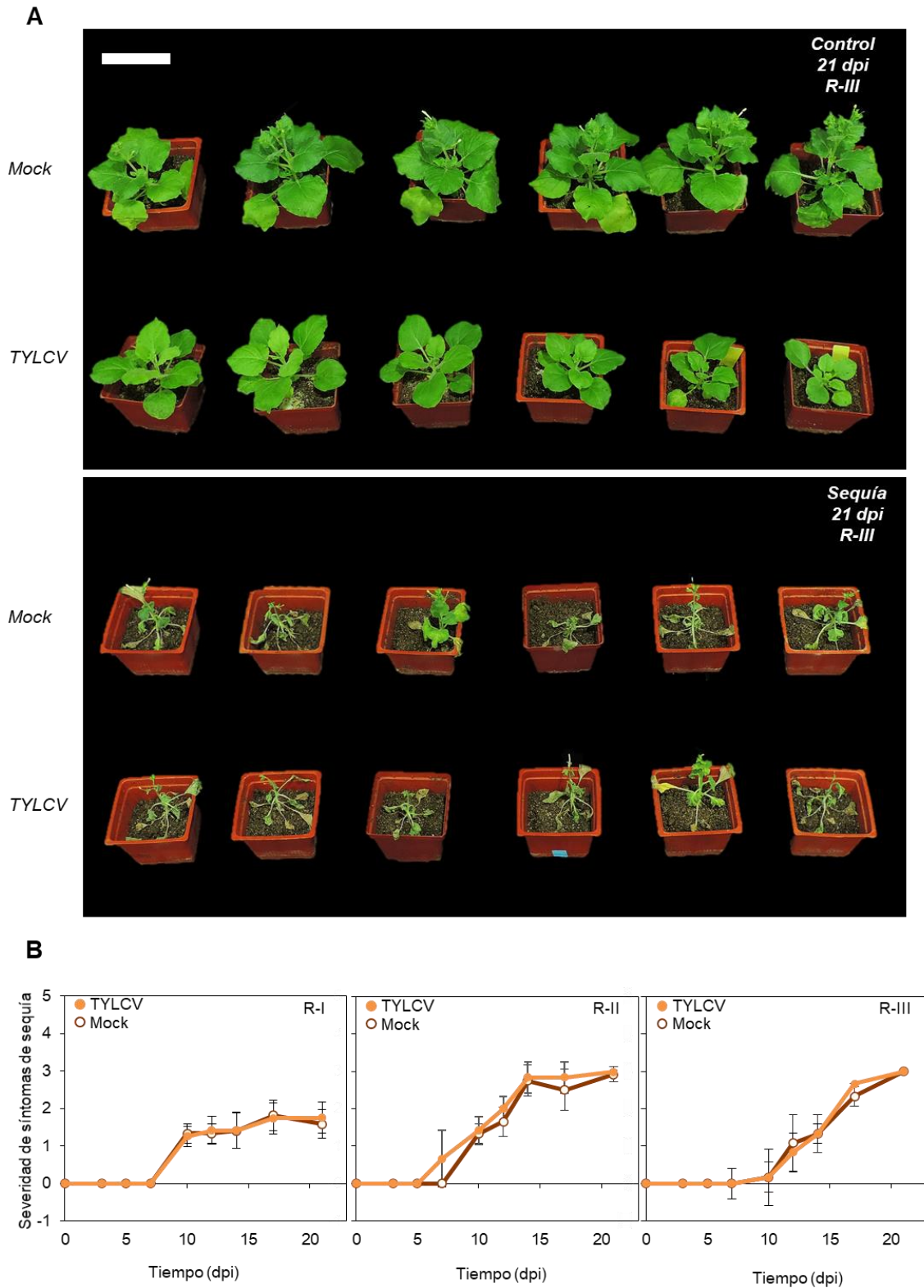


Figura 1.2. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TYLCV. **(A)** Plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con un clon infectivo de TYLCV o inoculadas con el plásmido pGWB501 (*mock*) bajo tratamiento de sequía (tras dos semanas de tratamiento) o en condiciones control, a 21 dpi (barra de escala 10 cm). Se realizaron 3 réplicas independientes; se muestra una réplica representativa (R-III) **(B)** Severidad del fenotipo de estrés por sequía de las plantas de *N. benthamiana* en tres réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III) cada una con 6 plantas para cada condición ($n = 6$). 0 indica ausencia de fenotipo; 1 indica pérdida de turgencia en las hojas basales; 2 indica completa pérdida de turgencia en las hojas basales; 3 indica pérdida de turgencia en hojas apicales y basales. Los puntos representan la media de 6 plantas; las barras de error indican la desviación estándar (SD).

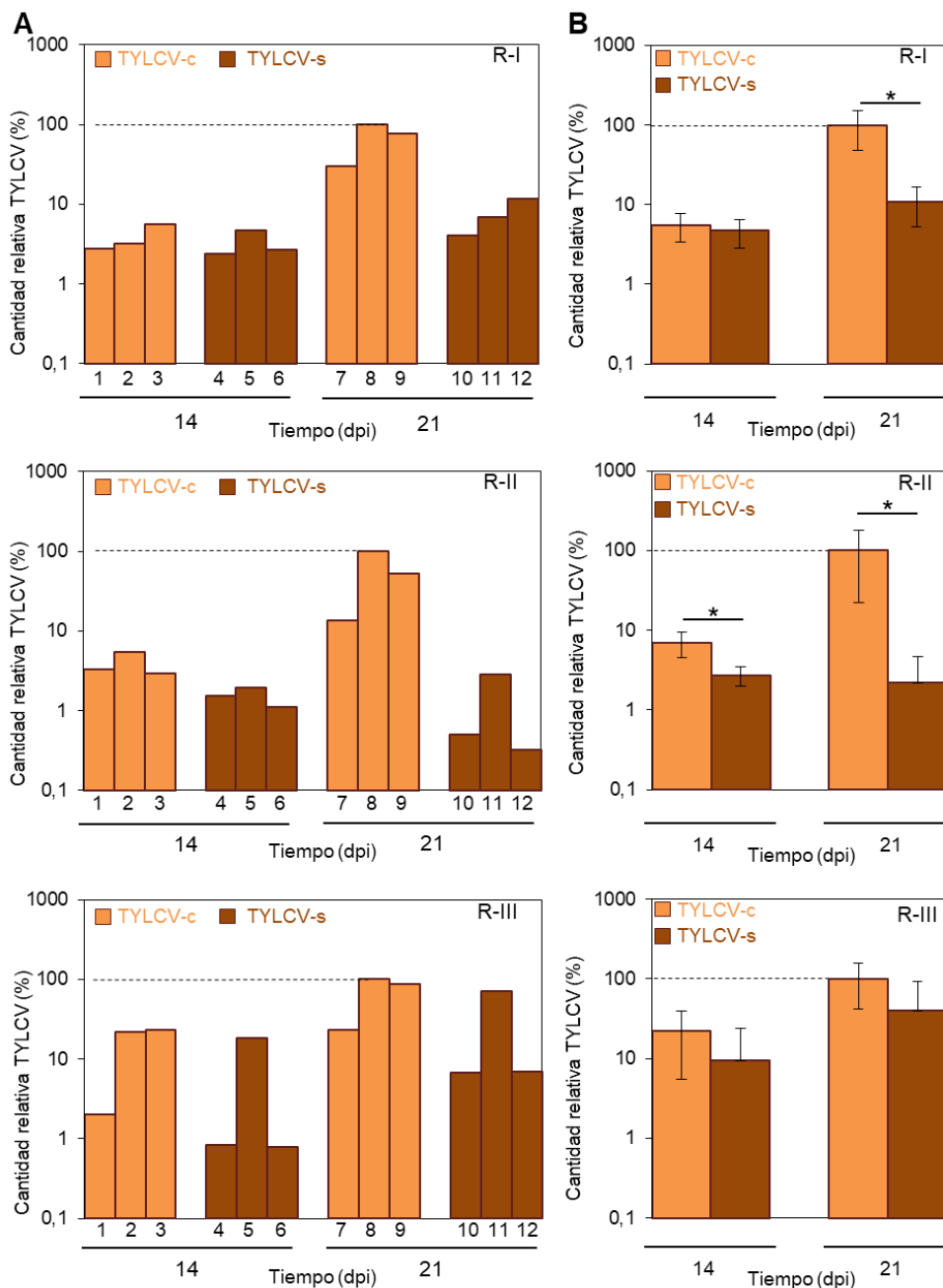


Figura 1.3. Acumulación de TYLCV en plantas de *N. benthamiana* mostradas en la figura 1.2. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y sequía “s”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición (n = 3) a los 14 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 21 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se cuantificó mediante qPCR, utilizando el gen 25S *rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Los resultados se muestran con el eje Y en escala logarítmica. Las barras representan el valor para plantas independientes (**A**) o la media de tres plantas (**B**); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,05$. Las barras de error muestran la SD. Se realizaron 3 réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III), cada tratamiento presenta 6 plantas (numeradas del 1 al 12).

Nuestros datos sugieren que en *N. benthamiana* episodios de estrés por sequía, independientemente de que puedan afectar a la interacción virus-insecto, afectan a la interacción planta-geminivirus, disminuyendo la acumulación de DNA viral.

1.1.3 El estrés por sequía dificulta la acumulación de virus en plantas de tomate.

Tras estudiar el efecto de la sequía en la infección de TYLCV de *N. benthamiana*, se procedió a estudiar el efecto de la sequía en la infección por TYLCV en tomate. Se asignó un valor a cada planta a lo largo del experimento según la intensidad de los síntomas debidos a estrés por sequía que presentaran (ver Tabla 8 Material y Métodos). Las plantas de tomate presentaron evidentes síntomas de estrés por sequía aproximadamente a los 10 dpi (figura 1.4B), mostrando tanto el grupo *mock* como el grupo de plantas infectadas con TYLCV sometidas a estrés por sequía a 21 dpi: hojas caídas, falta de turgencia en las hojas, marchitamiento y un menor crecimiento que sus respectivos controles (sin estrés hídrico) (figura 1.4A). Al igual que en *N. benthamiana*, el análisis de los síntomas de estrés por sequía no muestra diferencias significativas en la aparición, ni en la intensidad de estos entre las plantas de tomate infectadas con TYLCV y las plantas *mock* (figura 1.4B). Aunque en cada réplica los síntomas de sequía aparecen a tiempos distintos, 12 dpi en la R-I, 7 dpi en la R-II y 10 dpi en la R-III, los síntomas entre los dos grupos de plantas (infectadas y *mock*) en cada réplica aparecen simultáneamente y se mantienen en un grado de severidad similar (figura 1.4B). Los síntomas de sequía se intensifican desde su aparición, y en la R-II y en la R-III alcanzan su máximo nivel a los 17 dpi. En las tres réplicas todas las plantas mostraron síntomas de estrés por sequía a los 21 dpi, siendo la intensidad de estos, similar entre las plantas de la misma réplica.

Con el fin de analizar el efecto del estrés hídrico sobre la acumulación viral, se midió la cantidad relativa de TYLCV mediante qPCR, a partir de tejido apical a los 14 y 21 dpi. La cantidad de virus que se acumuló tanto a 14 dpi como a 21 dpi es significativamente menor en las plantas crecidas bajo estrés hídrico que en las cultivadas bajo tratamiento control (figura 1.5A). Al analizar los cambios en la carga viral a 14 y 21 dpi se observó que las plantas en condiciones control mostraron un aumento en la cantidad de DNA viral a 21 dpi (R-I) o niveles de acumulación viral similares en los dos tiempos estudiados (R-II y R-III). Por el contrario, las plantas bajo condiciones de estrés hídrico presentaron una carga viral similar a 14 y 21 dpi, observándose un aumento en la carga viral a 21 dpi tan sólo en una réplica (R-III). En cualquier caso, observamos una menor acumulación viral de TYLCV en plantas sometidas a estrés por sequía a los 14 dpi, siendo esta diferencia significativa en una réplica (R-II) y a 21 dpi esta diferencia es estadísticamente significativa en dos de las tres réplicas realizadas (R-I, R-II) (figura 1.5B). Mientras que los síntomas de estrés por sequía presentan una evolución similar en las tres réplicas biológicas realizadas (figura 1.4), la disminución en la acumulación de DNA viral debida al estrés hídrico se repite en las réplicas R-I y R-II, y se observa una tendencia similar en la réplica R-III.

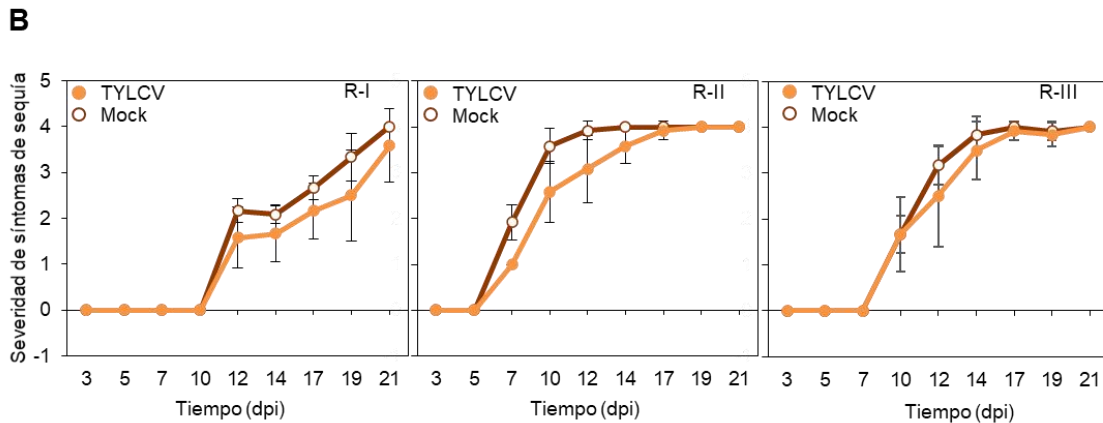
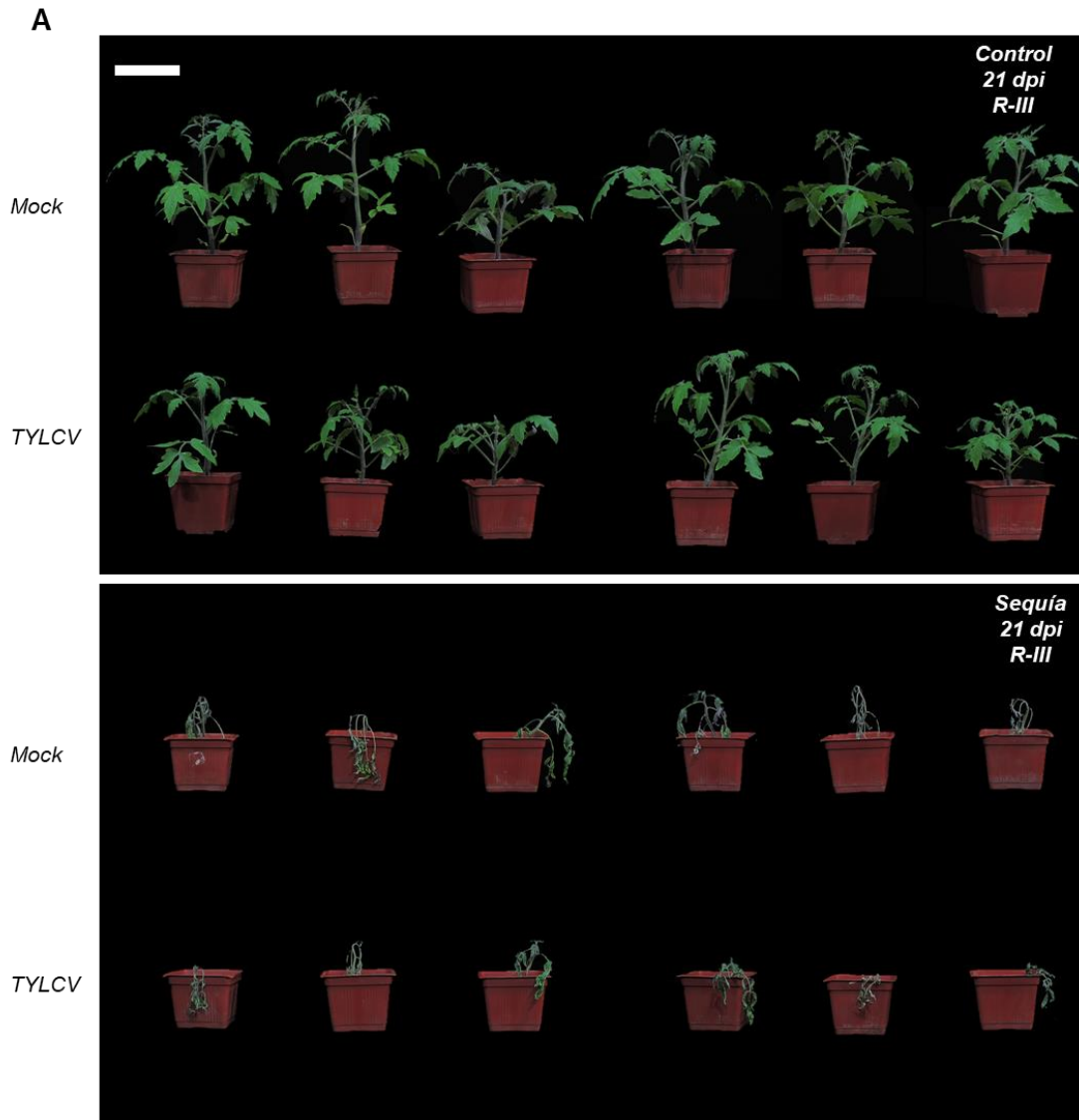


Figura 1.4. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas tomate infectadas con TYLCV. **(A)** Plantas de tomate agroinoculadas con un clon infectivo de TYLCV o inoculadas con el plásmido pGWB501 (*mock*) bajo tratamiento de sequía (tras dos semanas de tratamiento) o en condiciones control, a 21 dpi (barra de escala 10 cm). Se realizaron 3 réplicas independientes; se muestra una réplica representativa (R-III) **(B)** Severidad del fenotipo de estrés por sequía de las plantas de *N. benthamiana* en tres réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III) cada una con 6 plantas para cada condición (n = 6). 0 indica ausencia de fenotipo; 1 indica pérdida de turgencia en las hojas basales; 2 indica completa pérdida de turgencia en las hojas basales; 3 indica pérdida de turgencia en hojas apicales y basales; 4 indica que la planta se encuentra completamente seca. Los puntos representan la media de 6 plantas; las barras de error indican la SD.

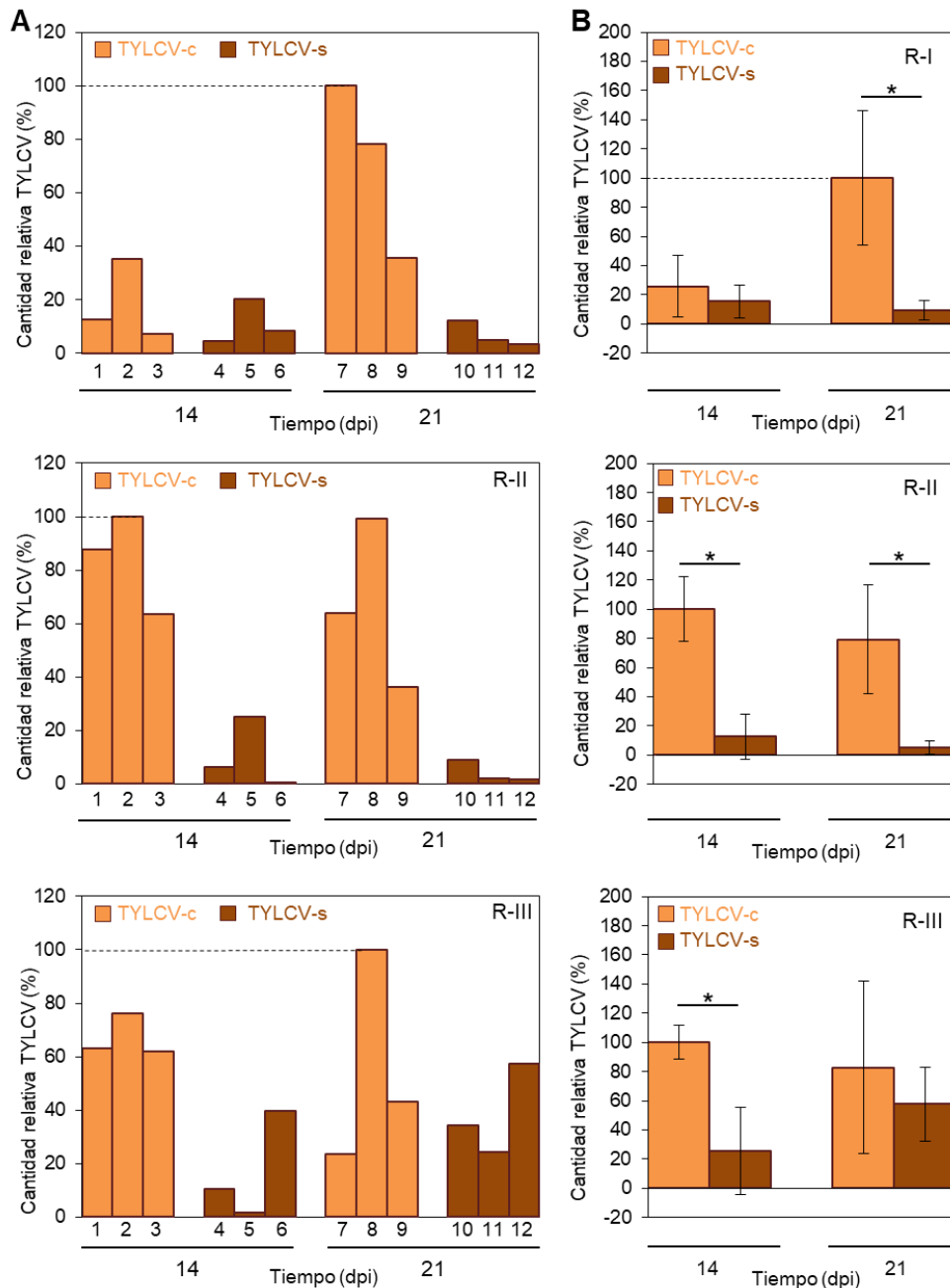


Figura 1.5. Acumulación de TYLCV en plantas de tomate mostradas en la figura 1.4. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y sequía “s”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición (n = 3) a los 14 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 21 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se analizó mediante qPCR a, utilizando el gen *25S rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Las barras representan el valor para plantas independientes (**A**) o la media de tres plantas (**B**); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,05$. Las barras de error muestran la SD. Se realizaron 3 réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III), cada tratamiento presenta 6 plantas (numeradas del 1 al 12).

Nuestros datos sugieren que, en tomate, episodios de estrés por sequía afectan a la interacción planta-geminivirus, disminuyendo la acumulación de DNA viral.

1.2 Efecto de la infección de TYLCV en la respuesta a estrés por sequía en *N. benthamiana* y tomate

1.2.1 Diseño experimental.

Con el objetivo de estudiar si la infección por TYLCV puede afectar a la tolerancia a sequía en tomate, así como en *N. benthamiana*, agroinoculamos plantas de

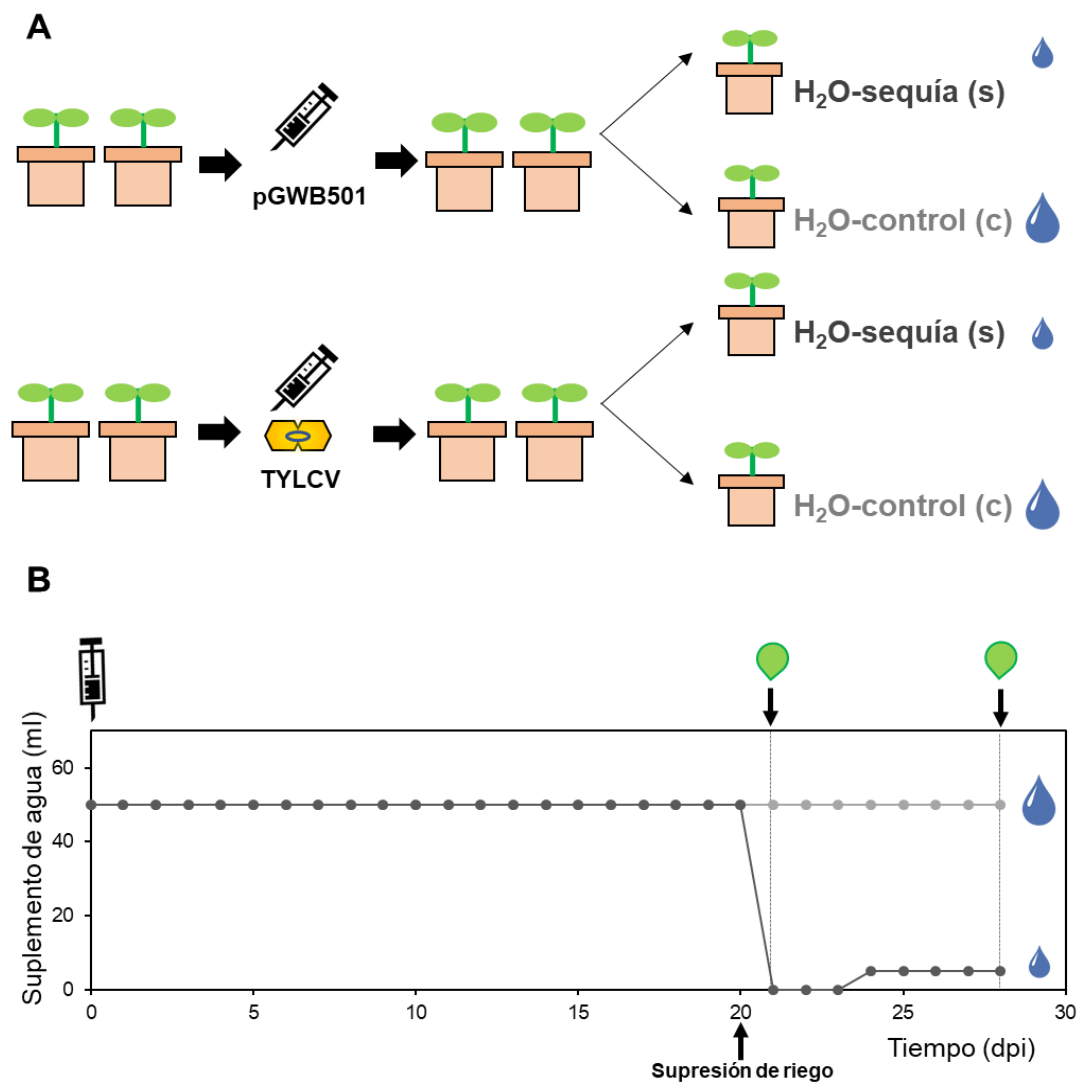


Figura 1.6. Diseño experimental. **(A)** Se sembraron semillas de *N. benthamiana* o tomate en sustrato a 21°C y 24°C respectivamente y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 3-4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron agroinoculados con el vector pGWB501 o con el clon infeccioso de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 20 días con el sustrato húmedo para garantizar que la transferencia del T-DNA, así como el desarrollo de la infección, se realizara en el mismo estado hídrico en todas las plantas. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de sequía (s), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (c). **(B)** A los 21 dpi, se suprimió el riego al grupo de plantas bajo tratamiento de sequía (señalado en gris oscuro). A partir de los 24 dpi las plantas bajo tratamiento de sequía fueron regadas diariamente con 5 ml de agua, mientras que las plantas bajo condiciones control (señalado en gris claro) se mantuvieron húmedas durante todo el experimento. Se monitorizaron los síntomas de sequía cada dos días. Además, se recolectaron muestras para cuantificar la cantidad relativa de TYLCV a los 21 dpi y 28 dpi (indicado con una hoja).

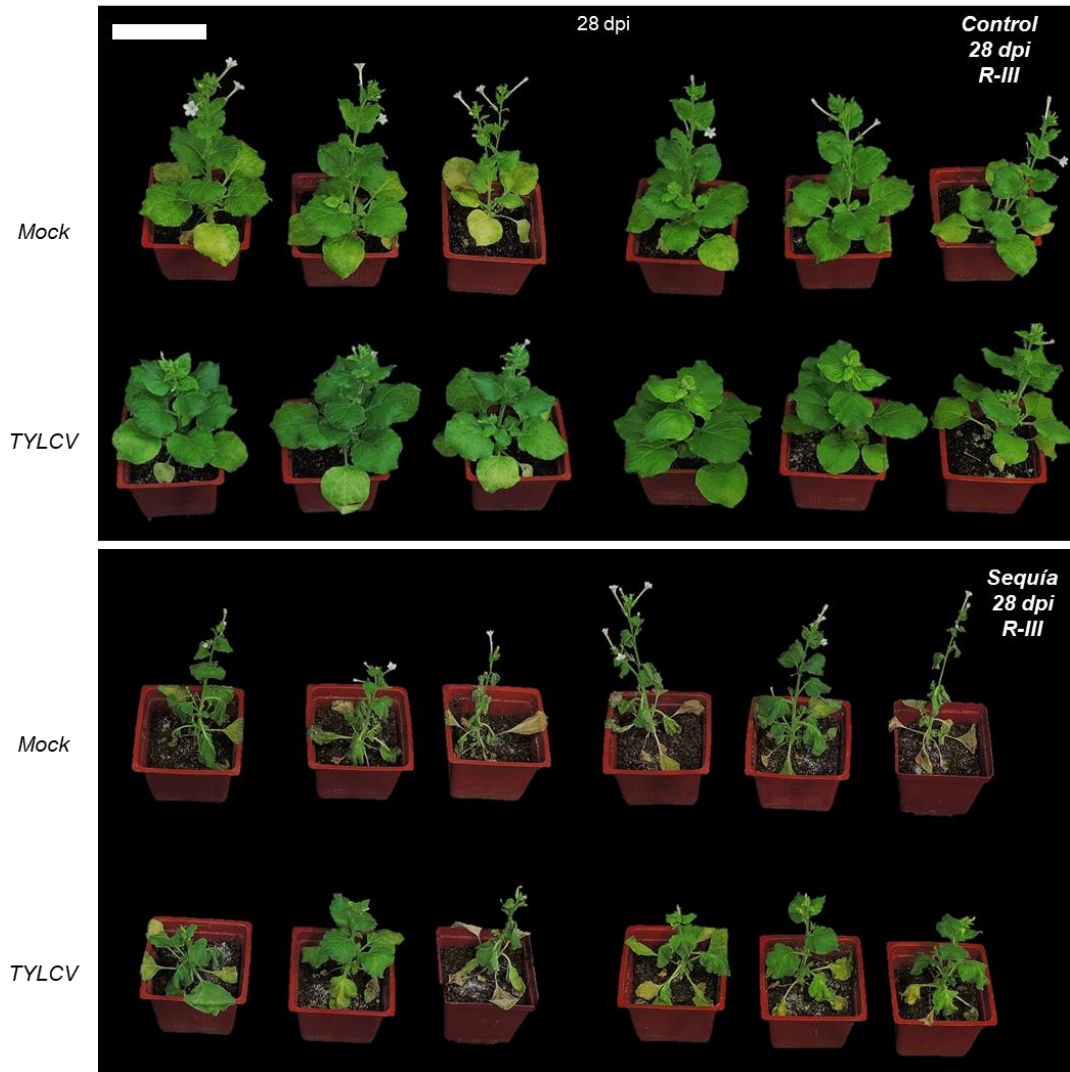
tomate y *N. benthamiana* con el clon infectivo de TYLCV o el vector pGWB501 (figura 1.6A). Sometimos a la mitad de las plantas infectadas y las no infectadas (*mock*) de cada especie a un tratamiento de sequía a los 21 dpi, momento en el que la infección ya se encuentra establecida (ver Material y Métodos, apartado 7.2.2). Se suprimió el riego durante 3 días para eliminar cualquier resto de humedad del sustrato, tras lo cual, a los 24 dpi, se regó diariamente a cada planta con 5 ml de agua (s, estrés por sequía). La otra mitad de las plantas, infectadas y no infectadas, tuvieron un riego abundante y representan el grupo control (c) de los experimentos (figura 1.6B). Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas R-I, R-II y R-III) utilizando veinticuatro plantas en cada una de las réplicas (seis por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

1.2.2 La infección por TYLCV favorece la tolerancia a estrés por sequía en plantas de *N. benthamiana*

Seguidamente, se procedió a estudiar el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta al estrés por sequía en *N. benthamiana*. Se asignó un valor a cada planta a lo largo del experimento según la intensidad de los síntomas debidos estrés por sequía (ver Tabla 7, Material y Métodos). Tanto las plantas *mock* como las infectadas con TYLCV, mostraron intensos síntomas de estrés por sequía a los 28 dpi (se muestran imágenes representativas de la tercera réplica biológica (R-III), figura 1.7A). Sin embargo, observamos que las plantas de *N. benthamiana* infectadas con TYLCV mostraron un marchitamiento más tardío durante el tratamiento de sequía (figura 1.7A), así como una menor intensidad en los síntomas de estrés por sequía que las correspondientes plantas *mock* (figura 1.7B), sugiriendo que la presencia de TYLCV induce una mayor tolerancia al estrés por sequía. En las tres réplicas realizadas, leves síntomas por estrés hídrico aparecen simultáneamente al finalizar el primer día de seguimiento (21 dpi) en los dos grupos de plantas (infectadas y *mock*), sin embargo, las plantas infectadas tendieron a presentar una menor intensidad de síntomas a lo largo del experimento (figura 1.7B). Asimismo, las plantas bajo tratamiento control (sin estrés hídrico) no presentaron síntomas de estrés relacionado con la escasez de agua, mostrando las plantas infectadas con TYLCV una menor altura que las plantas *mock* bajo tratamiento control (figura 1.7A).

Se recolectaron muestras de las hojas apicales de plantas de *N. benthamiana* infectadas, a los 21 dpi y 28 dpi para cuantificar la carga viral, observándose que el 100% de las plantas agroinoculadas habían sido infectadas. Cabe mencionar que en las plantas de *N. benthamiana* infectadas y bajo tratamiento de sequía, se observó una tendencia a presentar una menor carga viral tras 7 días sometidas a estrés hídrico y 28 dpi (figura 1.8).

A



B

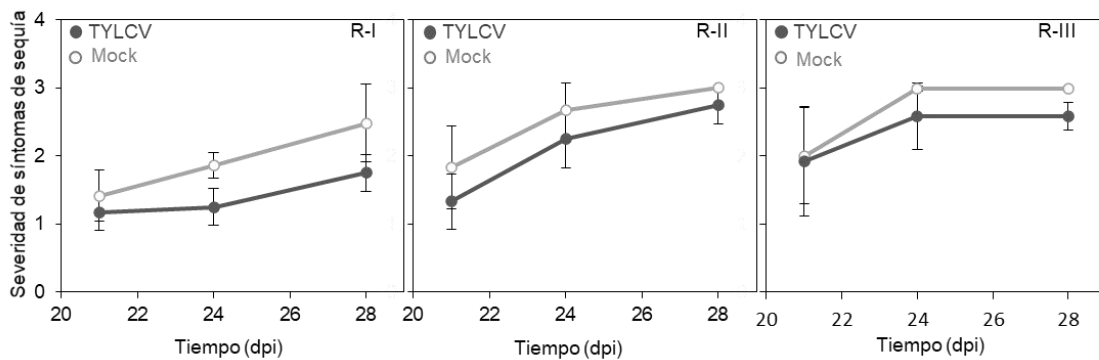


Figura 1.7. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TYLCV. **(A)** Plantas de *N. benthamiana* agroinoculadas con un clon infeccioso de TYLCV o inoculadas con el plásmido pGWB501 (*mock*) y bajo tratamiento de sequía (tras una semana de tratamiento) o en condiciones control, a 28 dpi (barra de escala 10 cm). Se realizaron 3 réplicas independientes; se muestra una réplica representativa (R-III) **(B)** Severidad del fenotipo de estrés por sequía de las plantas de *N. benthamiana* en tres réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III), cada una con 6 plantas para cada condición (n = 6). 0 indica ausencia de fenotipo; 1 indica pérdida de turgencia en las hojas basales; 2 indica completa pérdida de turgencia en las hojas basales; 3 indica pérdida de turgencia en hojas apicales y basales. Los puntos representan la media de 6 plantas; las barras de error indican la SD.

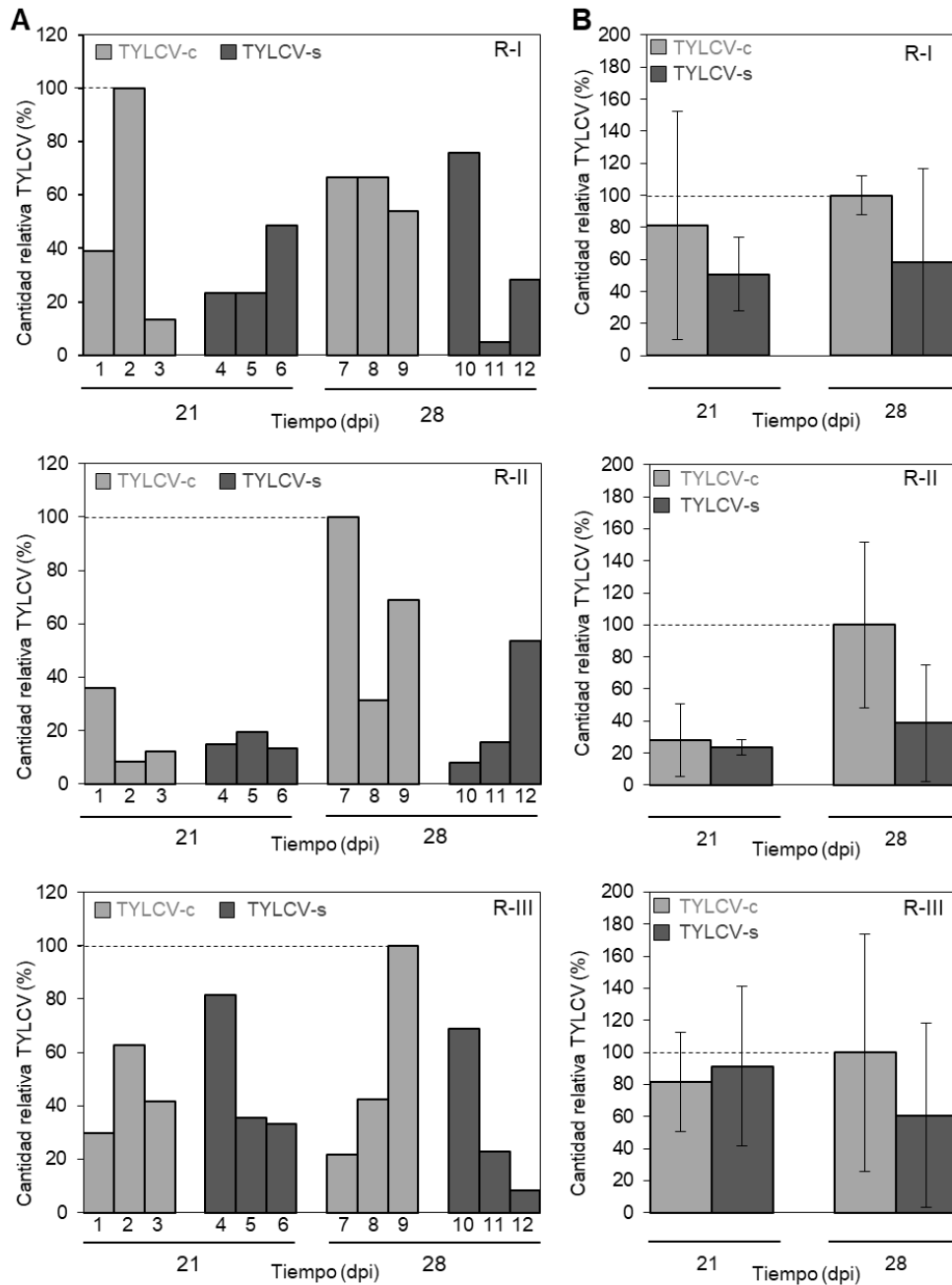


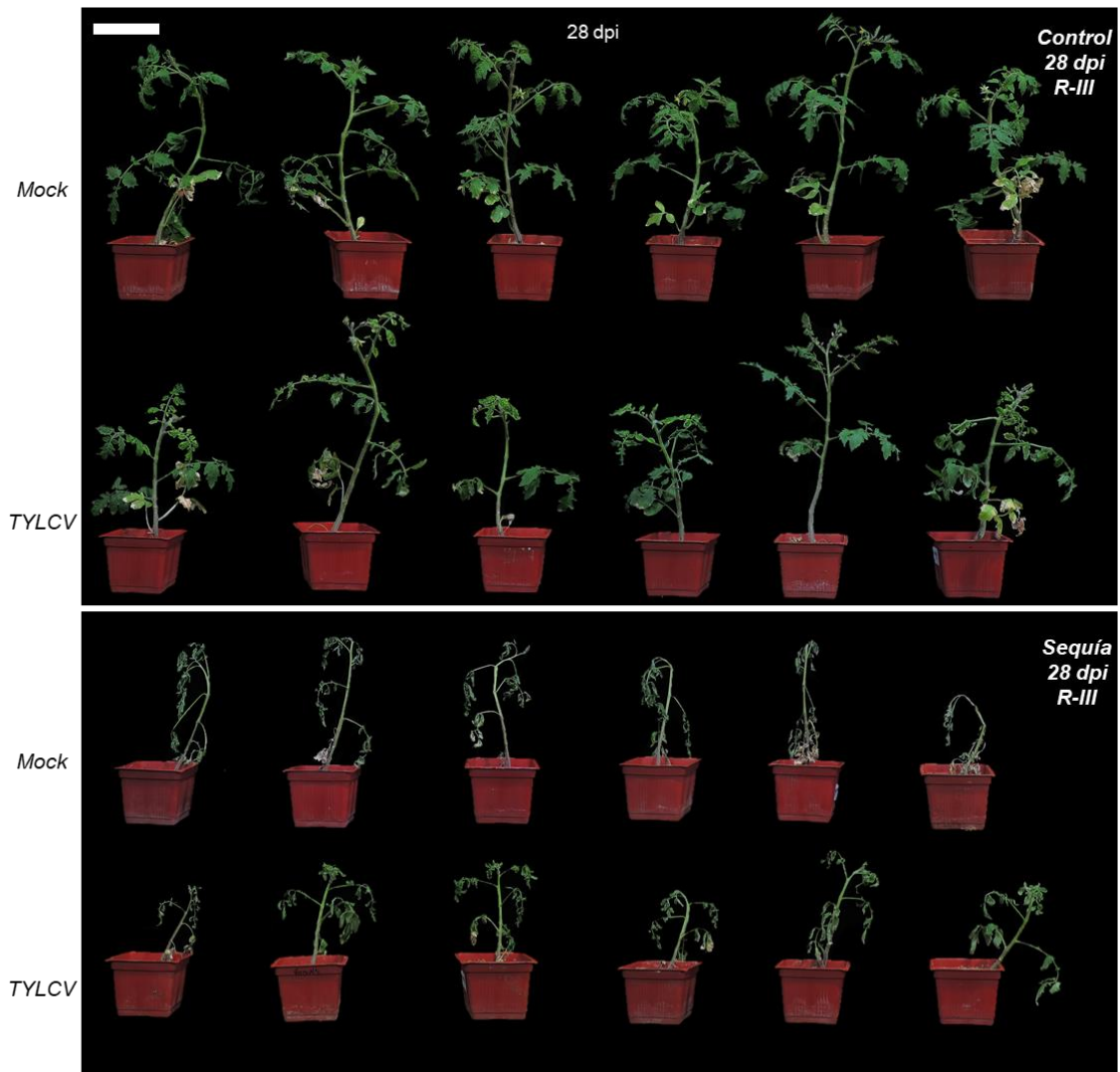
Figura 1.8. Acumulación de TYLCV en plantas de *N. benthamiana* mostradas en la figura 1.7. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y sequía “s”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición (n = 3) a los 21 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 28 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se cuantificó mediante qPCR, utilizando el gen *25S rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Las barras representan el valor para plantas independientes (A) o la media de tres plantas (B); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,05$. Las barras de error muestran la SD. Se realizaron 3 réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III), cada tratamiento presenta 6 plantas (numeradas del 1 al 12).

1.2.3 La infección por TYLCV favorece la tolerancia a estrés por sequía en plantas de tomate

Tras estudiar el efecto de la infección de TYLCV en la respuesta a estrés por sequía en *N. benthamiana* procedimos a estudiar el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta al estrés por sequía en plantas de tomate. Se asignó un valor a cada planta a lo largo del experimento según la intensidad de los síntomas de estrés por sequía (ver Tabla 8, Material y Métodos). Al igual que en *N. benthamiana*, tanto las plantas de tomate *mock* como las infectadas con TYLCV, mostraron intensos síntomas de estrés hídrico a los 28 dpi (se muestran imágenes representativas de la tercera réplica biológica (R-III), figura 1.9A). Asimismo, y de forma similar a lo observado en *N. benthamiana*, observamos que las plantas de tomate infectadas con TYLCV mostraron un marchitamiento más tardío tras el tratamiento de sequía (figura 1.9A), así como una menor intensidad en los síntomas de estrés por sequía que en las plantas *mock* (figura 1.9B). Estos datos sugieren que la presencia de TYLCV induce una mayor tolerancia al estrés por sequía en ambas especies de solanáceas (*N. benthamiana* y tomate). En las tres réplicas realizadas, leves síntomas por estrés hídrico aparecen a la vez (21 dpi) en los dos grupos de plantas (infectadas y *mock*), sin embargo, las plantas infectadas tendieron a presentar una menor intensidad de síntomas durante todo el experimento en dos de las tres réplicas (figura 1.9B). Asimismo, las plantas bajo tratamiento control (sin estrés hídrico) no presentaron síntomas de estrés, mostrando las plantas infectadas con TYLCV una menor altura que las plantas *mock* bajo tratamiento control (figura 1.9A). Finalmente, se recolectaron muestras de las hojas apicales de plantas de tomate infectadas, a los 21 dpi y 28 dpi para cuantificar la carga viral, observándose que el 100% de las plantas agroinoculadas habían sido infectadas. Cabe mencionar que, a diferencia de lo observado en *N. benthamiana*, no se observó en las plantas de tomate infectadas bajo tratamiento de sequía prácticamente ninguna diferencia en la acumulación viral de TYLCV en comparación con las plantas control (figura 1.10).

Los resultados obtenidos, en conjunto, sugieren que TYLCV induce una mayor tolerancia al estrés por sequía en su hospedador al infectar *N. benthamiana* y tomate.

A



B

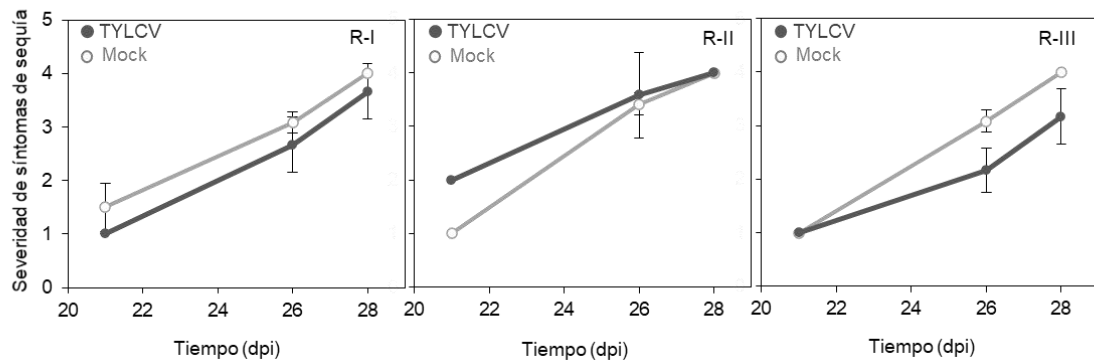


Figura 1.9. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas tomate infectadas con TYLCV. **(A)** Plantas de tomate agroinoculadas con un clon infectivo de TYLCV o inoculadas con el plásmido pGWB501 (*mock*) y bajo tratamiento de sequía (tras una semana de tratamiento) o en condiciones control, a 28 dpi (barra de escala 10 cm). Se realizaron 3 réplicas independientes; se muestra una réplica representativa (R-III) **(B)** Severidad del fenotipo de estrés por sequía de las plantas de *N. benthamiana* en tres réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III) cada una con 6 plantas para cada condición (n = 6). 0 indica ausencia de fenotipo; 1 indica pérdida de turgencia en las hojas basales; 2 indica completa pérdida de turgencia en las hojas basales; 3 indica pérdida de turgencia en hojas apicales y basales; 4 indica que la planta se encuentra completamente seca. Los puntos representan la media de 6 plantas; las barras de error indican la SD.

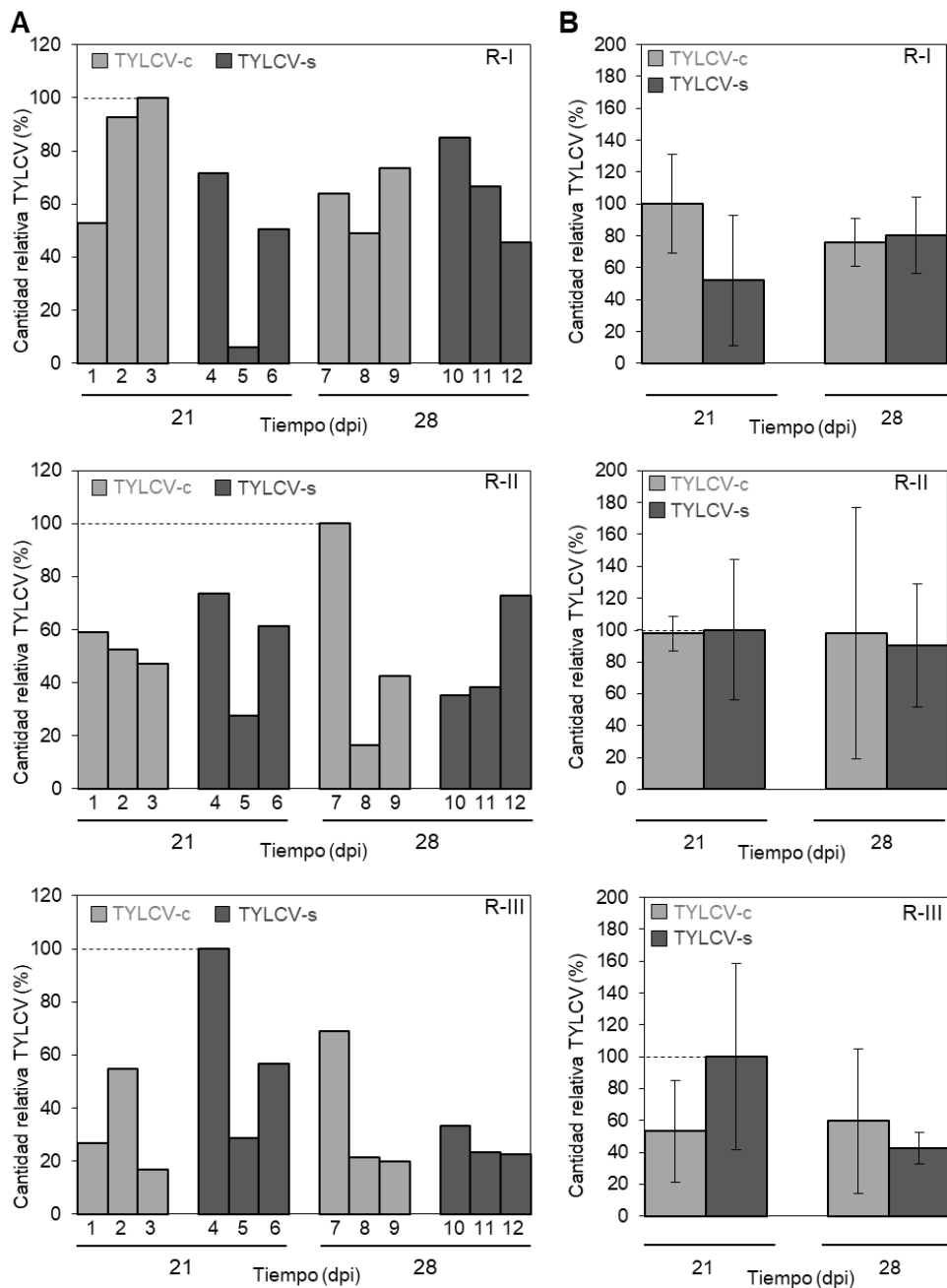


Figura 1.10. Acumulación de TYLCV en plantas de tomate mostradas en la figura 1.9. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y sequía “s”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición ($n = 3$) a los 21 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 28 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se midió mediante qPCR, utilizando el gen 25S *rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Las barras representan el valor para plantas independientes (**A**) o la media de tres plantas (**B**); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,05$. Las barras de error muestran la SD. Se realizaron 3 réplicas biológicas (R-I, R-II, R-III), cada tratamiento presenta 6 plantas (numeradas del 1 al 12).

1.3. Caracterización de la mayor tolerancia al estrés por sequía debida al geminivirus TYLCV

1.3.1 La proteína C4 de TYLCV confiere tolerancia al estrés por sequía en *Arabidopsis thaliana*.

El genoma de TYLCV codifica seis proteínas multifuncionales llamadas Rep, C2, C3, C4, V2 y CP. Con el objetivo de determinar cuál de las proteínas virales podría ser responsable de conferir una mayor tolerancia a sequía a las plantas infectadas con TYLCV, sometimos a tratamiento de sequía a diferentes líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban bajo el promotor 35S cada uno de los genes virales, C2 (TrAP), C3 (REn), C4, V1 (CP) y V2 (Material y Métodos, apartado 7.2.3). La expresión constitutiva de Rep es deletérea para la planta (datos no mostrados), por lo que esta proteína no fue incluida en nuestro análisis. Para comprobar la homogeneidad de la humedad del sustrato de las plantas en cada tratamiento, se cuantificó la temperatura, la conductividad eléctrica y la capacidad de carga del sustrato. En la presente tesis se muestran tan sólo los resultados obtenidos al cuantificar la temperatura del sustrato mediante la monitorización de la temperatura por medio de una cámara de infrarrojos (IR) modelo T640 como manera indirecta de estimar su humedad, con una correlación inversa entre la temperatura y la humedad: mayor temperatura, se corresponde con falta de humedad y una menor temperatura del sustrato indicaría mayor humedad (figura 1.12).

Además, se determinó mediante RT-qPCR la expresión relativa de los transgenes en condiciones control y bajo tratamiento de sequía, observándose la expresión de los mismos, tanto en plantas con tratamiento de sequía como en plantas control (figura 1.11B). De entre todas las proteínas virales evaluadas, tan sólo la presencia de proteína C4 tuvo un efecto en la tolerancia a sequía de las plantas de *A. thaliana*: las plantas transgénicas de C4 mantuvieron la turgencia y un intenso color verde mientras que las plantas transgénicas que expresaron otras proteínas virales, así como las plantas control, se marchitaron y murieron en condiciones de estrés por sequía (figura 1.11A).

Las imágenes de infrarrojo (IR) muestran que la temperatura del sustrato de todas las plantas bajo tratamiento de sequía es homogénea (figura 1.12), por lo que estos cambios no se deben a diferencias en la humedad de sus respectivos sustratos.

Estos resultados indican que la presencia de la proteína viral C4 aumenta dramáticamente la tolerancia a estrés por sequía en *A. thaliana*.

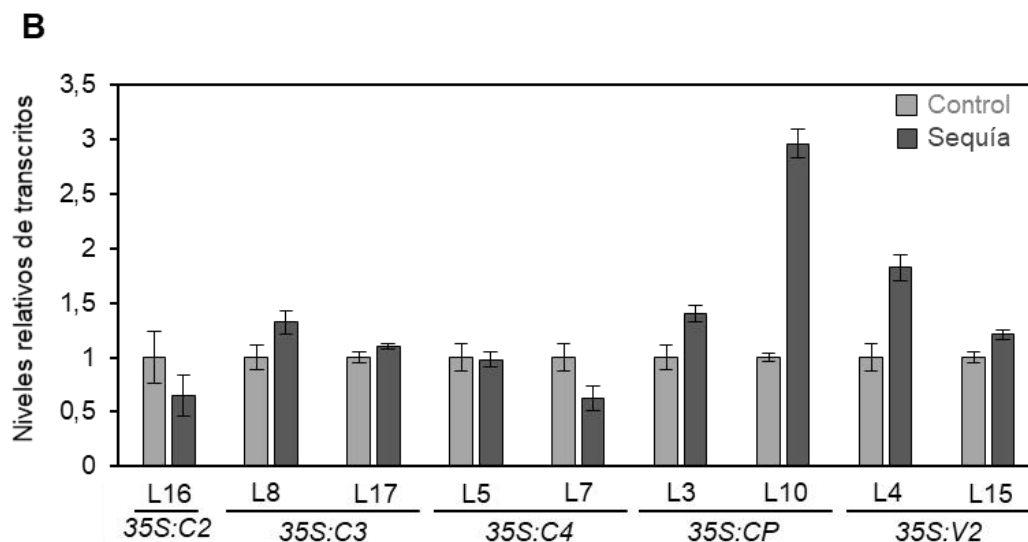
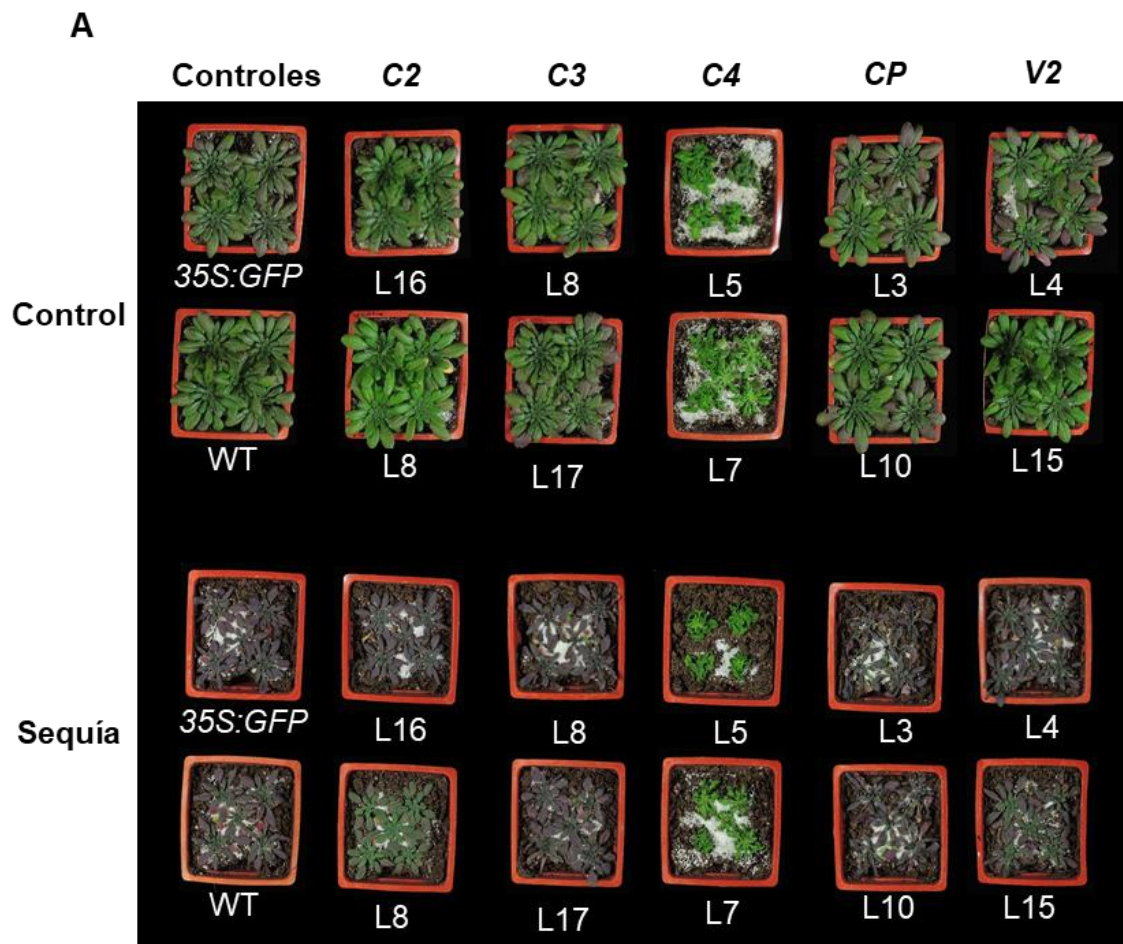


Figura 1.11. Análisis de tolerancia a sequía de plantas de *A. thaliana* que expresan cada una de las proteínas de TYLCV. **(A)** Líneas independientes de plantas transgénicas de 6 semanas de edad de *A. thaliana*, sometidas a estrés hídrico durante 31 días, que expresan los genes de TYLCV (C2 (líneas L8 y L16), C3 (líneas L8 y L17), C4 (líneas L5 y L7), V2 (líneas L4 y L15) y CP (líneas L3 y L10); y plantas control (plantas WT y 35S:GFP). Cada barra representa una pseudorréplica proveniente del material vegetal de las plantas de una misma maceta. Se realizaron 3 réplicas del experimento con resultados similares; se muestran los resultados de una réplica representativa (R-III). **(B)** Expresión de los genes virales en las líneas transgénicas de *A. thaliana*. Las barras representan la media de 3 réplicas técnicas. Las barras de error representan la SD. Las muestras para cuantificar la expresión de los transgenes fueron recogidas de plantas de 6 semanas de edad y tras 31 días de estrés hídrico.

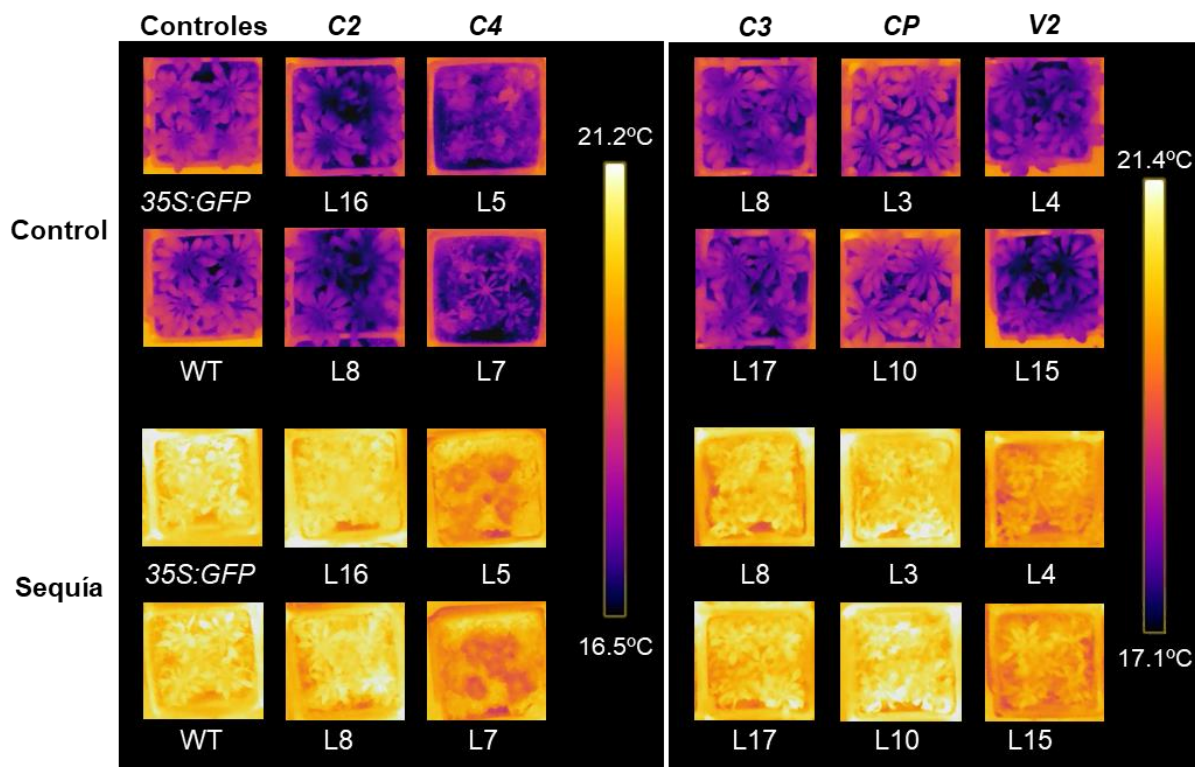


Figura 1.12. Imágenes de infrarrojo (IR) de las plantas de *A. thaliana* de la figura 1.11. Las zonas representadas de color amarillo indican una mayor temperatura (sequía o falta de humedad), mientras que las zonas en colores oscuros representan una menor temperatura (mayor humedad). Las imágenes fueron obtenidas de plantas de 6 semanas de edad.

Recientemente, se ha observado que la proteína C4 de TYLCV puede localizarse tanto en la membrana plasmática (PM) como en cloroplastos en *N. benthamiana* y *A. thaliana*, siendo este comportamiento dependiente de la meristilación de C4 (Rosas-Díaz *et al.*, 2018). Dado este doble patrón de localización subcelular, nos preguntamos si la capacidad de C4 de aumentar la tolerancia a sequía es específica de su actividad en una de estas dos localizaciones. Para resolver esta cuestión, evaluamos la tolerancia a sequía de plantas transgénicas que expresan una versión mutada de C4, C4_{G2A}, la cual se acumula exclusivamente en cloroplastos, ya que la mutación G2A produce una versión no modificada por meristilación de C4, impidiendo su localización en la PM (Rosas-Díaz *et al.*, 2018). A pesar de mostrar una expresión similar a la observada en las plantas 35S:C4 (figura 1.13B), las líneas 35S:C4_{G2A} mostraron una tolerancia a sequía similar a las plantas WT (figura 1.13A), indicando que la acumulación cloroplastídica de C4 no es suficiente para conferir tolerancia a sequía y sugiriendo que la localización en la PM es necesaria para producir este efecto.

1.3.2 El aumento en la tolerancia a sequía conferido por la expresión de C4 de TYLCV es independiente de su efecto en la arquitectura xilemática.

Recientemente se ha observado que la expresión transgénica de C4 en plantas de *A. thaliana* interfiere con la arquitectura xilemática de raíz, posiblemente mediante la inhibición del movimiento célula a célula de miRNAs, un efecto que

también requiere de su localización en la membrana plasmática (PM) (Fan *et al.*, 2019). El xilema es el tejido que transporta el agua desde la raíz al cuerpo de la planta, jugando un papel esencial en la respuesta a sequía, por lo que cambios en la arquitectura xilemática podrían afectar a la tolerancia a estrés por sequía en arroz y *A. thaliana* (Reusche *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2018). Con el objetivo de determinar si el efecto de la proteína C4 en la tolerancia a sequía está relacionado con su impacto en la arquitectura del xilema, evaluamos la tolerancia a sequía de las plantas transgénicas de *A. thaliana* *SCR:C4*. En lugar de expresar el gen viral C4 en todos los tejidos de la planta, las plantas *SCR:C4* tan sólo lo expresan en la endodermis. Debido a su expresión tejido específica,

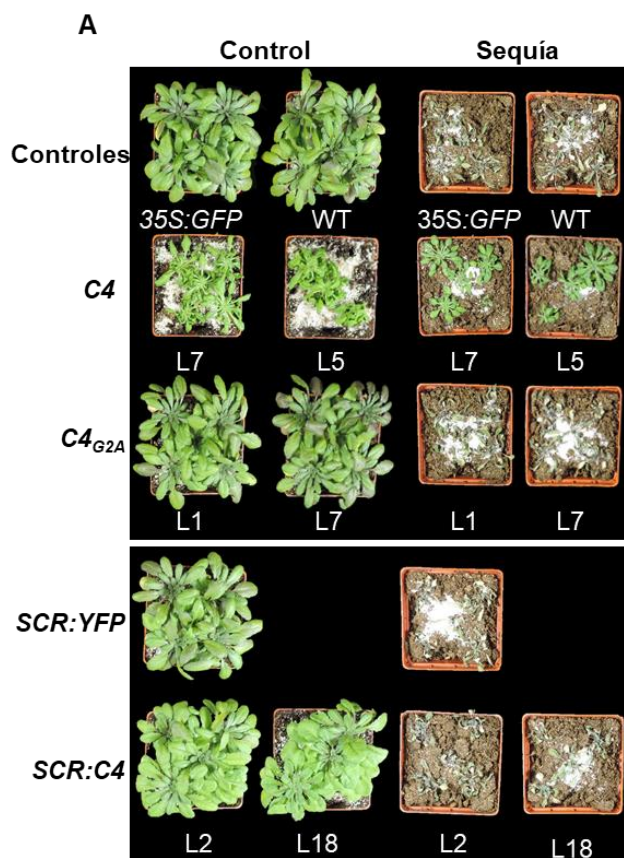
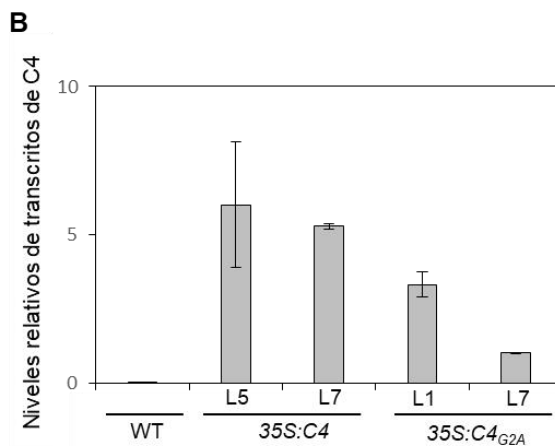


Figura 1.13 Análisis de la tolerancia a sequía desencadenada por C4 y su relación con la localización de C4 en cloroplastos y membrana plasmática y su expresión en endodermis **(A)** Plantas transgénicas de *A. thaliana* de 7 semanas de edad que expresan una versión WT de la proteína C4 de TYLCV, un mutante no meristilable, C4_{G2A}, bajo el control del promotor 35S, o la proteína WT C4 de TYLCV bajo el promotor *SCR* tras suprimir el riego durante 39 días. Se realizaron 2 réplicas con resultados similares: se muestran los resultados de una réplica representativa (R-I). **(B)** Expresión de los transgenes *C4* y *C4_{G2A}*. Las barras representan la media de tres replicas técnicas realizadas con material vegetal proveniente de las plántulas de una misma línea transgénica. Las barras de error representan la SD. Las muestras fueron recolectadas de plántulas de 11 días de edad.



las plantas *SCR:C4* no presentan el fenotipo característico de las plantas *35S:C4*, aunque conservan defectos xilemáticos similares (Fan *et al.*, 2019), por lo que son un excelente modelo para estudiar si los cambios en la arquitectura xilemática producidos por la proteína C4 se asocian con una mayor tolerancia a sequía. Sin embargo, las plantas *SCR:C4* no mostraron una mayor tolerancia a sequía en comparación con las plantas *SCR:YFP* o las plantas WT (figura 1.13A). Estos resultados muestran que el efecto de la proteína C4 en la tolerancia a sequía es independiente de su efecto en la estructura del xilema y que se requiere de la expresión de C4 más allá de los tejidos donde se expresa el promotor *SCR* para inducir una mayor tolerancia a sequía.

Las imágenes de infrarrojo (IR) muestran que la temperatura del sustrato de todas las plantas bajo tratamiento de sequía es homogénea (figura 1.14), por lo que resultados observados en las plantas *35S:C4_{G2A}* y *SCR:C4* no se deben a diferencias en la humedad de sus respectivos sustratos.

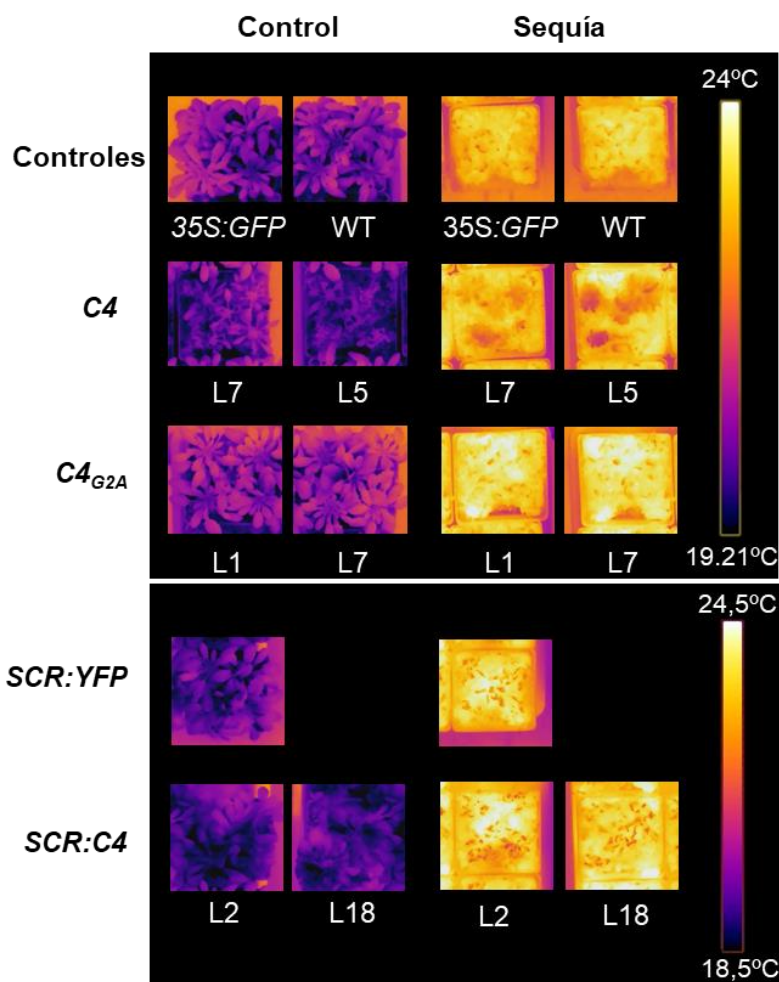


Figura 1.14 Imágenes IR de las plantas de *A. thaliana* transgénicas mostradas en la figura 1.13. Las zonas representadas de color amarillo indican una mayor temperatura (sequía o falta de humedad), mientras que las zonas en colores oscuros representan una menor temperatura (mayor humedad). Las imágenes fueron obtenidas de plantas de 7 semanas de edad.

1.3.3 La presencia de C4 de TYLCV no afecta a la acumulación de ABA ni a las respuestas dependientes de ABA.

El ABA es la principal hormona reguladora de respuesta a sequía (Hossain *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2009; Verslues *et al.*, 2006). Un aumento en la acumulación de ABA o en las respuestas dependientes de ABA puede dar lugar a un fenotipo de tolerancia a sequía, por lo que decidimos estudiar el efecto de la proteína C4 en la acumulación de ABA y sus respuestas mediante: (i) la cuantificación de la acumulación de ABA en condiciones control y de estrés hídrico en plantas WT, 35S:C4 y 35S:C4_{G2A}; (ii) el análisis de la expresión de genes de respuesta a ABA en condiciones control y de sequía en plantas 35S:GFP y 35S:C4; (iii) la evaluación de la respuesta de las plantas 35S:C4 y 35S:C4_{G2A} al ABA exógeno, comparado con el control WT. Sorprendentemente, las plantas que expresan C4 no difieren en ninguna de las variables estudiadas.

En primer lugar, la proteína C4 no tiene un impacto significativo en la acumulación de ABA (figura 1.15A). Cabe destacar que las plantas WT bajo estrés por sequía presentan un aumento significativo de la concentración de ABA en comparación con las plantas control. Sin embargo, aunque en las plantas 35S:C4 y 35S:C4_{G2A} no se observa un incremento tan pronunciado en la acumulación de ABA, sigue existiendo una mayor acumulación de ABA en plantas bajo estrés por sequía en comparación con las plantas bajo tratamiento control (figura 1.15A).

En segundo lugar, la proteína C4 no induce cambios en la expresión de genes dependientes de ABA en condiciones control o de sequía (figura 1.15B). Mediante RT-qPCR se cuantificó la expresión relativa de *NCED3*, el principal regulador de la síntesis de ABA, *RD29A*, uno de los principales genes de respuesta a ABA y *P5CS1*, principal regulador de la síntesis de prolina, un aminoácido osmoprotectante que se ha relacionado con una mayor tolerancia a sequía en planta (Silva *et al.*, 2019). No se observa ninguna diferencia en la expresión de los genes *NCED3*, *RD29A* y *P5CS1* entre plantas 35S:GFP y plantas 35S:C4 en condiciones control o bajo condiciones de estrés hídrico (figura 1.15B). Estos resultados confirman los datos obtenidos al estudiar la acumulación de ABA (figura 1.15A).

Por último, se midió el efecto del ABA exógeno en la tasa de germinación de las plantas 35S:C4 y 35S:C4_{G2A} en comparación con las plantas WT (figura 1.15C). En este experimento de inhibición de la germinación mediante la exposición de semillas a medio MS complementado con ABA exógeno, se observa una intensa inhibición de la germinación en las plantas bajo tratamiento de ABA (+ABA) en comparación con las plantas control (-ABA). Al igual que ocurriría al medir la concentración de ABA (figura 1.15A), la sensibilidad a ABA de las plantas 35S:C4 y 35S:C4_{G2A} no es tan intensa como en las plantas WT, aunque es similar. De hecho, se observa una tendencia en las plantas 35S:C4, presentando

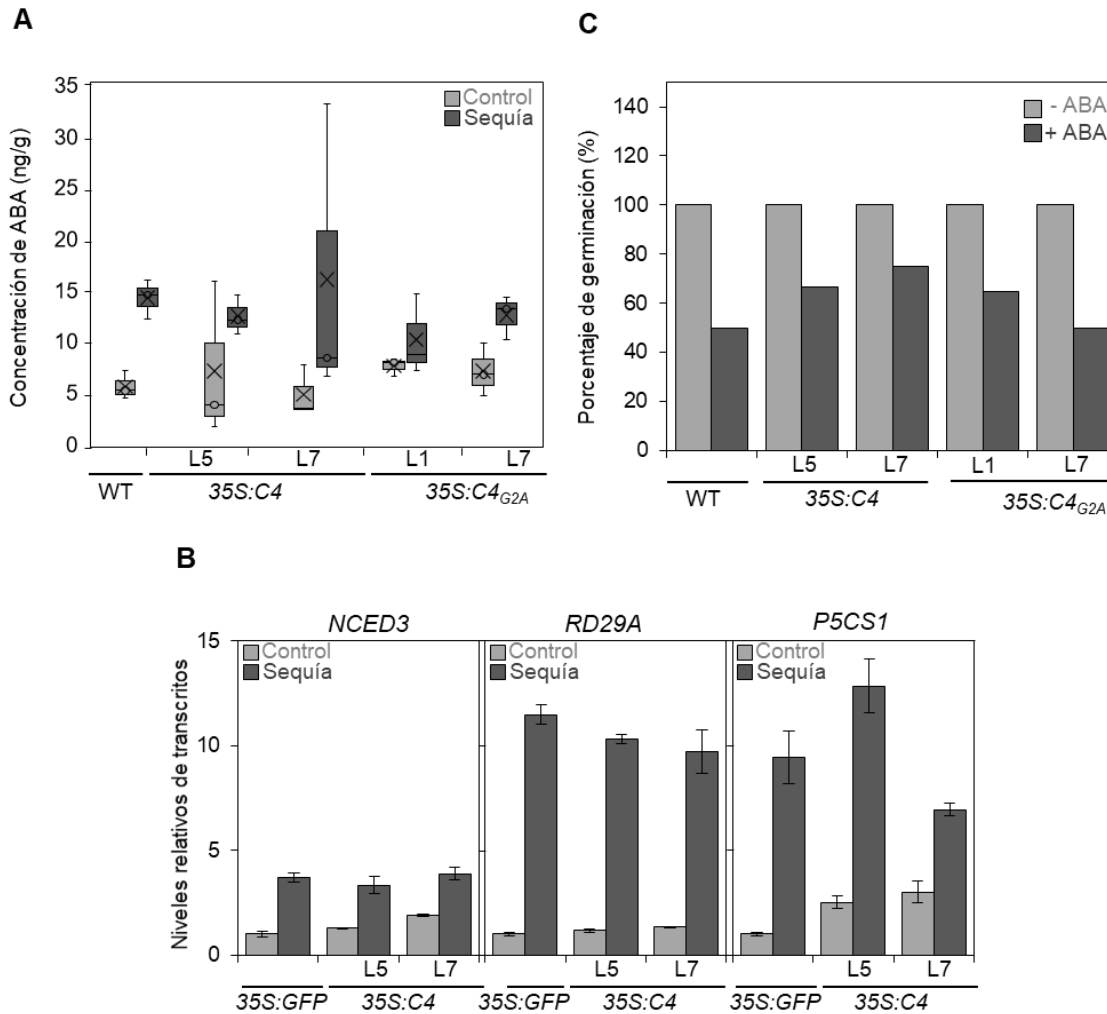


Figura 1.15 Caracterización de la relación entre ABA y la tolerancia a sequía inducida por la proteína C4 de TYLCV **(A)** Contenido de ABA en plantas transgénicas de *A. thaliana* de 4 semanas de edad expresando una versión WT de C4 o una versión mutante no meristilable, C4_{G2A}, bajo el control de un promotor 35S (35S:C4 (líneas L5 y L7) y 35S:C4_{G2A} (líneas L1 y L7), respectivamente) tras suprimir el riego durante 13 días. Los valores representan la media de 3 plantas; la media se representa con una x, la mediana con un círculo y las barras de error representan la SD. **(B)** Expresión de genes de respuesta a ABA (*NCDE3*, *P5CS1* y *RD29A*) en plantas de *A. thaliana* transgénicas 35S:C4 o control (35S:GFP) tras suprimir el riego durante 30 días. Las medias fueron relativizadas a las de las plantas 35S:GFP en condiciones control; el gen actina fue utilizado como normalizador (McKinney & Meagher, 1998). Las muestras provienen de 5 plantas provenientes de la misma maceta; los resultados son la media de 3 réplicas técnicas. Las barras de error representan la SD. **(C)** Tasa de germinación de semillas 35S:C4 and 35S:C4_{G2A} germinando en presencia de ABA exógeno (0.3 μ M) durante 6 días; se utilizaron como control plantas WT. La tasa de germinación de cada línea de plantas se representa relativizada a la tasa de germinación del control (-ABA), al cual se le otorgó el valor de 100%. Se emplearon 24 semillas para cada genotipo. Se realizaron dos réplicas con resultados similares; se muestran los resultados de una réplica.

una menor inhibición de la germinación por ABA que las plantas 35S:C4_{G2A} figura 1.15C).

Estos resultados en conjunto, sugieren que la proteína C4 no induce cambios dramáticos en el metabolismo y señalización por ABA, sugiriendo que el aumento en la tolerancia a sequía provocado por la proteína C4 se produce de forma independiente a ABA.

DISCUSIÓN

Las previsiones actuales sugieren que en las próximas décadas se producirá un aumento de la temperatura, así como en el número de días sin lluvia en la mayoría de las regiones del planeta (Dewes *et al.*, 2017; Yusa *et al.*, 2015). Estos cambios ambientales podrían tener la capacidad de modificar la respuesta de la planta a estreses bióticos, por lo que afectaría a los patógenos vegetales, modificando su desarrollo, severidad y dispersión (Aguilar *et al.*, 2017).

Actualmente hay consenso en el efecto inhibitor que produce en la acumulación viral el estrés por sequía (Goel *et al.*, 2008; Mohr & Cahill, 2003). Sin embargo, se han documentado numerosos virus de RNA que no parecen verse afectados al sufrir su hospedador episodios de sequía durante la infección, como por ejemplo, *Peanut stunt virus* (PSV) en trébol blanco, *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) en maíz *Citrus tristeza virus* (CTV) en naranjo (McLaughlin & Windham, 1996; Olson *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2019). Nuestros resultados sugieren que el estrés por sequía también produce un efecto negativo en la carga viral del geminivirus TYLCV. A pesar de que estudios previos sugerían este resultado (Sánchez-Durán *et al.*, 2011; Wafa'a Odeh, 2018), no se había comprobado el efecto en la acumulación del DNA viral de TYLCV producido por el estrés por sequía en uno de sus hospedadores naturales, como es tomate.

Puesto que una de las principales hormonas reguladoras de la respuesta a estrés por sequía es el ABA, esta molécula podría ser la candidata más razonable para explicar la disminución de la carga viral en plantas infectadas bajo condiciones de estrés por sequía. De hecho, se ha observado que plantas de *A. thaliana* infectadas bajo tratamiento de ABA muestran una menor acumulación viral de *Turnip Crinkle Virus* (TCV) (Yang *et al.*, 2013) y *crucifer-infecting Tobacco Mosaic Virus* (TMV-Cg) (Chen *et al.*, 2013; Iriti & Faoro, 2008). Algunos autores han sugerido que, al ser el ABA inductor de la deposición de calosa en la pared celular, puede alterar el tamaño de los plasmodesmos y, con ello, limitar el tráfico viral en la planta (Alazem & Lin, 2017; Iriti & Faoro, 2008). Futuros experimentos podrán determinar si tratamientos de ABA afectan negativamente a la acumulación viral de TYLCV en *N. benthamiana* y tomate, así como cuantificar los niveles de calosa en estas plantas y estudiar la acumulación viral en tomates mutantes para genes de la biosíntesis de ABA.

Por otro lado, los estreses bióticos también pueden interferir en la respuesta de la planta a los estreses abióticos. De hecho, se ha demostrado que algunos virus de RNA pueden modificar la respuesta a estreses abióticos como la sequía (Aguilar *et al.*, 2017; Westwood *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008), por lo que las infecciones virales pueden ser una interesante herramienta para descubrir nuevos mecanismos de resistencia a estreses abióticos. En el contexto de cambio climático, es necesario impulsar la productividad agrícola no sólo mediante el desarrollo de cultivos de alto rendimiento, sino también mediante la

obtención de cultivos resistentes a diferentes estreses. Mientras que las técnicas de mejora tradicional han producido valiosas soluciones en el pasado, en el escenario actual es esencial explorar aproximaciones alternativas (Hu & Xiong, 2014), que podrían permitir reducir el intervalo de tiempo entre la identificación de una característica beneficiosa y su implementación en el campo. El estudio de especies extremófilas ha sido sugerido como una fuente potencial para descubrir nuevas fuentes de resistencia (Zhang *et al.*, 2018b). De forma similar, entender los mecanismos fisiológicos y moleculares que pudiera haber en los efectos beneficiosos de la infección viral en la tolerancia a estreses abióticos, podría mostrar nuevas aproximaciones para generar tolerancia al estrés, proporcionando estrategias para aumentar la velocidad de generación de variedades con una mayor resistencia a estreses abióticos.

En este capítulo, mostramos que la infección por el geminivirus TYLCV puede mejorar la tolerancia al estrés por sequía tanto en tomate como en *N. benthamiana* (figura 1.7 y figura 1.9), una habilidad que podría tener un impacto positivo en la dispersión viral en condiciones ambientales adversas. Puesto que TYLCV es un virus restringido al floema (Morilla *et al.*, 2004), el efecto debe provenir o bien de la reprogramación directa de las células acompañantes del floema infectadas o de una señal sistémica originada en ellas.

Nuestros resultados muestran que la proteína viral C4 es suficiente para conferir tolerancia a sequía en plantas de *A. thaliana* (figura 1.11). C4, que presenta una localización dual en la membrana plasmática y en cloroplastos (Rosas-Díaz *et al.*, 2018), es esencial para la infección (Jupin *et al.*, 1994; Rosas-Díaz *et al.*, 2018) y presenta diversas funciones: puede actuar como un débil supresor del silenciamiento génico (Luna *et al.*, 2012), impedir el movimiento intercelular de pequeños RNAs (sRNAs) (Fan *et al.*, 2019; Rosas-Díaz *et al.*, 2018), e interferir con la señalización retrógrada cloroplasto a núcleo para suprimir la defensa dependiente de ácido salicílico (SA) (Medina-Puche *et al.*, 2020). Nuestros resultados indican que la localización en membrana plasmática es esencial para promover la resistencia a sequía por parte de la proteína C4, que este efecto es independiente de los defectos provocados en el xilema por la proteína viral y que para desencadenarlo es insuficiente la expresión de C4 tan solo en los tejidos bajo dominio del promotor *SCR* (endodermis y centro quiescente) (figura 1.13). La localización en la membrana plasmática es también un requisito para la supresión mediada por C4 de la dispersión de la señal de silenciamiento de célula a célula, la cual ocurre mediante la interacción e inhibición por parte de C4 de los receptores *receptor-like kinases* (RLKs) BAM1 y BAM2. Una posible hipótesis se basaría en la inhibición de C4 de ambas RLKs que promuevan la sensibilidad a sequía, de forma similar a como C4 parece inhibir el silenciamiento génico mediado por BAM1/2 (Rosas-Díaz *et al.*, 2018). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que BAM1 es necesario para la detección de CLE25, una pequeña hormona peptídica que transmite señales de déficit de

agua desde las raíces al ápice, estimulando la biosíntesis de ABA y el cierre estomático en hojas (Takahashi *et al.*, 2018). Es decir, BAM1 juega un papel positivo en la respuesta a sequía, promoviendo una mayor tolerancia al estrés hídrico. Aunque un potencial efecto de C4 en la detección de CLE25 o en la señalización *downstream* mediada por BAM1 no puede ser descartado, esta idea parece improbable, ya que implicaría que la proteína viral ejerce dos efectos opuestos en las diferentes funciones de esta RLK. Además, nuestros datos muestran que el efecto de C4 en la tolerancia a estrés parece ser independiente de ABA: las plantas que expresan C4, que presentan una resistencia mejorada a la privación de agua, no acumulan significativamente altos niveles de ABA y no muestran una mayor expresión de genes marcadores de ABA, sugiriendo que la biosíntesis y respuestas mediadas por ABA son similares a las observadas en plantas WT (figura 1.16). Juntos, estos resultados apoyan la idea de que C4 confiere resistencia a sequía a través de un mecanismo independiente de BAM1 y ABA, aún por identificar.

Por otro lado, se ha observado que algunos virus pueden mejorar la tolerancia a sequía a través de la inducción de la señalización de ácido salicílico (Aguilar *et al.*, 2017). El ácido salicílico es una de las principales hormonas relacionadas en la defensa frente a patógenos, aunque también actúa positivamente en la respuesta a estrés abiótico (Koo *et al.*, 2020). Sin embargo, las plantas que expresan C4 no muestran una mayor acumulación de SA, ni un incremento en la expresión de genes marcadores de SA (Medina-Puche *et al.*, 2020), indicando que los mecanismos tras el efecto de C4 de TYLCV en la tolerancia a sequía son diferentes de los descritos para otros virus (Aguilar *et al.*, 2017; Westwood *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2008).

En resumen, nuestros resultados demuestran que la proteína C4 de TYLCV incrementa la tolerancia a sequía de la planta mediante un mecanismo independiente de ABA y SA, a través de un mecanismo que requiere de la presencia de la proteína en la membrana plasmática. Considerando el dramático incremento de supervivencia mediante la retención de agua mediado por C4 y el hecho de que este efecto es independiente de las rutas hormonales que generalmente se han relacionado con el estrés por sequía, creemos que este descubrimiento posee un gran potencial biotecnológico. Futuras investigaciones se centrarán en desvelar los mecanismos moleculares tras la mejora de la tolerancia a sequía desencadenada por C4: la identificación de la estrategia viral que promueve la tolerancia a sequía podría abrir nuevas vías que explorar para obtener cultivos tolerantes a sequía.



Capítulo 2

Interacción entre el estrés salino y la infección por geminivirus en solanáceas.

INTRODUCCIÓN

Los datos actuales sugieren que el cambio climático está provocando un aumento de la temperatura global, estimando los modelos predictivos más conservadores un aumento medio de las temperaturas de entre 1,5°C y 2°C respecto a los niveles preindustriales durante las próximas décadas. Se espera que este aumento de la temperatura provoque cambios en los patrones globales de precipitaciones, aumentando los períodos de sequía y su intensidad (Betts *et al.*, 2018). En estas condiciones, diversos estudios indican que amplias extensiones de suelo destinado a uso agrícola verán un incremento de su concentración de salinidad, afectando a la productividad de numerosos cultivos y suponiendo, por ello, un grave riesgo para la agricultura (Hoang *et al.*, 2016; Reid *et al.*, 2009).

Uno de los principales retos a los que se enfrenta la agricultura en este siglo son las alteraciones que se están produciendo como consecuencia del cambio climático y la sobreexplotación de los recursos: la salinización del suelo, el aumento de la temperatura y las limitaciones de acceso al agua. Estos cambios están creando un nuevo escenario en la interacción planta-estrés biótico, lo que implica que estas interacciones sufrirán un profundo impacto sobre el que existe poca información. Aunque existen numerosos datos sobre las respuestas de las plantas al estrés por salinidad y a enfermedades inducidas por diversos patógenos individualmente, la información sobre el efecto de la salinidad en las infecciones es muy limitada, pudiendo conllevar, al igual que cualquier interacción entre estrés abiótico y estrés biótico, la disminución o el aumento de la susceptibilidad de las plantas a un patógeno/plaga o viceversa (Aguilar *et al.*, 2017; Prasch & Sonnewald, 2013). Además, debido a la poca diversidad genética de las poblaciones vegetales cultivadas y a los intercambios de material biológico a nivel global, las enfermedades vegetales son comunes en cultivos de todo el mundo, siendo por ello indispensable el conocer las interacciones entre el estrés salino y los estreses bióticos para mantener la seguridad alimentaria a nivel mundial (Strange & Scott, 2005).

La salinidad presenta dos efectos negativos en planta: en las primeras etapas de la respuesta a estrés salino, se produce una inhibición de la captación de agua, y en las fases finales, una acumulación de iones Cl^- y Na^+ hasta niveles tóxicos para la célula vegetal (Gupta & Huang, 2014). La paulatina acumulación de iones Cl^- y Na^+ altera los gradientes iónicos celulares, provocando la inhibición de diversos transportadores de iones, como HIGH-AFFINITY K^+ TRANSPORTER (HKT) y Na^+/H^+ ANTI PORTER (NHX), y bloqueando la captación de iones K^+ y Ca^+ (Parihar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). Además, la acumulación de iones Cl^- y Na^+ incrementa la producción de compuestos de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), provocando daños debido a estrés oxidativo en toda la planta a nivel celular y tisular (Ahanger *et al.*, 2017; Hossain

& Dietz, 2016; Nxele *et al.*, 2017; Parihar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). De hecho, al alterar los gradientes iónicos e inducir la formación de ROS, el estrés por salinidad afecta especialmente a las rutas bioquímicas que se producen en orgánulos celulares como las mitocondrias y cloroplastos (Ahanger *et al.*, 2017), provocando la inhibición del crecimiento y una disminución de la tasa de fotosíntesis (Parihar *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015).

Los patógenos pueden aliviar el estrés por salinidad de su hospedador mediante distintas estrategias; por ejemplo, alterando el equilibrio redox y promoviendo el secuestro y expulsión de ROS (Varela *et al.*, 2019), o alterando la expresión de canales y transportadores de iones (Chen *et al.*, 2014). En infecciones bacterianas producidas en plantas en condiciones de estrés salino también se altera la síntesis y degradación de ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (SA), lo cual modifica la respuesta de la planta al estrés abiótico (Chojak-Koźniewska *et al.*, 2017). Determinadas bacterias como *Klebsiella sp.* o *Kocuria rhizophila* pueden también modificar la respuesta al estrés por salinidad de la planta degradando precursores del etileno (Afridi *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2015). También se han documentado diferentes hongos endofíticos, como *Serendipita indica* o *Paecilomyces formosus* LHL10, que promueven la expresión de transportadores de iones y la síntesis de aminoácidos osmoprotectores como la prolina (Khan *et al.*, 2012; Lanza *et al.*, 2019).

El estrés por salinidad también afecta a la respuesta de la planta frente a estreses bióticos como las enfermedades provocadas por patógenos. De hecho, las relaciones entre los patógenos y el estrés salino son complejas y pueden dar lugar a diferentes respuestas. Por ejemplo, se ha observado una mayor acumulación de DNA de *Phytophthora capsici* en plantas de tomate cv. New Yorker sometidas a estrés por salinidad (mediante riego con 10 ml de solución Hoagland suplementada con 200 mM de NaCl) y posteriormente inoculadas con este hongo patógeno (DiLeo *et al.*, 2018). Se han obtenido resultados similares en plantas de tomate cv. Moneymaker infectadas con *Oidium neolycopersici*, observándose una mayor biomasa del hongo patógeno en plantas sometidas a riego con agua suplementada con 50 mM de NaCl. Sin embargo, en el mismo estudio también se observó una reducción de la biomasa del hongo en comparación con el control en plantas en régimen de riego con agua suplementada con 150 mM de NaCl (Kissoudis *et al.*, 2016), indicando que el efecto del estrés salino en la infección de *O. neolycopersici* en tomate es dependiente de la concentración de NaCl, induciendo bajas concentraciones de NaCl la infección del hongo e inhibiéndola concentraciones superiores. Asimismo, también se ha observado una menor severidad de síntomas provocados por *O. neolycopersici* en plantas de tomate en condiciones de alta salinidad (150 mM de NaCl) (Achuo *et al.*, 2006). Por último, también se ha observado un aumento de los síntomas provocados por *Pseudomonas syringae*

pv. lachrymans en tomate en condiciones de salinidad en comparación con plantas control (Chojak et al., 2012).

No existen muchos estudios que analicen las interacciones entre el estrés abiótico por salinidad y el estrés biótico por infección viral. Además, los estudios publicados hasta el momento muestran resultados dispares. Por ejemplo, en plantas de *N. benthamiana* en condiciones de estrés por salinidad infectadas con el virus *Eggplant mottled crinkle virus* (EMCV) se ha observado una drástica reducción de la acumulación viral, sugiriendo que el estrés por salinidad tiene un efecto negativo sobre la infección (Moldakimova et al., 2012). Por otro lado, plantas de guisante cv. BRS-Maratoa, resistente a *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), muestran una mayor acumulación viral al ser sometidas a estrés por salinidad previamente a la inoculación (24 horas). Además, tras 6 días de tratamiento de salinidad (dps), las plantas infectadas en condiciones de estrés, mostraron un peso seco de raíces y hojas menor al observado tanto en plantas no infectadas en las mismas condiciones como en plantas infectadas en condiciones control. Sin embargo, cuando se aplica el estrés de forma simultánea a la infección, no se produce una mayor acumulación viral. Al aplicar de forma simultánea ambos estreses tampoco se observa a los 6 dps una disminución del peso seco de raíces y hojas en comparación con plantas no infectadas y bajo tratamiento de salinidad, aunque sí se produce una disminución del peso en comparación con plantas infectadas en condiciones control (Varela et al., 2019). En el reciente estudio de Gharsallah y colaboradores (Gharsallah et al., 2020) se sometió a estrés por salinidad a plantas de tomate cv. Mouna HF1, sensible tanto a estrés por salinidad como a *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV), y a plantas de tomate cv. San Miguel, resistentes tanto al estrés por salinidad como a TYLCSV. Al cuantificar la cantidad de virus se observó que, independientemente del cultivar, las plantas en condiciones de estrés por salinidad presentaban una mayor acumulación de DNA viral que las plantas infectadas en condiciones control.

El presente capítulo tiene como objetivo caracterizar la interacción entre el estrés salino y la infección por *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en plantas de *N. benthamiana* y tomate cv. Moneymaker. El capítulo se ha dividido en dos secciones según la aproximación utilizada: en la primera sección determinaremos el efecto del estrés por salinidad sobre la infección de TYLCV mediante la aplicación de un tratamiento de salinidad en los primeros estadios de la infección (9 días post-infección, dpi). En la segunda sección analizaremos el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta al estrés por salinidad mediante la aplicación de un tratamiento de salinidad en plantas con una infección establecida (15 dpi).

RESULTADOS

2.1 Efecto del estrés por salinidad en la infección de TYLCV en plantas de *N. benthamiana*.

2.1.1 Diseño experimental.

Con el objetivo de estudiar el efecto del estrés salino sobre la infección del geminivirus TYLCV en la planta modelo *N. benthamiana*, agroinoculamos plantas de *N. benthamiana* con TYLCV y, en estadios tempranos de la infección, las plantas se sometieron a estrés por salinidad. Se agroinocularon 24 plantas de 3 semanas de edad, 12 plantas con un clon infectivo de TYLCV (día 0) y 12 con un vector binario sin virus (pGWB501) como control negativo (*mock*). La mitad de las plantas de cada grupo se sometieron a un tratamiento de salinidad a los

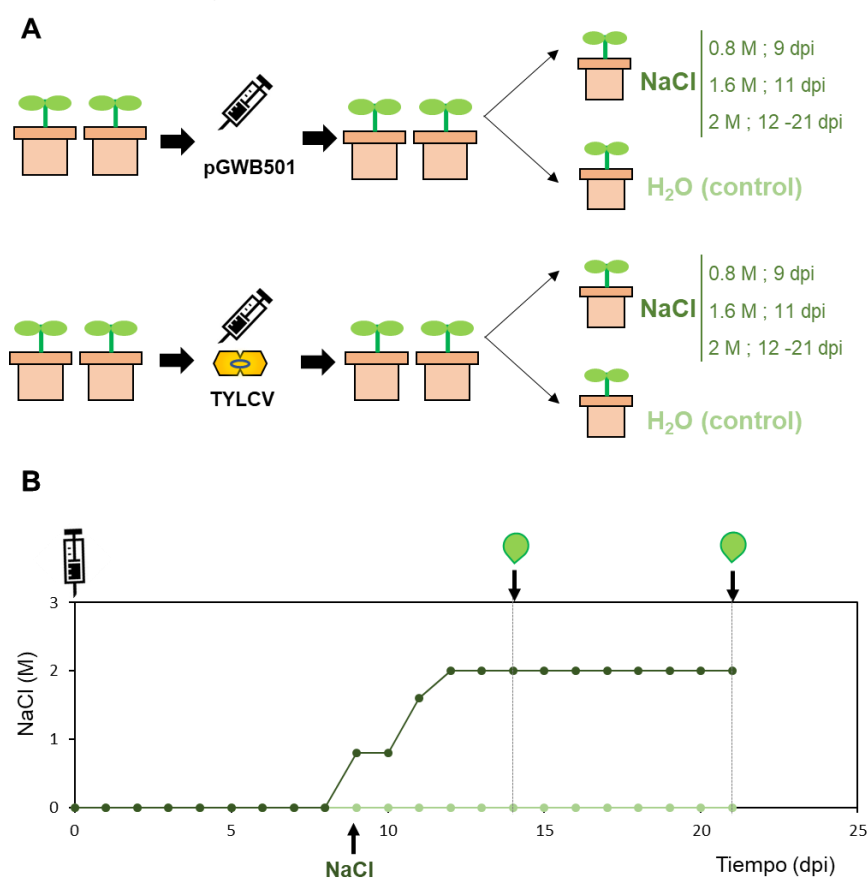


Figura 2.1. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de *N. benthamiana* en sustrato a 24°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 2-3 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron inoculados con el vector pGWB501 o con el clon infectivo de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 8 días en condiciones control para garantizar la transferencia del T-DNA. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de salinidad (indicado en verde oscuro), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (indicado en verde claro). **(B)** El tratamiento de salinidad se inició a los 9 dpi, regándose las plantas con 50 ml de NaCl disuelto en agua a una concentración de 0.8 M, a 11 dpi se aumentó la concentración de NaCl a 1.6 M, y a 12 dpi se estableció una concentración de NaCl de 2 M. A partir de los 12 dpi se regó en días alternos con 50 ml de agua con una concentración de NaCl 2 M o con 50 ml de agua. Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin sal.

9 dpi (figura 2.1A), permitiendo la inserción del T-DNA que contiene el clon viral infectivo en las mismas condiciones en todas las plantas, así como alcanzar la concentración salina final a los 12 dpi. El tratamiento de salinidad consistió en la suplementación del riego con NaCl. Se inició aplicando 50 ml de agua suplementada con NaCl a 0.8 M, aumentando la concentración salina el doble cada dos días hasta estabilizarla en una concentración de NaCl de 2 M a los 12 dpi, concentración que se mantendría hasta los 21 dpi (figura 2.1B). Se seleccionó una concentración de NaCl de 2M ya que en ensayos previos, se observó que a esta concentración las plantas presentan síntomas de estrés por salinidad, permitiendo el seguimiento de la intensidad de los síntomas de estrés salino. Las plantas *mock* recibieron el mismo tratamiento que las plantas infectadas, dividiéndose a los 9 dpi en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento de salinidad (NaCl) y en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento control (sin estrés salino). Las plantas control (infectadas y *mock*) recibieron el mismo volumen de agua sin NaCl que las plantas bajo estrés salino.

Para caracterizar la infección en cada grupo de plantas se evaluó su estado fisiológico, analizándose: (i) la eficiencia del fotosistema II (PSII) a los 14 y 21 dpi, (ii) la intensidad de los síntomas de estrés salino y de la infección causada por TYLCV, cada dos días, (iii) el crecimiento de las plantas, midiéndose la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice a los 0 y 21 dpi, calculando su diferencia, y (iv) la acumulación de virus en las hojas apicales a los 14 y 21 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas R-I, R-II y R-III) utilizando 24 plantas en cada una de las réplicas (seis por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

Cabe añadir que durante la caracterización de los síntomas de TYLCV se observó que, aunque las plantas infectadas y mantenidas en condiciones control presentaron síntomas típicos de la infección por TYLCV (rizado y amarilleamiento de hojas, así como inhibición del crecimiento) a partir de los 12 dpi, las plantas infectadas y bajo tratamiento de salinidad presentaron cambios fenotípicos que dificultaron la monitorización de los síntomas de la infección. Probablemente esto se deba a que el estrés por salinidad provoca una mayor rigidez de la hoja. Además, las hojas de plantas provenientes de plantas bajo tratamiento de salinidad presentan un color más claro que las hojas provenientes de plantas control, por lo que el amarilleamiento provocado por la infección de TYLCV no era tan evidente, al combinarse con el cambio de color inducido por el estrés salino. Esta interferencia provocada por los síntomas de estrés por salinidad en los síntomas provocados por la infección de TYLCV, impidió que la caracterización de los síntomas por TYLCV fuera precisa, por lo que no se muestran gráficamente los resultados de la monitorización de los síntomas causados por la infección viral.

2.1.2 El estrés salino dificulta la acumulación de virus en plantas de *N. benthamiana*.

Puesto que el estrés por salinidad afecta a la eficiencia fotosintética (Arif *et al.*, 2020), un método no destructivo que permite cuantificar el estrés de la planta en condiciones de salinidad es la medición de la eficiencia del fotosistema II (PSII). Con el objetivo de monitorizar la intensidad del estrés por salinidad aplicado en cada réplica biológica, se midió la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y en 2 hojas apicales, con el fin de analizar una zona cercana y otra distal a la raíz, realizándose 3 réplicas técnicas por medición. De esta forma, midiendo la eficiencia del PSII, se determinó de manera indirecta el nivel de estrés salino al que estaba sometida la planta, incluyendo zonas en las que no existieran tejidos dañados u hojas senescentes.

Las mediciones realizadas para cuantificar la eficiencia del PSII muestran cómo a los 14 dpi (5 días tras el inicio del tratamiento de estrés por salinidad), en general, no disminuye la eficiencia del PSII (figura 2.2). Sin embargo, a los 21 dpi (tras 12 días de tratamiento con NaCl) se observa una drástica disminución de la eficiencia del PSII en todas las plantas sometidas a estrés por salinidad. Tanto las plantas infectadas con TYLCV como las plantas *mock* bajo estrés por

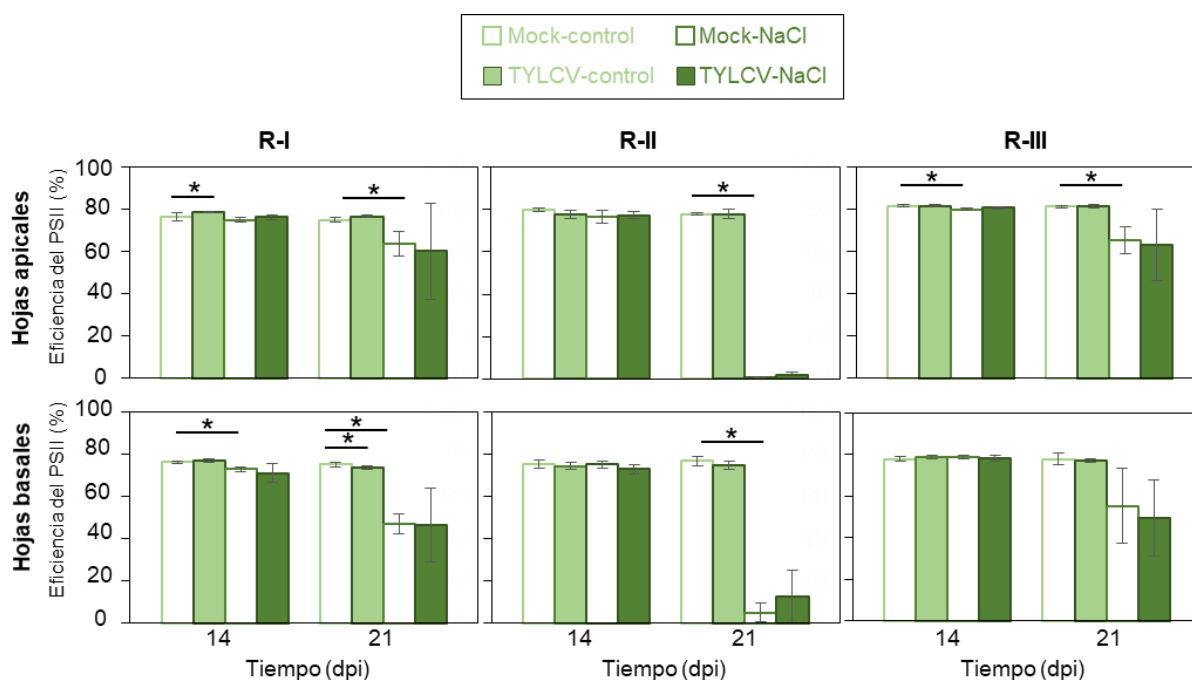


Figura 2.2. Eficiencia del PSII en plantas de *N. benthamiana* bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*) a 14 dpi y 21 dpi. Se analizó la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y 2 hojas apicales de cada planta, realizándose tres réplicas técnicas por cada medición. Las barras representan la media y las barras de error representan la desviación estándar (DS), con n=6. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,01$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

salinidad (TYLCV-NaCl y mock-NaCl) presentaron una disminución de la eficiencia del PSII en comparación con las plantas TYLCV-control y *mock*-control, respectivamente, que se puede observar de forma consistente a los 21 dpi (figura 2.2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock* e infectadas en condiciones control de forma reproducible. En ninguna réplica se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock*-NaCl y plantas TYLCV-NaCl ni a 14 (tras 5 días de tratamiento de estrés por salinidad) dpi ni a 21 dpi (tras 12 días de tratamiento de estrés por salinidad) (figura 2.2). Puesto que todas las plantas en condiciones de estrés por salinidad presentaron valores de eficiencia del PSII similares, nuestros datos indican que, a partir de los 14 dpi, las plantas de las tres réplicas biológicas estuvieron sometidas a estrés salino de manera uniforme.

Con respecto a los síntomas o fenotipos debidos al estrés por salinidad, no se observaron diferencias significativas en su severidad entre las plantas infectadas y las plantas *mock* a los 21 dpi (figura 2.3). Las plantas control, cuyo riego se realizaba sin suplementar con NaCl (infectadas y *mock*), mantuvieron la turgencia de sus tejidos y un intenso color verde hasta finalizar el experimento al contrario que las plantas bajo tratamiento de estrés salino (infectadas y *mock*) que perdieron turgencia, y cuyas hojas se rizaron y amarillaron. Estos resultados se mantuvieron en las tres réplicas, mostrando que el tratamiento de salinidad provocó un fenotipo visualmente apreciable en todas las plantas en cada una de las réplicas realizadas (figura 2.3).

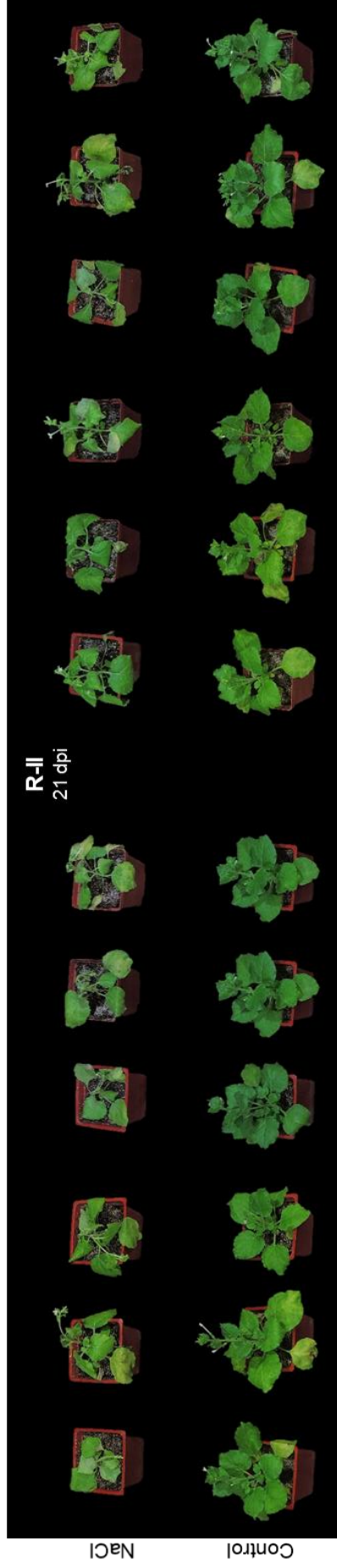
A continuación, se procedió a analizar el efecto en el crecimiento de la planta provocado por la combinación del estrés biótico, la infección por TYLCV, y el estrés por salinidad. El análisis del crecimiento de las plantas en condiciones control muestra un menor incremento de altura en las plantas infectadas en comparación con las plantas *mock*. En todas las réplicas realizadas se observó un menor crecimiento de las plantas infectadas con TYLCV en condiciones control, con un crecimiento medio en las tres réplicas de 11.08 ± 2.06 cm, en comparación con las plantas *mock* en condiciones control (14.18 ± 2.89 cm), siendo la diferencia estadísticamente significativa en dos de las tres réplicas (R-I y R-III) (figura 2.4). Además, se observó un efecto diferencial del estrés salino en el crecimiento en las plantas no infectadas: las plantas *mock* bajo estrés salino presentan un menor crecimiento que las plantas control (figura 2.4), con un incremento medio de altura de 10.5 ± 3.79 cm frente a 14.18 ± 2.89 cm, respectivamente. El efecto del estrés salino es similar en las plantas infectadas con TYLCV: las plantas infectadas crecidas bajo tratamiento salino presentan un crecimiento de 8.3 ± 1.42 cm, mientras que el crecimiento de plantas infectadas bajo condiciones control es de 11.08 ± 2.06 cm (figura 2.4).

Mock

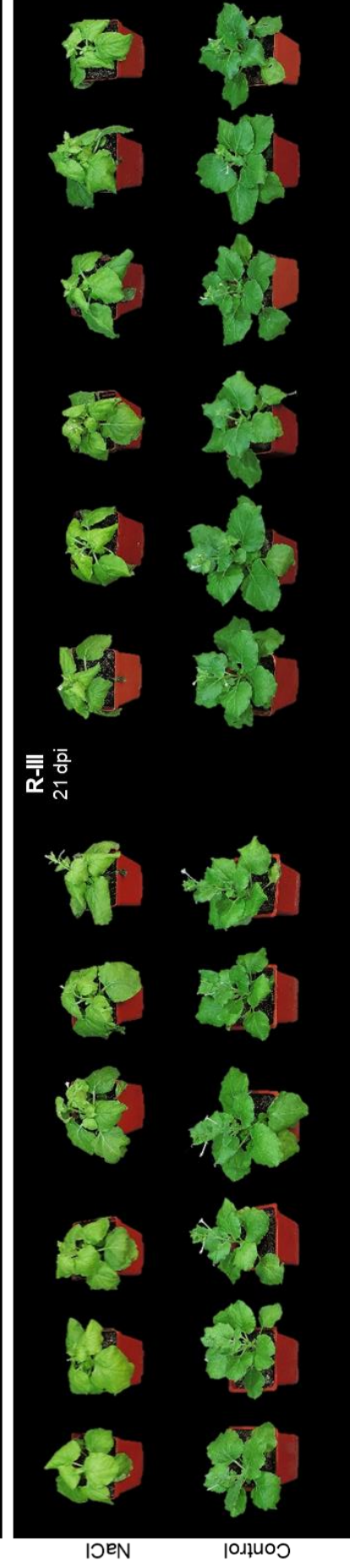
TYLCV



R-I
21 dpi



R-II
21 dpi



R-III
21 dpi

Figura 2.3. Síntomas de estrés por salinidad en *N. benthamiana*. Plantas de *N. benthamiana* infectadas con el clon infectivo de TYLCV o inoculadas con el vector pGWB501, tras 12 días de tratamiento de salinidad o en condiciones control, a los 21 dpi (barra de escala, 10 cm). Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon COOLPIX P520.

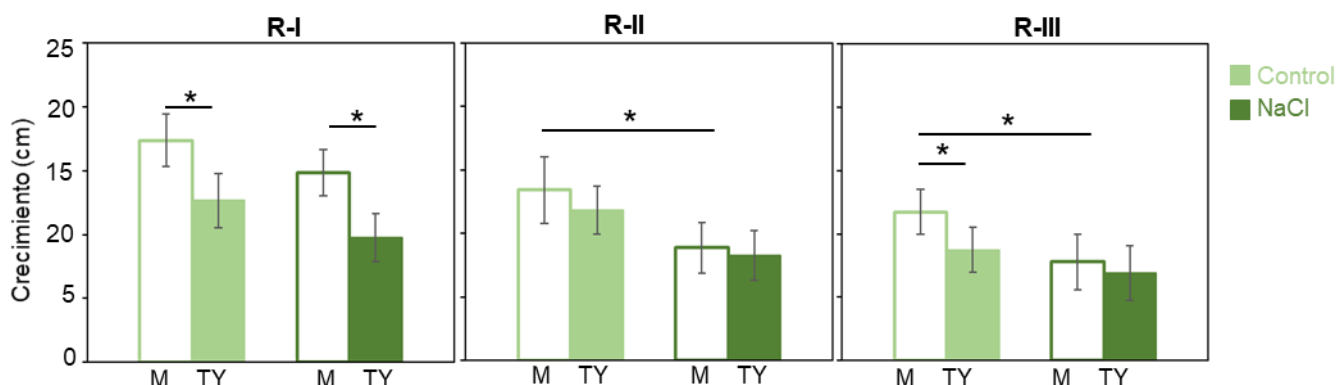


Figura 2.4. Crecimiento de plantas de *N. benthamiana* sometidas a estrés por salinidad (verde oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (verde claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (mock, M). Se muestra la media de crecimiento de cada grupo a los 21 dpi (diferencia de altura entre 0 dpi y 21 dpi). Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con $n=6$. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

Cabe destacar que las plantas bajo estrés por salinidad presentan un crecimiento similar independientemente de si pertenecen al grupo de plantas infectadas (8.3 ± 1.42 cm) o plantas *mock* (10.5 ± 3.79 cm). Este patrón se observó en dos de las tres réplicas (a excepción de la réplica R-I, donde se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre *mock*-NaCl y TYLCV-NaCl), lo cual sugiere que los efectos provocados por el estrés por salinidad en el aspecto y en el crecimiento de la planta enmascaran los provocados por el virus.

Para finalizar la caracterización del efecto que el estrés salino pudiera tener sobre la infección por geminivirus en *N. benthamiana*, se cuantificó la cantidad relativa de TYLCV mediante PCR a tiempo real (qPCR) en plantas infectadas. Todas las plantas infectadas presentaron cantidades significativas de DNA viral (la planta 2 de la R-II presentó DNA de TYLCV, a diferencia de las plantas *mock*, aunque en menor proporción que el resto de plantas infectadas de la réplica R-II). Asimismo, todas las plantas infectadas en condiciones control presentaron síntomas característicos de la infección por TYLCV, como rizado y amarilleamiento de las hojas, a los 14 y 21 dpi en las tres réplicas biológicas. La cantidad relativa de virus detectada durante la infección de plantas de *N. benthamiana*, no muestra cambios estadísticamente significativos entre plantas bajo tratamiento de estrés por salinidad y plantas control a los 14 dpi (figura 2.5A, eje Y en escala logarítmica). Sin embargo, la acumulación viral a los 21 dpi es significativamente menor en las plantas crecidas bajo tratamiento de estrés por salinidad que en las cultivadas bajo tratamiento control (figura 2.5A). De hecho, aunque existe variabilidad en la cantidad relativa de DNA viral entre plantas de un mismo tratamiento, al hacer la media de cada tratamiento se observa que,

Además, la cantidad relativa de TYLCV aumenta de 14 a 21 dpi en plantas control, pero no lo hace de manera evidente en las plantas sometidas a estrés salino (figura 2.5B, en escala logarítmica). Se obtuvieron resultados similares en todas las réplicas realizadas, aunque la menor acumulación viral observada en las plantas bajo estrés por salinidad es estadísticamente significativa en dos de las tres réplicas (R-I y R-II).

Estos resultados se repiten en las tres réplicas biológicas, sugiriendo que el estrés por salinidad, en estadíos tempranos de la infección, produce una inhibición de la acumulación de TYLCV en plantas de *N. benthamiana*.

2.2 Efecto del estrés por salinidad en la infección de TYLCV en plantas de tomate.

2.2.1 Diseño experimental.

A continuación, se analizó el efecto del estrés salino sobre la infección del geminivirus TYLCV en uno de sus hospedadores naturales, tomate. Para ello seguimos una aproximación similar a la utilizada en *N. benthamiana*, ya que agroinoculamos plantas de tomate con TYLCV, sometiéndolas a estrés por salinidad en estadíos tempranos de la infección (9 dpi). 24 plantas de tomate de 3 semanas de edad fueron agroinoculadas con un clon infectivo de TYLCV (día 0, 12 plantas) o con un vector binario sin virus (pGWB501) como control negativo (*mock*, 12 plantas). La mitad de estas plantas comenzaron a someterse a un tratamiento de salinidad a los 9 dpi, mientras que la otra mitad se mantuvo en condiciones control (figura 2.6A), permitiendo la inserción del T-DNA que contiene el clon viral infectivo en las mismas condiciones en todas las plantas, así como alcanzar la concentración salina final a los 12 dpi.

El tratamiento de salinidad consistió, al igual que en *N. benthamiana*, en la suplementación de NaCl al riego. Se comenzó el tratamiento de estrés por salinidad aplicando 50 ml de agua suplementada con NaCl a 0.8 M, la concentración salina fue aumentada el doble cada dos días hasta mantenerla en una concentración de NaCl a 2 M a los 12 dpi, concentración que se prolongaría hasta la finalización del experimento (21 dpi) (figura 2.6B). De esta forma, tanto las plantas *mock* como las plantas infectadas recibieron el mismo tratamiento, dividiéndose a los 9 dpi en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento de salinidad (NaCl) y en otro grupo de 6 plantas bajo tratamiento control (sin estrés salino). Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin NaCl que las plantas bajo estrés salino.

Para caracterizar la infección en cada grupo de plantas de tomate se evaluó su estado fisiológico caracterizándose: (i) la eficiencia del fotosistema II (PSII) a los 14 y 21 dpi (ii) la intensidad de los síntomas de estrés salino y de la infección causada por TYLCV, cada dos días, (iii) el crecimiento de las plantas, midiéndose

la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice a los 0 y 21 dpi, calculando su diferencia, y (iv) la acumulación de virus en las hojas apicales a los 14 y 21 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (R-I, R-II y R-III) utilizando 24 plantas en cada una de las réplicas (seis por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de forma independiente.

Sin embargo, durante el análisis de los síntomas provocados por TYLCV se detectó un efecto similar al descrito en el apartado anterior en *N. benthamiana*. Mientras que las plantas infectadas y en condiciones control desarrollaban síntomas de TYLCV a partir de los 12 dpi (rizado y amarilleamiento de hojas, malformaciones en los brotes e inhibición del crecimiento), se observó una interferencia de los síntomas debidos al estrés por salinidad en los síntomas provocados por TYLCV en las plantas bajo estrés salino.

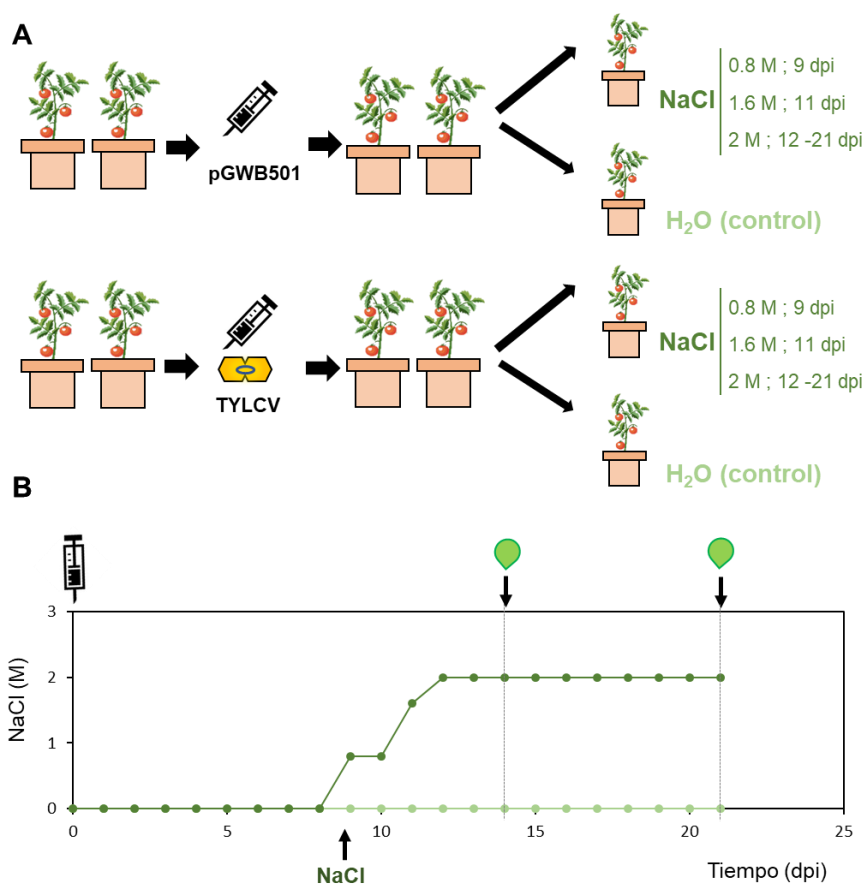


Figura 2.6. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de tomate en sustrato a 24°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 3-4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron inoculados con el vector pGWB501 o con el clon infectivo de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 8 días en condiciones control para garantizar la transferencia del T-DNA. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de salinidad (indicado en verde oscuro), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (indicado en verde claro). **(B)** El tratamiento de salinidad se inició a los 9 dpi, regándose las plantas con 50 ml de NaCl disuelto en agua a una concentración de 0.8 M, a 11 dpi se aumentó la concentración de NaCl a 1.6 M, y a 12 dpi se estableció una concentración de NaCl de 2 M. A partir de los 12 dpi se regó en días alternos con 50 ml de agua suplementada con NaCl a 2 M o con 50 ml de agua. Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin sal.

Probablemente esto se deba a que el estrés por salinidad provoca una mayor rigidez de la hoja. El estrés por salinidad en tomate no sólo induce una mayor rigidez en la hoja, que dificulta el rizado provocado por TYLCV, y cambios en la coloración, interfiriendo con el amarilleamiento típico de plantas infectadas, sino que también induce el debilitamiento y posterior abscisión de las hojas. Esta interferencia provocada por los síntomas de estrés por salinidad en los síntomas inducidos por la infección de TYLCV, impidió que la caracterización de los síntomas por TYLCV fuera precisa en tomate, por lo que no se muestran gráficamente los resultados de la monitorización de los síntomas causados por la infección viral.

2.2.2 El estrés salino dificulta la acumulación de virus en plantas de tomate.

Con el objetivo de analizar la intensidad del estrés por salinidad al que se sometió a cada réplica biológica, se cuantificó la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y en 2 hojas apicales.

Los datos obtenidos mediante la cuantificación de la eficiencia del PSII muestran cómo a 14 dpi (5 días tras el inicio del tratamiento de estrés por salinidad), no disminuye la eficiencia del PSII debido al estrés en ninguna de las tres réplicas realizadas (figura 2.7). Por el contrario, a los 21 dpi (12 días tras el inicio del tratamiento con NaCl) detectamos una disminución de la eficiencia del PSII en todas las plantas sometidas a estrés por salinidad. De forma similar a lo observado en *N. benthamiana*, en tomate se produjo una disminución de la eficiencia del PSII tanto en las plantas TYLCV-NaCl como en las plantas *mock*-NaCl en comparación con las plantas TYLCV-control y *mock*-control, respectivamente (figura 2.7). Por otro lado, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock*-control y TYLCV-control a los 21 dpi. Asimismo, a 21 dpi tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock*-NaCl y TYLCV-NaCl. Estos datos indican que, al igual que en *N. benthamiana*, las plantas de tomate de las tres réplicas biológicas estuvieron sometidas a estrés salino de forma similar a los 14 y 21 dpi, sugiriendo que todas las plantas mantuvieron niveles de estrés salino similares durante el experimento.

Por otro lado, se analizó el fenotipo de las plantas debido al estrés salino. No se observaron diferencias significativas en la severidad del fenotipo de estrés por salinidad entre las plantas de tomate *mock* y las plantas infectadas bajo tratamiento por estrés salino; tanto las plantas *mock* como las plantas infectadas mostraron síntomas de estrés salino con una intensidad similar a los 21 dpi (figura 2.8). Mientras las plantas control (infectadas y *mock*) mantuvieron la turgencia de sus tejidos y un intenso color verde al finalizar el experimento, todas las plantas bajo tratamiento de estrés salino (infectadas y *mock*) presentaron una

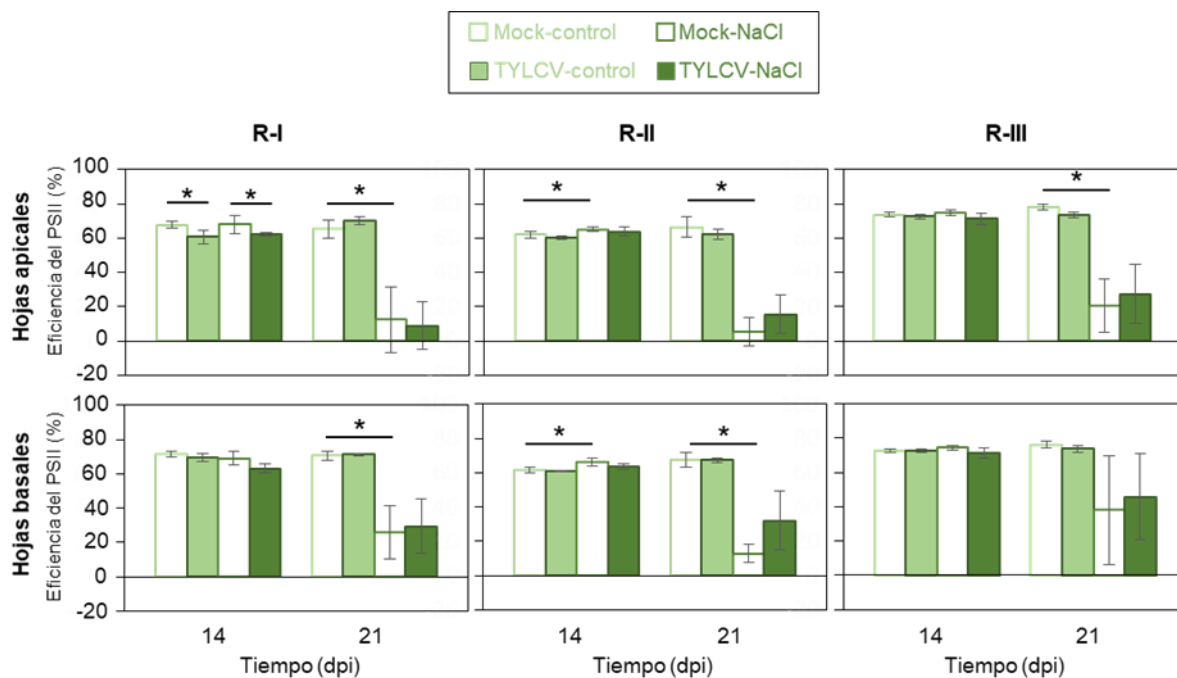


Figura 2.7 Eficiencia del PSII en plantas de tomate bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*) a 14 dpi y 21 dpi. Se analizó la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y 2 hojas apicales de cada planta realizándose tres réplicas técnicas por cada medición. Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con n=6. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,01$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

pérdida de turgencia que conllevó la pérdida de la capacidad de mantenerse erguidas, así como un amarilleamiento de sus hojas. Estos resultados son consistentes, repitiéndose en las tres réplicas e indicando que el tratamiento de salinidad provocó un fenotipo visualmente apreciable en todas las plantas de tomate en las tres réplicas realizadas (figura 2.8).

Seguidamente se procedió a estudiar el efecto de la interacción entre la infección por TYLCV (estrés biótico), y el estrés por salinidad (estrés abiótico) en el crecimiento de las plantas de tomate. En condiciones control, el crecimiento es menor en las plantas infectadas en comparación con las plantas *mock*. En las tres réplicas realizadas se detectó una disminución del crecimiento de las plantas infectadas con TYLCV (8.12 ± 2.60 cm) en comparación con las plantas *mock*, ambas en condiciones control (11.41 ± 2.83 cm), siendo esta disminución del crecimiento estadísticamente significativo en dos de las tres réplicas realizadas (R-I y R-III) (figura 2.9). Esta inhibición del crecimiento de la planta ante la infección por TYLCV es similar a la observada en *N. benthamiana* (ver sección 2.1.2 del presente capítulo), y ha sido descrita previamente tanto en *N. benthamiana* como en tomate (Czosnek, 2009; Díaz-Pendón *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2020). Por otro lado, las plantas *mock* crecidas bajo tratamiento de estrés por salinidad tienen un crecimiento medio de 5.41 ± 1.52 cm, mientras que el crecimiento medio de las cultivadas bajo condiciones control es de 11.4 ± 2.83

Mock

TYLCV

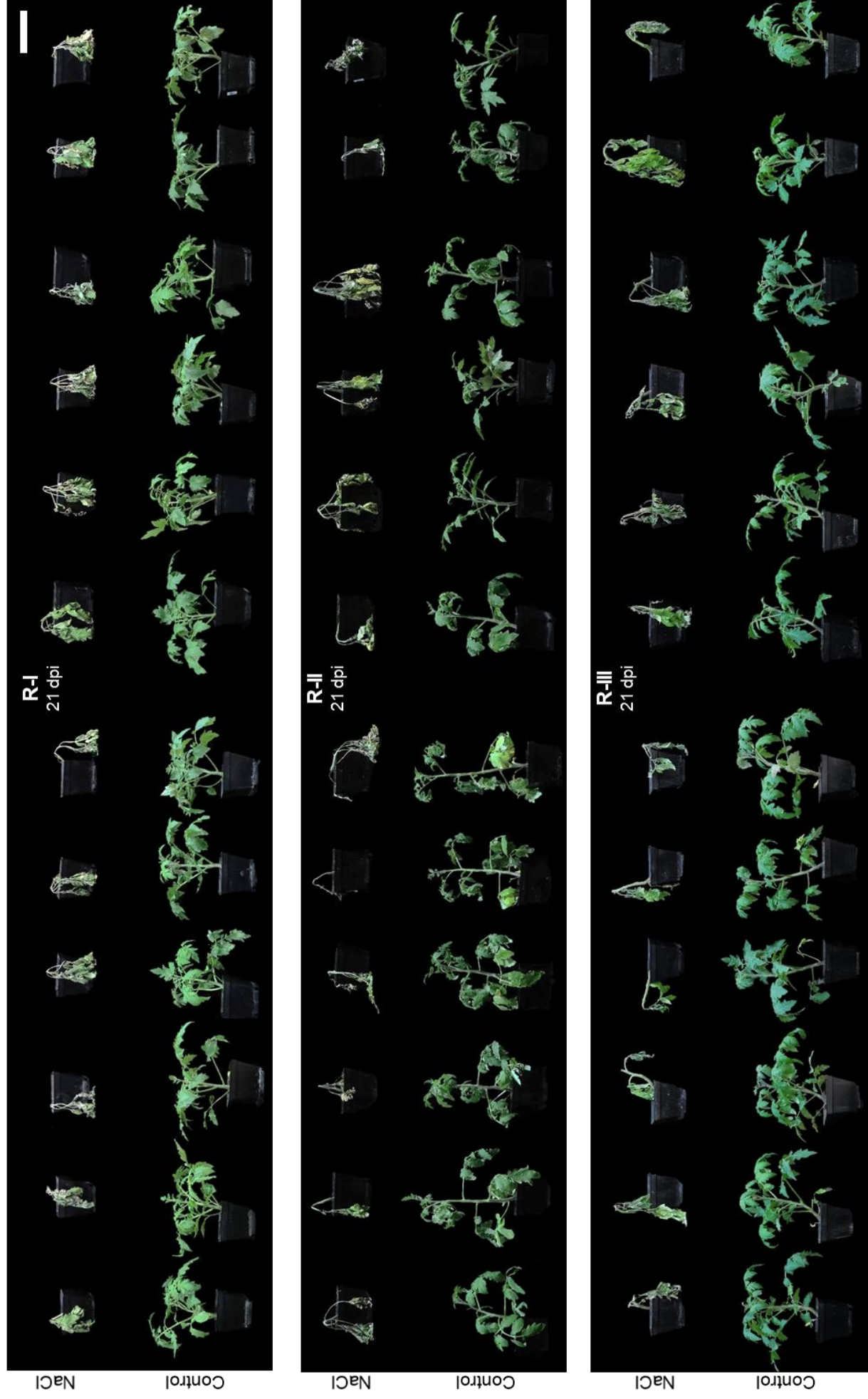


Figura 2.8. Síntomas de estrés por salinidad en plantas de tomate. Plantas de tomate infectadas con el clon infectivo de TYLCV o inoculadas con un vector pGWB501, tras 12 días de tratamiento de salinidad o en condiciones control a los 21 dpi (barra de escala, 10 cm). Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon COOLPIX P520.

cm, indicando que el estrés por salinidad afecta de forma negativa al crecimiento de plantas de tomate. De forma similar, las plantas infectadas por TYLCV bajo condiciones de estrés por salinidad, presentaron un crecimiento menor (5.17 ± 1.76 cm) que las plantas infectadas bajo condiciones control (8.12 ± 2.6 cm) (figura 2.9). Estos datos indican que, al igual que en plantas de *N. benthamiana*, las plantas de tomate bajo estrés por salinidad presentan un crecimiento menor, independientemente de si pertenecen al grupo de plantas infectadas o plantas *mock*.

Este patrón se observó en las tres réplicas biológicas, poniendo en evidencia el dramático efecto que el estrés salino tiene en el crecimiento de la planta.

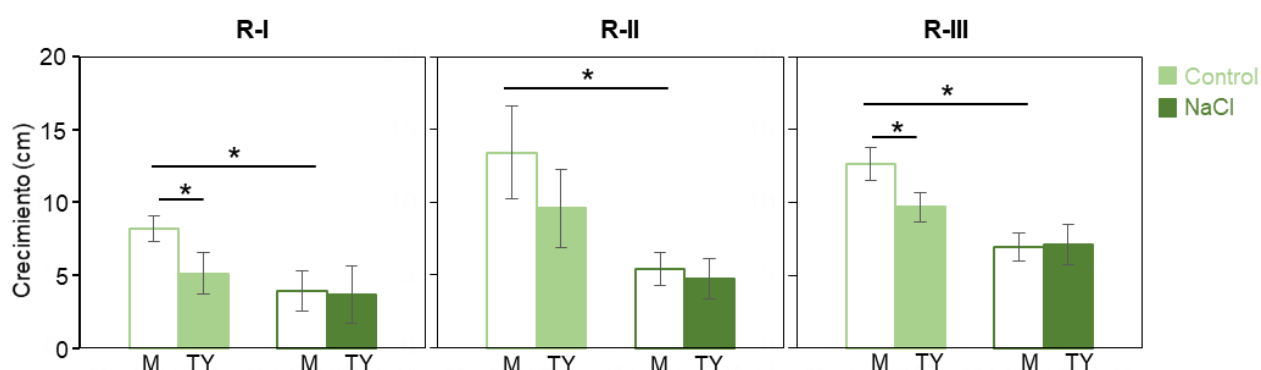


Figura 2.9. Crecimiento de plantas de tomate sometidas a estrés por salinidad (verde oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (verde claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (*mock*, M). Se muestra la media de crecimiento de cada grupo a los 21 dpi (diferencia de altura entre 0 dpi y 21 dpi). Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con $n=6$. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

Por último, con el objetivo de caracterizar el efecto que el estrés por salinidad pudiera tener en la infección por geminivirus en tomate, se analizó la cantidad relativa de TYLCV mediante qPCR en plantas infectadas. Todas las plantas presentaron cantidades significativas de DNA viral tanto a 14 como a 21 dpi (figura 2.10). Asimismo, se observó como todas las plantas infectadas con TYLCV en condiciones control desarrollaban a los 14 y 21 dpi síntomas producidos por TYLCV, como rizado de las hojas, abortos florales y amarilleamiento de las hojas.

En las plantas control, la acumulación viral presentó valores similares a los 14 y 21 dpi (figura 2.10), demostrando que TYLCV infectó con éxito todas las plantas utilizadas en el grupo control y que en general, los niveles máximos de acumulación viral se alcanzaban en tomate a los 14 dpi (excepto R-I). Por el contrario, en las plantas bajo tratamiento de salinidad, se registró una drástica disminución de la acumulación viral a los 21 dpi (tras 12 días de tratamiento de estrés por salinidad) en comparación con la carga viral observada en plantas también sometidas a estrés salino a los 14 dpi (figura 2.10A). De hecho, la media

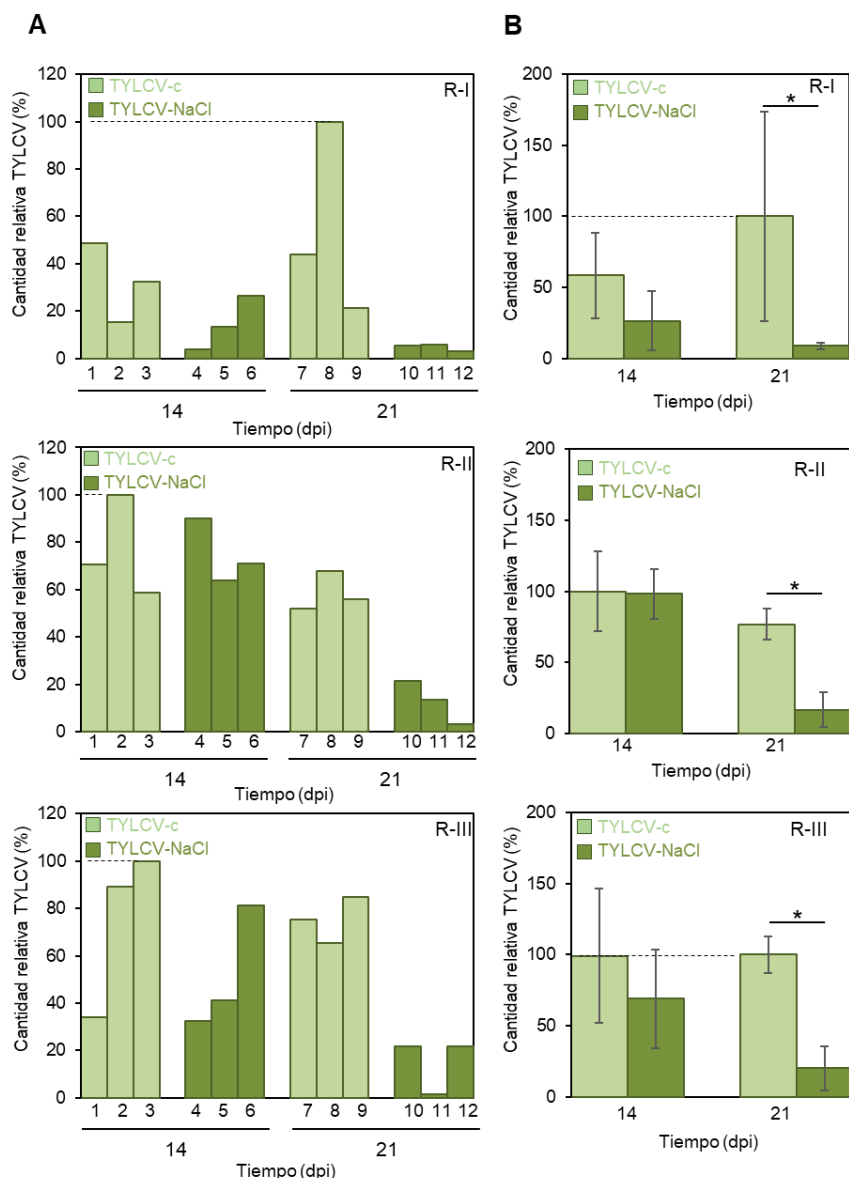


Figura 2.10. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en tomate a 14 dpi y a 21 dpi. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y salinidad “NaCl”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición ($n = 3$) a los 14 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 21 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se analizó mediante qPCR, utilizando el gen *25S rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor de cantidad relativa de DNA viral el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Las barras representan el valor para plantas independientes (**A**) o la media de tres plantas (**B**); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; las barras de error muestran la SD con $n=3$ (numeradas del 1 al 12). Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,05$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

de los valores de carga viral de las plantas TYLCV-control a 21 dpi es mayor respecto a la media de los valores de carga viral de las plantas TYLCV-NaCl en las tres réplicas (figura 2.10B). En las tres réplicas biológicas realizadas se observó el mismo efecto; ninguna planta bajo estrés salino presentó una carga

viral que se aproximara a los valores obtenidos en las plantas control a 21 dpi (figura 2.10A).

Estos resultados, en conjunto, muestran que el estrés salino interfiere negativamente con la capacidad de infección de TYLCV en ambas especies de solanáceas, tomate y *N. benthamiana*.

2.3 Efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino en *N. benthamiana*.

2.3.1 Diseño experimental

El diseño experimental seguido para estudiar el efecto de la infección de TYLCV en la respuesta a estrés salino en *N. benthamiana* es similar al de experimentos anteriores, pero sometiendo a las plantas a estrés salino en estadios avanzados de la infección viral, cuando ésta ya se encuentra establecida. Para ello, se agroinfiltraron plantas de *N. benthamiana* con TYLCV y a los 15 dpi, las plantas se sometieron a estrés salino. Se agroinocularon 24 plantas de 3 semanas de edad, 12 plantas con un clon infectivo de TYLCV (día 0) o 12 plantas con un vector binario sin virus (pGWB501) como control negativo (*mock*). La mitad de las plantas de cada grupo, comenzaron a someterse a un tratamiento de salinidad a los 15 dpi (figura 2.11A), alcanzándose así la concentración salina final (2 M) en estadios tardíos de la infección (20 dpi). El tratamiento de salinidad consistía en la suplementación del riego con NaCl que se inició aplicando 50 ml de agua suplementada con NaCl a 0.8 M, aumentando paulatinamente la concentración salina a 1.6M (17 dpi) y 2 M (20 dpi). A partir de los 21 dpi la concentración de NaCl se mantuvo en 2 M hasta los 28 dpi (figura 2.11B). Las plantas *mock* recibieron el mismo tratamiento que las plantas infectadas, dividiéndose a los 15 dpi en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento de salinidad (NaCl) y en un grupo de 6 plantas bajo tratamiento control (sin estrés salino). Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin NaCl que las plantas bajo estrés salino.

Para caracterizar la respuesta a estrés por salinidad en cada grupo de plantas se evaluó su estado fisiológico examinándose: (i) la acumulación viral en las hojas apicales a los 21 y 28 dpi, (ii) el crecimiento de las plantas, midiéndose la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice a los 21 y 28 dpi, calculando su diferencia, (iii) la intensidad de los síntomas de estrés salino, y (iv) la eficiencia del PSII a los 21 y 28 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas R-I, R-II y R-III), utilizando 24 plantas en cada una de las réplicas (6 por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

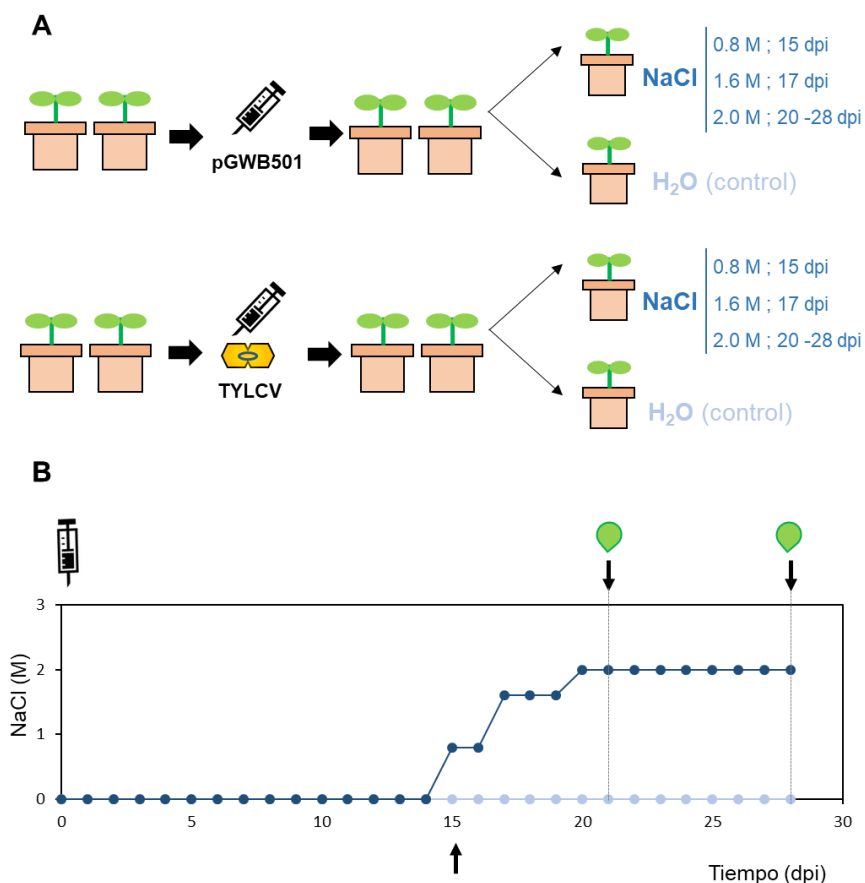


Figura 2.11. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de *N. benthamiana* en sustrato a 24°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 2-3 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron inoculados con el vector pGWB501 o con el clon infeccioso de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 14 días en condiciones control para garantizar la infección por TYLCV. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de salinidad (indicado en azul oscuro), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (indicado en azul claro). **(B)** El tratamiento de salinidad se inició a los 15 dpi, regándose las plantas con 50 ml de NaCl disuelto en agua a una concentración de 0.8 M, a 17 dpi se aumentó la concentración de NaCl a 1.6 M, y a 20 dpi se estableció una concentración de NaCl de 2 M. A partir de los 20 dpi se regó en días alternos con 50 ml de agua a 2 M o con 50 ml de agua. Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin sal.

2.3.2 La infección por TYLCV confiere una tolerancia leve a la salinidad en *N. benthamiana*.

Como paso previo a analizar el efecto de la infección de TYLCV en la respuesta al estrés por salinidad, se analizó la carga viral relativa mediante PCR cuantitativa (qPCR) de las plantas infectadas con el objetivo de comprobar que todas las plantas utilizadas en los experimentos presentaban cantidades significativas y similares de DNA viral. Para ello, se recogieron muestras provenientes de las plantas infectadas bajo el tratamiento control (regadas con agua), a los 21 y 28 dpi. Todas las plantas agroinoculadas, presentaron a los 21 dpi cantidades significativas de DNA viral que, en general, se vieron incrementadas a los 28 dpi, demostrando que la infección con TYLCV se había

producido en el 100% de las plantas inoculadas en las tres réplicas biológicas (figura 2.12, en escala logarítmica). Por otro lado, las plantas bajo estrés por salinidad mostraban ciertas diferencias respecto a las plantas infectadas en condiciones control (figura 2.12A). A los 21 dpi las plantas bajo condiciones

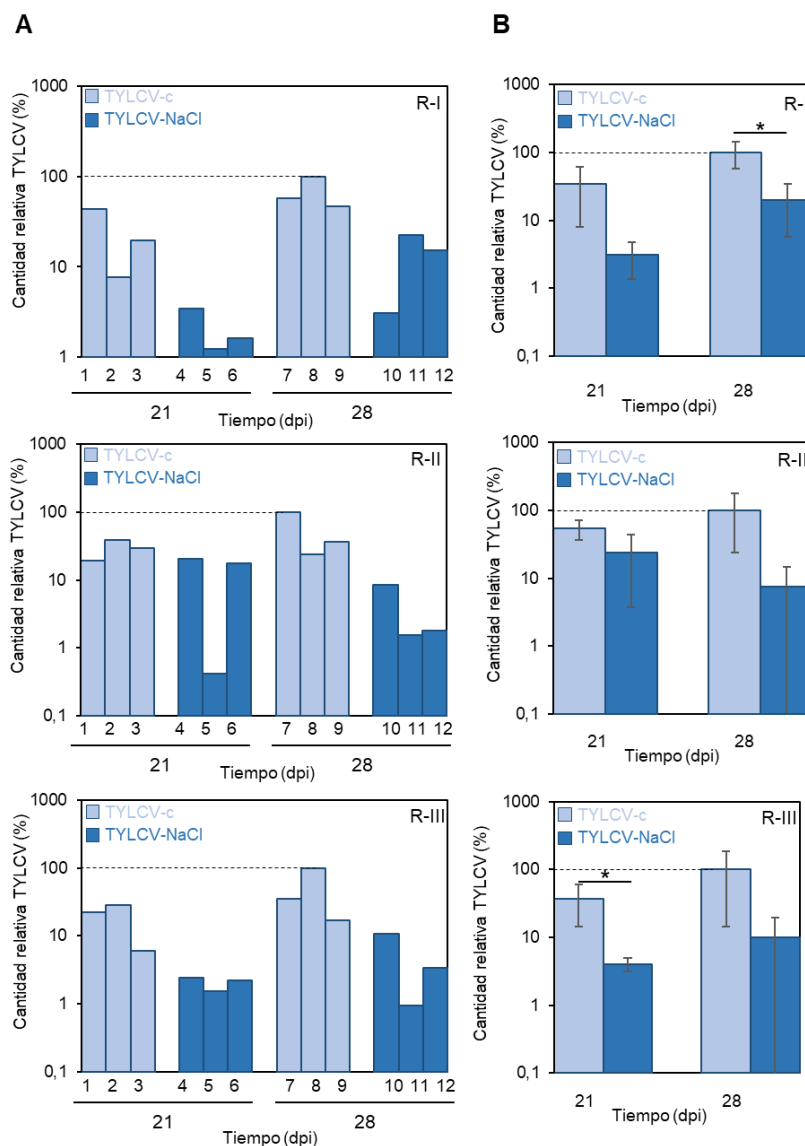


Figura 2.12. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en *N. benthamiana* a 21 dpi y a 28 dpi. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y salinidad “NaCl”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición ($n = 3$) a los 21 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 28 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se cuantificó mediante qPCR, utilizando el gen *25S rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor de cantidad relativa de DNA viral más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Los resultados se muestran con el eje Y en escala logarítmica. Las barras representan el valor para plantas independientes (A) o la media de tres plantas (B); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; las barras de error muestran la SD con $n=3$ (numeradas del 1 al 12). Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,05$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

control presentaban una mayor acumulación de DNA de TYLCV en comparación con las plantas bajo estrés por salinidad, que solo resultó ser significativa en una de las réplicas (R-III). Esta misma tendencia se observó a los 28 dpi, ya que existía una ligera disminución en la cantidad de TYLCV en plantas bajo estrés salino cuando se comparaba con las condiciones control, pero esta reducción solo era estadísticamente significativa en una de las réplicas (R-I). Estos datos sugieren que, si el estrés salino ocurre en plantas en las que la infección por TYLCV ya se encuentra establecida, la presencia de DNA viral se mantiene tras 13 días de estrés salino y la acumulación viral se ve sólo ligeramente afectada. Podemos concluir que estas condiciones experimentales en las que el 100% de las plantas estaban infectadas y con cantidades significativas de DNA viral, nos permitían caracterizar el posible efecto de la presencia de TYLCV sobre el estrés salino.

Posteriormente, con el objetivo de cuantificar uno de los fenotipos más evidentes asociados a la infección por TYLCV, la inhibición del crecimiento de las plantas, se procedió a determinar la diferencia en altura de las plantas, desde el cuello de la raíz hasta el ápice a los 21 y 28 dpi, en las tres réplicas realizadas. El análisis de los datos obtenidos para las plantas infectadas en el tratamiento control a los 28 dpi refleja un menor crecimiento de las plantas infectadas (2.48 ± 0.42 cm) en comparación con las plantas *mock* (6.08 ± 0.84 cm), siendo la diferencia estadísticamente significativa en todas las réplicas (figura 2.13). Por otro lado, las plantas bajo estrés salino presentan un menor crecimiento que las plantas control (figura 2.13). Las plantas *mock* crecidas bajo tratamiento de estrés por salinidad tienen un incremento medio de altura de 0.62 ± 0.38 cm, mientras que el aumento medio de las cultivadas bajo condiciones control es de 6.08 ± 0.84 cm. El efecto del estrés salino es similar en las plantas infectadas

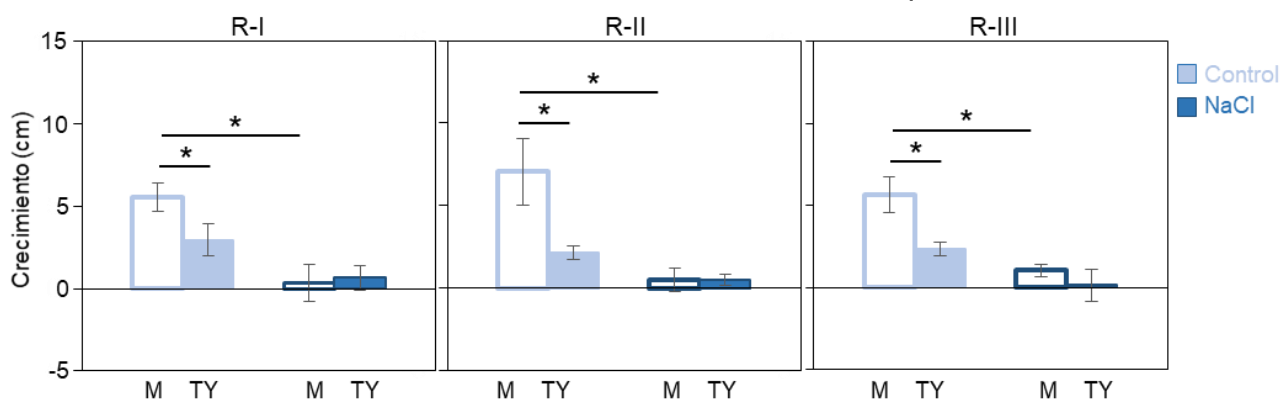


Figura 2.13. Crecimiento de plantas de *N. benthamiana* sometidas a estrés por salinidad (azul oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (azul claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (*mock*, M). Se muestra la media de crecimiento de cada grupo a los 28 dpi (diferencia de altura entre 21 dpi y 28 dpi). Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con n=6. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

con TYLCV; las plantas infectadas crecidas bajo tratamiento salino presentan un crecimiento de 0.44 ± 0.25 cm, mientras que el crecimiento de plantas infectadas bajo condiciones control es de 2.49 ± 0.42 cm. (figura 2.13). Cabe destacar que las plantas sometidas a estrés por salinidad presentan un crecimiento similar independientemente de si pertenecen al grupo de plantas infectadas (0.44 ± 0.25 cm) o plantas *mock* (0.62 ± 0.38 cm). Este patrón se observó en las tres réplicas biológicas, poniendo en evidencia el dramático efecto negativo que el estrés salino tiene sobre el crecimiento de la planta, que supera al decremento en tamaño que induce la infección por TYLCV y sugiere que el estrés por salinidad enmascara el efecto de la infección viral en el crecimiento de la planta.

A continuación, con el objetivo de observar si la infección por TYLCV inducía una mayor tolerancia a episodios de estrés por salinidad, se procedió a analizar los síntomas originados por el estrés salino. Mientras las plantas control (infectadas y *mock*), cuyo riego se realizaba sin suplementar con NaCl, mantuvieron la turgencia de sus tejidos y un intenso color verde al finalizar el experimento, en general, las plantas bajo tratamiento de estrés salino perdieron turgencia, sus hojas se amarillaron y mostraron un intenso rizado de sus hojas (figura 2.14), aunque se detectaron ciertas diferencias entre las plantas infectadas y no infectadas. Todas las plantas *mock* sometidas a estrés salino de las tres réplicas, presentaron una intensa pérdida de turgencia al igual que un rizado y un amarilleamiento de sus hojas debido al estrés por salinidad (figura 2.14). A diferencia de las plantas *mock*-NaCl, las plantas TYLCV-NaCl desarrollaron síntomas de estrés por salinidad menos intensos que las plantas *mock*-NaCl, manteniendo sus hojas una mayor turgencia y un color verde más intenso. Esta mayor tolerancia al estrés por salinidad era evidente en las réplicas I y II (R-I, R-II), aunque no se observaron diferencias manifiestas en la réplica III (R-III) (figura 2.14). Estos resultados sugieren que la infección por TYLCV conferiría una mayor tolerancia a la salinidad. Aunque, debido a que no todas las réplicas mostraron el mismo efecto, no se descartó la posibilidad de que la tolerancia a salinidad observada en las plantas infectadas por TYLCV no fuera realmente significativa.

Por último, se procedió a analizar la eficiencia del PSII con el objetivo de evaluar el estrés de la planta producido por el tratamiento de salinidad y determinar de manera cuantitativa si la infección por TYLCV induce una mayor tolerancia al estrés por salinidad. Si la presencia de TYLCV provocara una disminución del estrés por salinidad (TYLCV-NaCl), las plantas infectadas bajo tratamiento de estrés salino deberían presentar una menor disminución de la eficiencia del PSII en comparación con las plantas *mock* bajo dicho estrés (*mock*-NaCl). Para cuantificar esta variable en cada planta, se midió la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y en 2 hojas apicales, con el fin de analizar una zona cercana y otra distal a la raíz, realizándose 3 réplicas técnicas por medición. De esta forma se pretendía estudiar el estrés que soportaba toda la planta, incluyendo zonas que

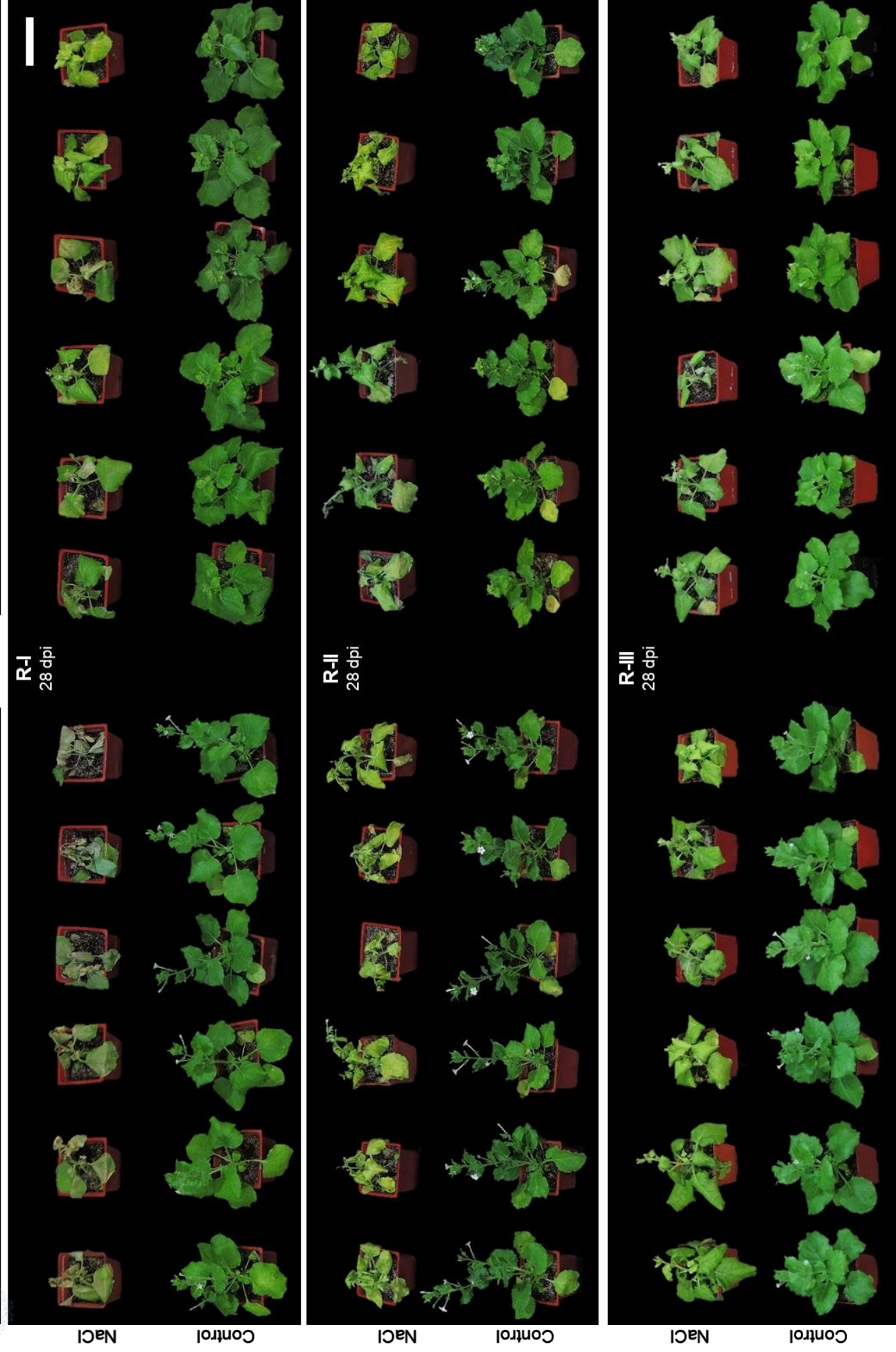


Figura 2.14. Síntomas de estrés por salinidad en *N. benthamiana*. Plantas de *N. benthamiana* infectadas con el clon infectivo de TYLCV o inoculadas con un vector pGWB501, tras una semana de tratamiento de salinidad o en condiciones control, a los 28 dpi (barra de escala, 10 cm). Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon COOLPIX P520.

no incluyeran hojas senescentes o tejidos dañados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock-control* y TYLCV-control a los 21 y 28 dpi en ninguna de las tres réplicas realizadas, indicando que la infección por TYLCV *per se* no afecta la eficiencia del PSII. Por otro lado, las mediciones realizadas para cuantificar la eficiencia del PSII muestran como a 21 dpi (6 días después de iniciar el tratamiento de estrés por salinidad), se observan diferencias significativas en la eficiencia del PSII en las plantas bajo estrés por salinidad en comparación con las plantas control, en general tanto en hojas basales como apicales (figura 2.15). Esta disminución de la eficiencia del PSII se torna drástica en las plantas sometidas a estrés salino durante 13 días (28 dpi). Tanto las plantas TYLCV-NaCl como las plantas *mock*-NaCl presentaron una disminución de la eficiencia del PSII a los 28 dpi en comparación con las plantas TYLCV-control y *mock*-control, respectivamente (figura 2.15). Cabe mencionar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre plantas *mock*-NaCl y plantas TYLCV-NaCl ni a 21 ni a 28 dpi, indicando que la infección por TYLCV no induce cambios en la eficiencia del PSII en condiciones de estrés por salinidad (figura 2.15).

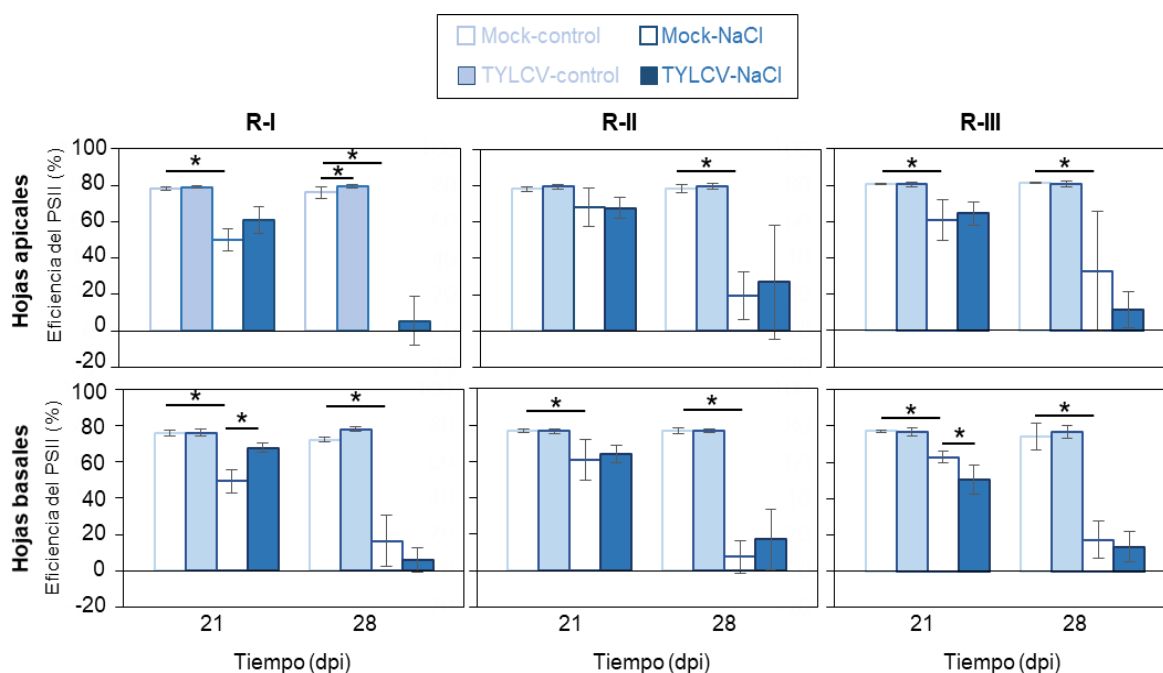


Figura 2.15. Eficiencia del PSII en plantas de *N. benthamiana* bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*) a 21 dpi y 28 dpi. Se analizó la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y 2 hojas apicales de cada planta, realizándose tres réplicas técnicas por cada medición. Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con n=6. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,01$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

Nuestros resultados indican que las plantas infectadas por TYLCV presentan un fenotipo asociado al estrés salino menos severo que el de las plantas *mock*, lo cual sugeriría una posible tolerancia a este estrés abiótico inducida por la presencia del geminivirus. Sin embargo, esta mayor tolerancia a estrés por salinidad no parece correlacionarse con una disminución del efecto de la salinidad en la eficiencia del PSII. Por lo que no podemos descartar que TYLCV no induzca una mayor tolerancia al estrés por salinidad en *N. benthamiana* o la desencadene mediante un mecanismo no relacionado con la eficiencia del PSII.

2.4 Efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino en tomate.

2.4.1 Diseño experimental

El diseño experimental seguido para estudiar el efecto de la infección de TYLCV en la respuesta a estrés salino en tomate es similar al realizado en *N. benthamiana* (sección 2.3.1. del presente capítulo), sometiéndose las plantas de tomate a estrés salino en estadios avanzados de la infección viral. Agroinoculamos plantas de tomate con TYLCV y a los 15 dpi las plantas se sometieron a estrés por salinidad. Se agroinocularon 24 plantas de 3 semanas de edad, 12 plantas con un clon infectivo de TYLCV (día 0) o 12 plantas con un vector binario sin virus (pGWB501) como control negativo (*mock*). La mitad de las plantas de cada grupo, se sometieron a un tratamiento de salinidad a los 15 dpi (figura 2.16).

El tratamiento de salinidad consistía, al igual que en *N. benthamiana*, en la suplementación del riego con NaCl. El tratamiento de estrés salino se inició aplicando 50 ml de agua suplementada con NaCl a 0.8 M, aumentando la concentración salina gradualmente a 1.6 M (17 dpi), 2 M (20 dpi) y 4 M (21 dpi). A los 21 dpi, se estabilizó la concentración de NaCl en 4 M, manteniéndose hasta los 28 dpi (figura 2.16B). De esta forma, se alcanzaría la concentración salina final en estadios tardíos de la infección (20 dpi). Se decidió estabilizar la concentración final de NaCl en 4 M en tomate ya que ensayos previos, tan sólo se detectaban cambios visibles, susceptibles de ser monitorizados, a partir de los 4 M de NaCl.

De esta forma, ambos grupos de plantas, *mock* e infectadas, recibieron el mismo tratamiento, dividiéndose a los 15 dpi en dos grupos de 6 plantas; un grupo de plantas bajo tratamiento de salinidad (NaCl) y otro grupo de plantas bajo tratamiento control (sin estrés salino). Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin NaCl que las plantas bajo estrés salino.

Para caracterizar la respuesta a estrés por salinidad en cada grupo de plantas se evaluó su estado fisiológico analizándose: (i) la cantidad de virus en las hojas

apicales a los 21 y 28 dpi, (ii) la intensidad de los síntomas de estrés salino, (iii) el crecimiento de las plantas, midiéndose la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice a los 21 y 28 dpi, calculando su diferencia, y (iv) la eficiencia del PSII a los 21 y 28 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas R-I, R-II y R-III), utilizando 24 plantas en cada una de las réplicas (6 por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

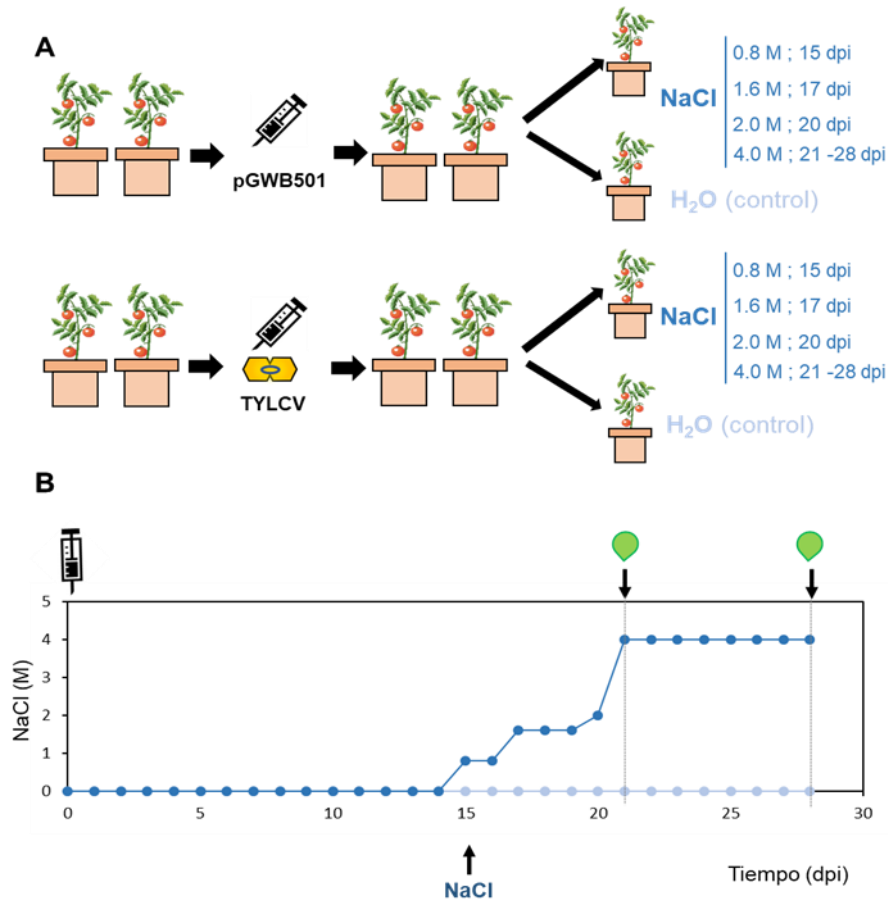


Figura 2.16. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de tomate en sustrato a 24°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 3-4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 12 individuos que fueron inoculados con el vector pGWB501 o con el clon infeccioso de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 14 días en condiciones control para garantizar la transferencia del T-DNA y la infección de TYLCV. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 6 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de salinidad (indicado en azul oscuro), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (indicado en azul claro). **(B)** El tratamiento de salinidad se inició a los 15 dpi, regándose las plantas con 50 ml de NaCl disuelto en agua a una concentración de 0.8 M, a 17 dpi se aumentó la concentración de NaCl a 1.6 M, a los 20 dpi se aumentó la concentración de NaCl a 2 M y, a 21 dpi, se estableció una concentración de NaCl de 4 M. A partir de los 21 dpi se regó en días alternos con 50 ml de agua a 4M o con 50 ml de agua. Las plantas control recibieron el mismo volumen de agua sin sal.

2.4.2 La infección por TYLCV no confiere tolerancia a salinidad en tomate

Previamente a efectuar el análisis del efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino, se procedió a medir la cantidad relativa de TYLCV mediante PCR cuantitativa (qPCR) de las plantas de tomate infectadas para comprobar que todas las plantas utilizadas en los experimentos presentaban una carga viral apreciable y similar. Por ello, se recogieron muestras provenientes de las plantas infectadas a los 21 y 28 dpi. Todas las plantas control (regadas sólo con agua) presentaron a los 21 dpi cantidades significativas de TYLCV. De hecho, se observó un incremento de la cantidad de DNA viral a los 28 dpi (figura 2.17A). Puesto que todas las plantas mostraron cantidades de DNA de TYLCV, los resultados demostraron que la infección con TYLCV se había producido en todas las plantas utilizadas en las tres réplicas biológicas. Sin embargo, las plantas de tomate bajo estrés por salinidad mostraron, de forma similar a lo observado en *N. benthamiana*, diferencias en la acumulación viral a los 28 dpi respecto a las plantas bajo condiciones control. A los 21 dpi las plantas bajo condiciones control presentaban una carga viral similar a las plantas bajo estrés salino, manteniéndose este resultado en las tres réplicas, indicando que el desarrollo de la infección no se veía afectado tras 6 días de estrés salino. Aunque a los 21 dpi no se detectaron diferencias en la acumulación viral entre plantas control y plantas sometidas a estrés salino, a 28 dpi las plantas control presentaban una mayor cantidad de DNA viral a la observada en las plantas bajo estrés por salinidad. Aunque observamos la misma tendencia en las tres réplicas realizadas, esta diferencia fue estadísticamente significativa tan sólo en una de las tres réplicas realizadas (R-II) (figura 2.17B). Estos resultados sugieren que, si el estrés salino se inicia en plantas de tomate en las que la infección por TYLCV se encuentra en estadios avanzados, no se observa un decremento de la acumulación viral hasta al menos 13 días de presencia del estrés salino, no detectándose en nuestros experimentos un efecto estadísticamente significativo sobre la acumulación viral tras 6 días de estrés por salinidad.

En cualquier caso, podemos concluir que estas condiciones experimentales en las que el 100% de las plantas de tomate estaban infectadas por TYLCV, y con cantidades elevadas de TYLCV al menos a los 21 dpi (6 días de tratamiento salino) nos permitían caracterizar el posible efecto de la presencia de TYLCV sobre el estrés por salinidad.

Puesto que uno de los síntomas más evidentes causados por la infección por TYLCV es la inhibición del crecimiento, decidimos analizar el crecimiento de las plantas de tomate. Con este objetivo, se cuantificó la diferencia de altura desde el cuello de la raíz hasta el ápice tanto a 21 dpi como a 28 dpi de todas las plantas utilizadas en las tres réplicas. Aunque se observó menor crecimiento en las plantas infectadas (1.89 ± 0.92 cm) en comparación con las plantas *mock* en condiciones control (3.02 ± 1.36 cm), no se observaron diferencias

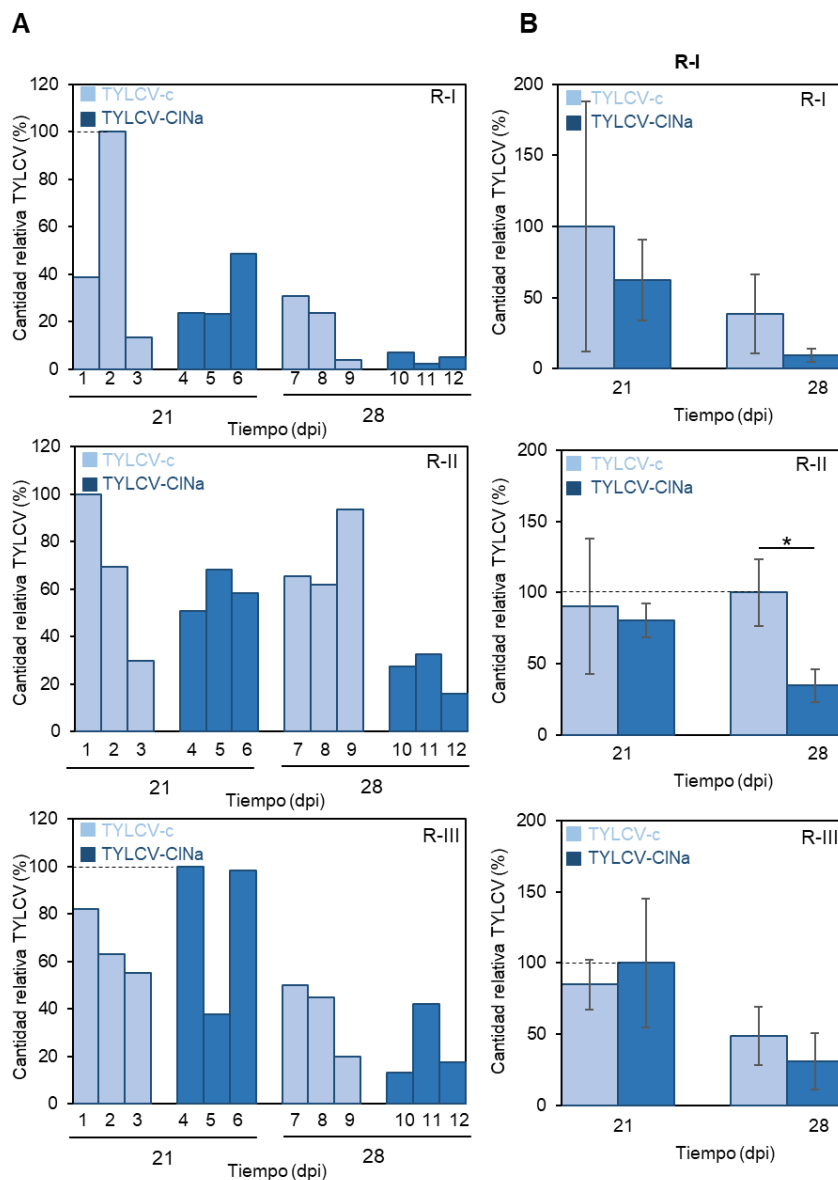


Figura 2.17. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en tomate a 21 dpi y a 28 dpi. De las 6 plantas infectadas en cada condición (control, “c” y salinidad “NaCl”), se analizó la acumulación del DNA viral de 3 plantas por condición (n = 3) a los 21 dpi (1-6) y otras 3 plantas por condición a los 28 dpi (7-12). La cantidad relativa de TYLCV se analizó mediante qPCR, utilizando el gen *25S rDNA* (Mason *et al.*, 2008) como normalizador. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor de cantidad relativa de DNA viral más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Las barras representan el valor para plantas independientes (**A**) o la media de tres plantas (**B**); los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; las barras de error muestran la SD con n=3 (numeradas del 1 al 12). Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,05$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

estadísticamente significativas en ninguna de las tres réplicas realizadas. Estos datos sugieren que la infección por TYLCV no provocó una inhibición del crecimiento significativa durante el período en el que se desarrollaron estas mediciones de crecimiento (7 días). De hecho, al analizar el desarrollo de las

plantas de tomate, aunque se observaron diferencias en el crecimiento entre las plantas bajo tratamiento control respecto a plantas bajo tratamiento de estrés por salinidad (*mock* e infectadas), no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre plantas *mock* y plantas infectadas bajo tratamiento de salinidad; las plantas *mock* crecidas bajo tratamiento de estrés por salinidad presentaban un cambio medio de altura de -0.79 ± 2.15 cm, mientras que el crecimiento medio de las plantas infectadas crecidas bajo tratamiento de salinidad es de 0 ± 0.73 cm (figura 2.18). Estos resultados se mantuvieron en las tres réplicas biológicas, demostrando el efecto negativo que el estrés salino tiene sobre el crecimiento de la planta de tomate, llegando incluso a superar la inhibición producida por la infección de TYLCV. Al igual que ocurre en *N. benthamiana*, estos datos sugieren que estrés por salinidad enmascara el efecto que la infección viral tiene sobre el crecimiento de la planta de tomate.

A continuación, se procedió a estudiar si la infección por TYLCV inducía una mayor tolerancia a episodios de estrés por salinidad. Mientras las plantas control (infectadas y *mock*) mantuvieron la turgencia de sus tejidos y un intenso color verde al finalizar el experimento, todas las plantas bajo tratamiento de estrés salino (infectadas y *mock*) perdieron turgencia, sus hojas se amarillaron y perdieron la habilidad de mantenerse erguidas, independientemente de si pertenecían al grupo de plantas *mock* o infectadas. No se observaron diferencias significativas en la severidad de los síntomas debidos al estrés salino entre las plantas infectadas y las plantas *mock*; tanto las plantas infectadas como las plantas *mock* presentaron intensos síntomas de estrés por salinidad a los 28 dpi (figura 2.19). Estos resultados se mantuvieron en las tres réplicas biológicas, mostrando que el tratamiento de salinidad provocó un fenotipo de estrés en todas las plantas de tomate en las tres réplicas realizadas, independientemente de si pertenecían al grupo *mock*-NaCl o TYLCV-NaCl, y sugieren que TYLCV no confiere de mayor tolerancia al estrés salino en tomate.

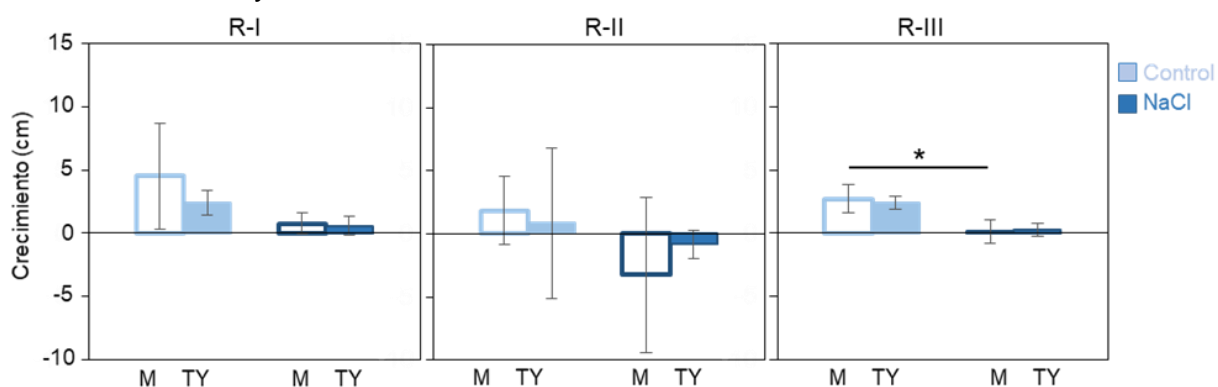


Figura 2.18. Crecimiento de las plantas de tomate sometidas a estrés por salinidad (azul oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (azul claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (*mock*, M). Se muestra la media de crecimiento de cada grupo a los 28 dpi (diferencia de altura entre 21 dpi y 28 dpi). Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con $n=6$. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

Mock

TYLCV

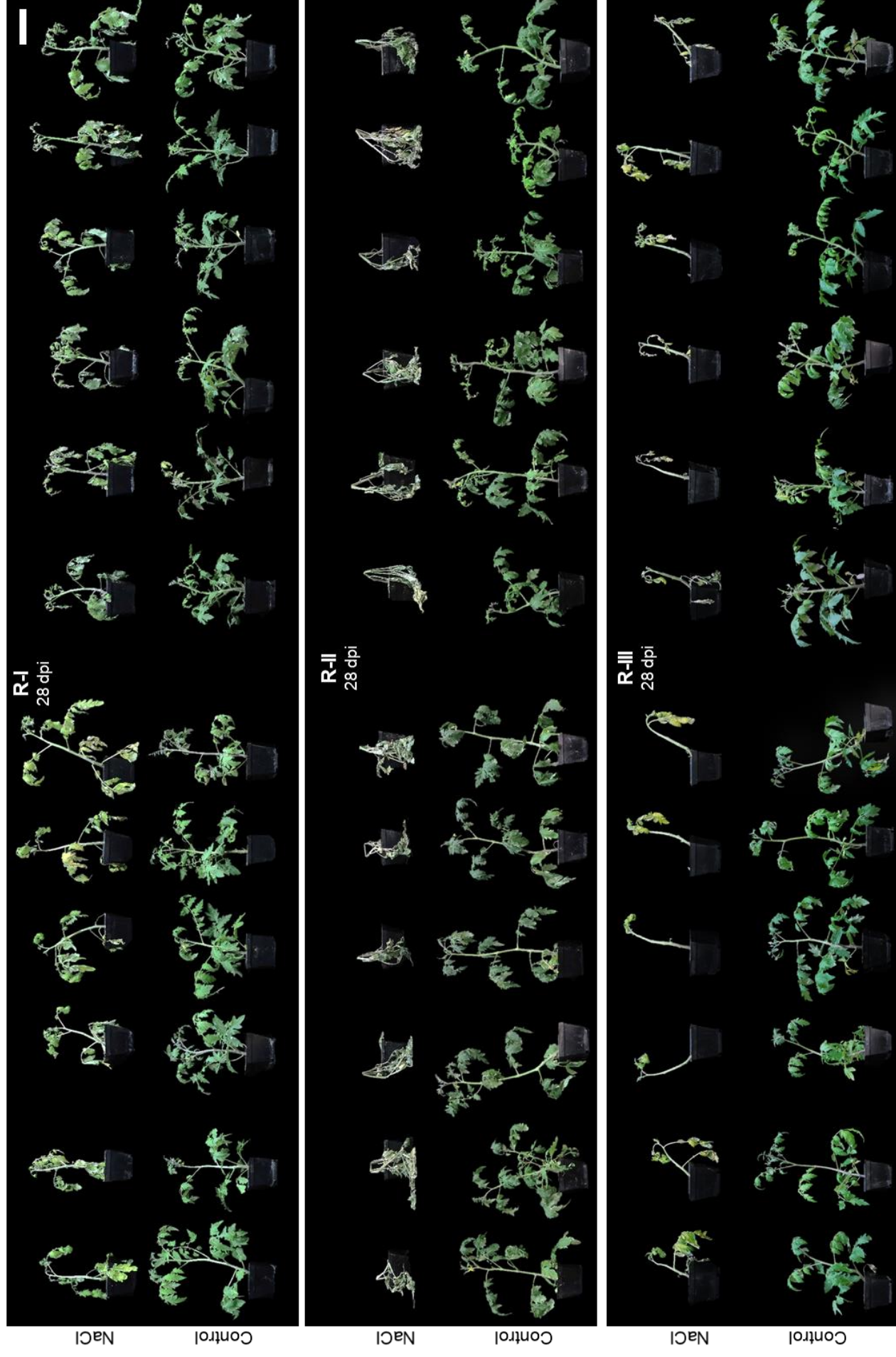


Figura 2.19. Síntomas de estrés por salinidad en plantas de tomate. Plantas de tomate infectadas con el clon infectivo de TYLCV o inoculadas con un vector pGWB501, tras una semana de tratamiento de salinidad o en condiciones control, a los 28 dpi (barra de escala, 10 cm). Las fotografías se realizaron con una cámara Nikon COOLPIX P520.

Los datos fenotípicos descritos hasta el momento no sugerían que la infección por TYLCV indujera una mayor tolerancia al estrés por salinidad en tomate, pero con el fin de completar la caracterización de esta interacción entre el estrés salino y la infección por TYLCV, se procedió a estudiar la eficiencia del PSII en plantas infectadas sometidas a estrés salino. Para comprobar si la infección por TYLCV interfería con la respuesta a estrés por salinidad, se procedió a monitorizar la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y en 2 hojas apicales, con el fin de analizar una zona cercana y otra distal a la raíz, realizándose 3 réplicas técnicas por medición. Las mediciones realizadas en tomate en plantas *mock-control* y TYLCV-control muestran como a 21 y 28 dpi (6 y 13 días después de iniciar el tratamiento de estrés por salinidad respectivamente) no hay diferencias en la eficiencia del PSII. Tanto en las hojas apicales como en las basales, la eficiencia del PSII era similar independientemente de si las plantas pertenecían al grupo *mock-control* o TYLCV-control (sólo se observaron diferencias significativas entre las plantas *mock-control* y TYLCV-control en la réplica I (R-I) a los 21 dpi), sugiriendo que la infección por TYLCV por sí misma no afecta a la eficiencia del PSII. Por el contrario, a los 21 dpi sí se observaron diferencias en la eficiencia del PSII de las plantas bajo estrés salino en comparación con las plantas control (6 días después de iniciar el tratamiento de salinidad), tanto en las hojas apicales como basales (figura 2.20). Puesto que estas diferencias no se reproducen en

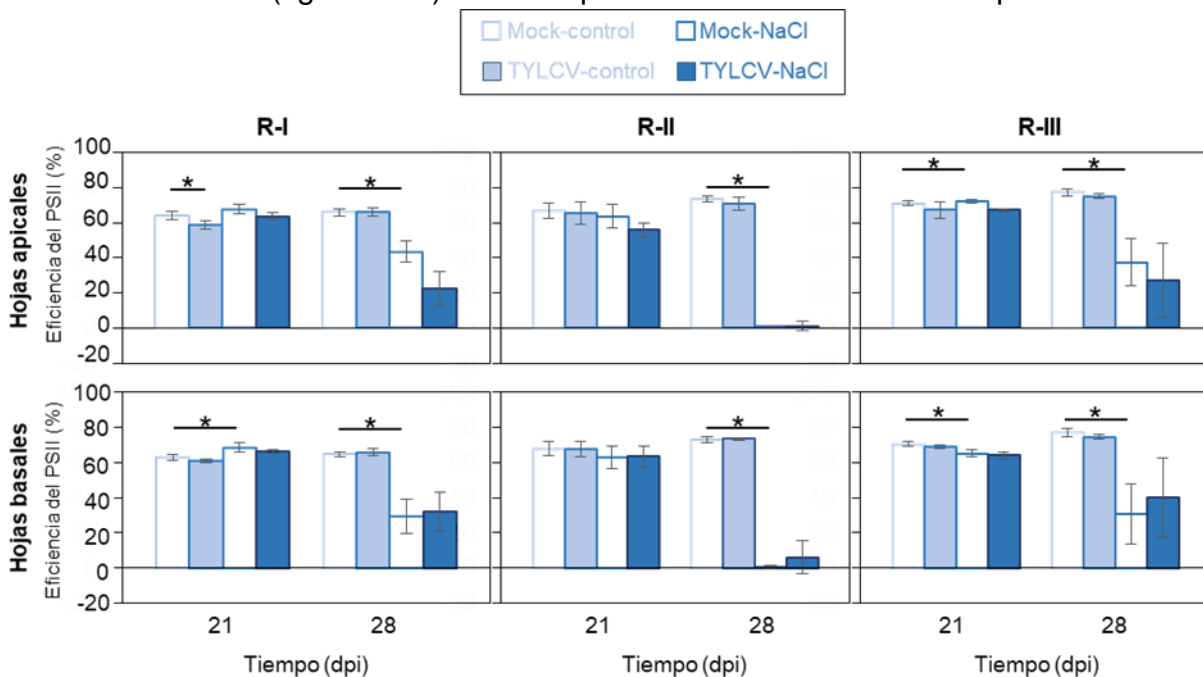


Figura 2.20. Eficiencia del PSII en plantas de tomate bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*) a 21 dpi y 28 dpi. Se analizó la eficiencia del PSII en 2 hojas basales y 2 hojas apicales de cada planta, (6 plantas por tratamiento) realizándose tres réplicas técnicas por cada medición. Las barras representan la media y las barras de error representan la DS, con n=6. Un asterisco indica una diferencia estadísticamente significativa bajo un $\alpha=0,01$ según una prueba de t-Student entre los dos grupos indicados mediante una línea horizontal. R-I, R-II, y R-III representan tres réplicas biológicas independientes.

las diferentes réplicas, es probable que no tengan un significado biológico. Por otro lado, se observó una drástica disminución de la eficiencia del PSII tras 13 días de tratamiento de salinidad (28 dpi) (figura 2.20), de forma similar a lo observado en plantas de *N. benthamiana* (figura 2.15). Tanto las plantas *mock*-NaCl como TYLCV-NaCl presentaron una fuerte disminución de la eficiencia del PSII en comparación, respectivamente, con las plantas *mock*-control y TYLCV-control. Sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la eficiencia del PSII en las plantas TYLCV-NaCl respecto a las plantas *mock*-NaCl ni a 21 ni a 28 dpi (tras 6 y 13 días de tratamiento de estrés por salinidad respectivamente) (figura 2.20). Estos datos se correlacionan con el análisis fenotípico de las plantas, indicando que la infección por TYLCV en tomate no modifica la respuesta de su hospedador al estrés por salinidad, al menos la respuesta asociada a los mecanismos relacionados con la inhibición del crecimiento y la disminución de la eficiencia del PSII, y sugiere que la infección por TYLCV no induce una mayor tolerancia al estrés por salinidad en tomate.

DISCUSIÓN

Actualmente, no existen muchos estudios que analicen las interacciones entre el estrés abiótico por salinidad y el estrés biótico por infección viral (ver anexo II). En la bibliografía tan sólo se han encontrado tres estudios que sugieren diferentes resultados. En el estudio realizado por Moldakimova y colaboradores se demostró que en *N. benthamiana*, períodos de estrés salino inducían una dramática reducción de la acumulación viral de ECMV (Moldakimova *et al.*, 2012). Aunque en otras especies virales se han observado resultados diferentes, por ejemplo, en plantas de tomate cv. Mouna HF1 y cv. San Miguel sometidas a estrés por salinidad se ha detectado un drástico aumento de la carga viral (Gharsallah *et al.*, 2020). Además, dependiendo del momento en el que se inicia el período de estrés por salinidad, el estrés abiótico puede afectar de diferente manera al virus. Por ejemplo, plantas de guisante cv. BRS-Maratoa infectadas con CPSMV presentan una mayor acumulación viral al iniciarse el período de estrés por salinidad previamente a la infección, mientras que la acumulación viral no se ve afectada al iniciarse el tratamiento de estrés salino de forma simultánea a la infección viral (Varela *et al.*, 2019).

Una de las posibles razones por las que existen pocos estudios que analicen el efecto del estrés por salinidad en la infección viral estriba en la dificultad que entraña la cuantificación del estrés salino. Por ello, se han desarrollado diversos procedimientos experimentales por los que se pueden estudiar los efectos de la salinidad en planta (Verslues *et al.*, 2006). Por ejemplo, un método habitual es estudiar la germinación y desarrollo de las plantas en medio MS suplementado con NaCl. Otro método habitual en el estudio de la respuesta al estrés salino es

analizar el desarrollo en plantas crecidas en maceta a las que se añade riego con agua suplementada con NaCl (Verslues *et al.*, 2006).

En el presente capítulo se han utilizado dos aproximaciones para estudiar, por un lado, el efecto del estrés por salinidad en la infección por TYLCV (iniciando el tratamiento de salinidad a los 9 dpi), y, por otro, el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés por salinidad (iniciando el tratamiento de salinidad a los 15 dpi). Puesto que para ambos objetivos necesitábamos aplicar el estrés por salinidad en plantas ya desarrolladas, realizamos los ensayos de estrés por salinidad en plantas crecidas en maceta. Para evitar la plasmólisis se incrementó gradualmente cada dos días la concentración salina. Además, una vez estabilizada la concentración de NaCl, se mantuvo la irrigación de las plantas con la misma concentración salina, con el objetivo de mantener la concentración de NaCl del sustrato estable a lo largo del experimento.

Ya que una de las mayores dificultades para estudiar el estrés por salinidad es producir el estrés de forma uniforme en todas las plantas utilizadas, se procedió a analizar la eficiencia del PSII de las plantas a las que se sometió a estrés salino a los 9 dpi. Los datos obtenidos mostraron que todas las plantas de *N. benthamiana* y tomate sometidas a estrés por salinidad presentaron una disminución similar de la eficiencia del PSII, indicando que todas las plantas en las tres réplicas realizadas estuvieron sometidas a estrés por salinidad de forma uniforme. Además, el análisis del fenotipo de las plantas en condiciones de estrés salino mostró que todas las plantas presentaban un aspecto similar, correlacionándose la homogeneidad en los síntomas de estrés por salinidad con niveles similares de eficiencia del PSII en todas las plantas. La homogeneidad tanto de la eficiencia del PSII como de los síntomas de estrés por salinidad, corroboran la reproducibilidad del método experimental utilizado.

Entre los síntomas provocados por el estrés salino observados se encuentran, al iniciarse el estrés salino, un aumento de la rigidez y cambio de color en las hojas, que evolucionan hasta la caída de las mismas y una pérdida de turgencia que puede llegar a comprometer la capacidad de la planta de mantenerse erguida. La aparición de estos síntomas posiblemente interfirió con los síntomas producidos por la infección de TYLCV, provocando una intensa inhibición del crecimiento tanto en las plantas *mock* como infectadas, así como enmascarando los síntomas de la infección viral. Este “enmascaramiento” probablemente sea debido a la disminución de agua en la planta provocada por el estrés salino (Gupta & Huang, 2014), causando pérdida de rigidez del tallo, impidiendo el rizado de sus hojas e inhibiendo la fotosíntesis y el crecimiento.

De forma paralela a la caracterización fenotípica, las plantas de *N. benthamiana* y tomate bajo estrés por salinidad presentaron una menor acumulación viral que sus respectivos controles, indicando que el estrés por salinidad inhibe la acumulación de TYLCV en ambas especies. Actualmente, diversos autores han

propuesto que la respuesta de la planta a una combinación determinada de estreses abióticos y bióticos es dependiente de la relación entre hormonas antagonistas como el ABA y el SA (Alazem & Lin, 2015; Fujita *et al.*, 2006; Ku *et al.*, 2018), por lo que es posible que el estrés salino, al inducir una mayor concentración de ABA (Achuo *et al.*, 2006), inhiba las respuestas a la infección viral, generalmente asociadas con el SA (Lefevere *et al.*, 2020). También se ha observado que el ABA está relacionado con la activación de respuestas tanto a estreses abióticos como a infecciones virales (Alazem & Lin, 2017; Santiago *et al.*, 2009), por lo que su síntesis en condiciones de estrés por salinidad podría inducir una mejor respuesta de la planta a la infección por TYLCV. Una última hormona que puede ser la desencadenante de este fenómeno es el etileno. El etileno es una hormona que está relacionada con en el desarrollo de síntomas en la infección por *Cauliflower mosaic virus* (CMV), así como en la aparición de lesiones necróticas producidas por diversos virus (Alazem & Lin, 2015), siendo la principal hormona reguladora de la respuesta al estrés por salinidad (Riyazuddin *et al.*, 2020). Por ello, un período de estrés por salinidad podría modificar la respuesta de la planta a una infección viral, mediante la modulación de la respuesta del etileno. En cualquier caso, son necesarios más estudios para identificar el mecanismo que produce una disminución de la acumulación viral en *N. benthamiana* y tomate durante episodios de salinidad en estadíos tempranos de la infección. Además, nuestros resultados difieren de los obtenidos en plantas de tomate infectadas con TYLCSV (Gharsallah *et al.*, 2020), observándose que bajo condiciones de estrés salino se produce una mayor acumulación de TYLCSV. Sin embargo, la aproximación experimental de este estudio se diferencia de la utilizada en la presente tesis. Mientras en nuestros experimentos aplicamos el estrés por salinidad a los 9 dpi, manteniendo un riego suplementado con 2 M de NaCl a partir de los 12 dpi durante 9 días, en el estudio llevado a cabo con TYLCSV se aplica un tratamiento de salinidad mediante riego con solución de Hoagland suplementada con 150 mM de NaCl durante 4 semanas (Gharsallah *et al.*, 2020), por lo que sus resultados no son comparables a los obtenidos en el presente capítulo. En cualquier caso, puesto que la intensidad del estrés abiótico también condiciona la respuesta de la planta a una combinación de estreses abióticos y bióticos (Aguilar *et al.*, 2017; Kissoudis *et al.*, 2016), no podemos descartar que tratamientos de estrés por salinidad a menores concentraciones induzcan una respuesta diferente en la carga viral. De hecho, en otros virus, como ECMV, se han observado resultados similares a los que hemos obtenidos, detectándose una menor acumulación viral de ECMV en plantas de *N. benthamiana* bajo condiciones de estrés salino (Moldakimova *et al.*, 2012).

Al aplicar el estrés por salinidad en estadíos avanzados de la infección (15 dpi) se detectó tan sólo una leve disminución en la carga viral. Este resultado podría indicar que al aplicar estrés salino en una infección ya establecida (15 dpi) no se produce una disminución significativa de la acumulación viral. Se observa la

misma tendencia en todas las réplicas, pero debido al pequeño tamaño muestral de estos ensayos ($n=3$), no se puede descartar que estas diferencias fueran estadísticamente significativas al aumentar el tamaño muestral, por lo que sería necesario repetir el experimento en un mayor número de plantas. Estos resultados sugieren que el efecto del estrés por salinidad en la infección viral es dependiente del momento en el que se inicia el período de estrés abiótico, siendo similares a los resultados obtenidos al estudiar el efecto del estrés por salinidad en la infección de CPSM en guisante (Varela et al., 2019). Estos datos confirman la dificultad de predecir la respuesta de la planta a una combinación de estreses abióticos y bióticos (Aguilar et al., 2017; Atkinson & Urwin, 2012; Prasch & Sonnewald, 2013), al depender dicha respuesta de diversos factores como la intensidad, duración y momento de inicio del estrés abiótico.

Por otro lado, en *N. benthamiana* independientemente de cuando se inicie el tratamiento de estrés salino (9 o 15 dpi), los síntomas de estrés por salinidad interfieren con los síntomas de TYLCV, provocando una inhibición del crecimiento que enmascara la inhibición del crecimiento inducida por TYLCV.

Al analizar el efecto de la infección por TYLCV en los síntomas producidos por el estrés salino, se observó que las plantas infectadas con TYLCV presentaban unos síntomas de estrés salino de menor severidad respecto a las plantas *mock* sometidas a tratamiento de estrés por salinidad. A pesar de que se ha observado que diversos hongos endofíticos como *P. glomerata*, *T. harzianum* o *S. indica* inducen una mayor tolerancia al estrés por salinidad en sus hospedadores (Ahmad et al., 2015; Khan et al., 2012; Rawat et al., 2011; Waqas et al., 2012; Yasmeen & Siddiqui, 2018), aún no se ha identificado una especie viral que promueva una mayor resistencia de su hospedador al estrés salino, por lo que estos resultados eran especialmente relevantes.

Con el objetivo de corroborar si TYLCV induce una mayor resistencia al estrés por salinidad, se cuantificó la eficiencia del PSII de las plantas bajo estrés salino. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia del PSII entre las plantas *mock*-NaCl y TYLCV-NaCl. Las plantas sometidas a estrés por salinidad vieron reducida la eficiencia del PSII, independientemente de si pertenecían al grupo de plantas *mock*-NaCl o TYLCV-NaCl, respecto a las plantas control tras 13 días de tratamiento de estrés salino (28 dpi). Nuestros resultados, en conjunto, sugieren que TYLCV no induce una mayor tolerancia al estrés por salinidad en *N. benthamiana*, aunque son necesarios más análisis para poder concluir si TYLCV realmente produce una mejora en la respuesta a estrés por salinidad en *N. benthamiana*. Asimismo, en el caso de que TYLCV induzca una mayor tolerancia al estrés por salinidad, esta tolerancia se desencadenaría por mecanismos no relacionados con la eficiencia del PSII. Además, no podemos descartar que TYLCV pueda conferir una mayor tolerancia a salinidad en *N. benthamiana* bajo concentraciones de NaCl diferentes a las estudiadas en el presente capítulo.

Al analizar el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta al estrés por salinidad en tomate obtuvimos resultados similares a los observados en *N. benthamiana*. Las plantas de tomate sometidas a estrés salino en los estadíos tardíos de la infección no mostraron una disminución significativa de la acumulación viral. Sin embargo, y al igual que en *N. benthamiana*, sería necesario repetir los experimentos con un mayor número de plantas para resolver si la tendencia observada en las plantas bajo estrés salino de presentar una menor acumulación viral realmente tiene relevancia biológica. Por otra parte, los síntomas de estrés salino también interfirieron en tomate con los síntomas de la infección viral y la inhibición en el crecimiento provocada por la salinidad enmascaró la desencadenada por el virus. A diferencia de *N. benthamiana*, no se observaron diferencias en los síntomas de estrés salino entre las plantas *mock*-NaCl y TYLCV-NaCl, correlacionándose estos resultados con un descenso similar de la eficiencia del PSII tanto en plantas *mock* como infectadas bajo tratamiento de estrés por salinidad.

Estos datos, en conjunto, sugieren que TYLCV no induce una mayor tolerancia a salinidad en tomate, a diferencia de lo observado en los experimentos de estrés por sequía (capítulo 1). Como se ha comentado anteriormente, las respuestas de la planta a la combinación de estreses abióticos dependen de diversos factores, como el patógeno, el estrés abiótico y el hospedador (Aguilar *et al.*, 2017), por lo que no es extraño que TYLCV confiera resistencia a sequía en *N. benthamiana* y tomate, mientras que no produce ninguna modificación aparente de la respuesta a estrés salino en *N. benthamiana* y tomate. De hecho, debido a la diversidad de respuestas y la complejidad del estrés por salinidad, no se puede descartar que TYLCV pueda conferir resistencia a estrés salino en tomate y en *N. benthamiana* bajo un tratamiento de estrés por salinidad de diferente intensidad o/y duración. Por ejemplo, en algunos patógenos, como *Oidium neolycopersici*, se ha observado una mayor susceptibilidad al patógeno al someter plantas de tomate a un tratamiento de estrés salino de intensidad leve (50 mM) y una mayor resistencia al patógeno en un régimen de estrés salino intenso (150 mM) (Kissoudis *et al.*, 2016).

En resumen, nuestros resultados indican que el estrés por salinidad incide de forma negativa en la acumulación viral tanto en *N. benthamiana* como en tomate al aplicarse al inicio de la infección (9 dpi). Además, la respuesta a salinidad enmascara los efectos producidos por la infección por TYLCV tanto en *N. benthamiana* como en tomate. Por último, los datos obtenidos en el presente capítulo sugieren que TYLCV no confiere una mayor tolerancia al estrés por salinidad al infectar plantas de *N. benthamiana* y tomate.



Capítulo 3

Efecto del estrés térmico sobre la infección del geminivirus TYLCV

INTRODUCCIÓN

El continuado incremento en las temperaturas puede crear nuevos escenarios en cultivos agrónomicamente importantes, modificando el desarrollo e intensidad de las enfermedades virales ya conocidas y provocando la aparición de nuevas enfermedades provocadas por virus emergentes. Numerosos trabajos han determinado como las temperaturas elevadas, así como otros estreses abióticos, afectan a las infecciones en planta provocadas por diferentes virus de RNA y DNA. En estos trabajos se han centrado principalmente en determinar los cambios en la acumulación viral y en la severidad de los síntomas ante valores elevados de temperatura o de concentración de CO₂ (Anfoka *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2016; Dáder, *et al.*, 2016; del Toro *et al.*, 2019). Los resultados de estos trabajos sugieren que ambos fenómenos, asociados al cambio climático, afectarán a los aislados y cepas de virus de forma diferente en su capacidad no sólo para infectar y potencialmente causar daños en los cultivos, sino también para establecer infecciones, dispersarse y, en última instancia, mantenerse en el ambiente. Por ejemplo, se ha observado que condiciones ambientales de temperaturas relativamente elevadas atenúan la severidad de los síntomas sistémicos en numerosas infecciones de virus de RNA, estando generalmente acompañadas por una disminución de la carga viral (Aguilar *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2016; De Bokx & Piron, 1977; Del Toro *et al.*, 2015; Del Toro *et al.*, 2018; Hull, 2002; Szittyá *et al.*, 2003). Este efecto negativo del estrés por alta temperatura también se ha observado en especies de virus de RNA, como en *Turnip crinkle virus* (TCV) al infectar plantas de *Arabidopsis thaliana*, *Citrus psorosis virus* (CPsV) en naranja o *Potato virus Y* (PVY) en *Nicotiana glutinosa*, donde el aumento de temperatura provoca una disminución de la acumulación viral (Ma *et al.*, 2016; Velázquez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Sin embargo, en otras especies virales las altas temperaturas provocan un aumento de la carga viral, como ocurre con el begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en tomate, el potyvirus PVY en patata, el bromovirus *Cucumber mosaic virus* (CMV) en *N. tabacum* o CMV cepa *Fny* en *N. benthamiana* (Anfoka *et al.*, 2016; Del Toro *et al.*, 2015; Makarova *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016). Por otro lado, diferentes cepas de una misma especie viral pueden reaccionar al estrés por alta temperatura de forma diferente, especialmente considerando síntomas y/o carga viral, como muestran diferentes cepas de CMV al infectar plantas de melón (Roossinck, 1991), indicando que los efectos de la temperatura no son determinados exclusivamente por la especie viral. Sin embargo, al infectar con diferentes cepas de PVY plantas de *N. benthamiana*, todas las cepas presentan una disminución de la carga viral independientemente de la cepa (Chung *et al.*, 2016; Del Toro *et al.*, 2015). El hospedador también tiene un papel esencial en la determinación del efecto que las altas temperaturas pueden tener sobre la infección de una determinada especie viral. De esta forma, se ha demostrado que *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) presenta una mayor acumulación viral a

altas temperaturas en *N. tabacum*, una menor acumulación en *Physalis ixocarpa*, mientras que al infectar *Datura stramonium*, el estrés por alta temperatura no parece tener un efecto significativo en la carga viral de TSWV (Llamas-Llamas *et al.*, 1998). Por último, el rango de temperaturas al que se encuentra sometida la infección, también puede tener diferentes efectos sobre la infección viral en un hospedador determinado. Plantas de *Vigna unguiculata* infectadas con *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) presentan una menor severidad de síntomas y una menor carga viral a temperaturas de entre 20°C y 15°C, mientras que a 30°C no presentan cambios significativos en dichos parámetros, en comparación con plantas infectadas a 25°C (Singh *et al.*, 2018).

TYLCV es un begomovirus, presente en las regiones subtropicales y tropicales del planeta donde se cultiva tomate (Navas-Castillo *et al.*, 2011). Además de tomate, se ha descrito que TYLCV infecta otros cultivos hortícolas como el pimiento y plantas modelo como *N. benthamiana* o *A. thaliana*. Por ello, TYLCV es un excelente modelo para estudiar como el estrés térmico modula la interacción virus-planta. El efecto de la temperatura sobre la infección de TYLCV en tomate ha sido objeto de un estudio previo llevado a cabo por Anfoka y colaboradores (2016). Utilizando líneas susceptibles y resistentes a TYLCV, estos investigadores analizaron el desarrollo de los síntomas y la acumulación de virus en plantas crecidas en invernaderos comerciales en Jordania. En el estudio compararon la infección de plantas infectadas con TYLCV mediante *Bemisia tabaci*, crecidas en dos condiciones de temperatura: (1) 22–25°C/18–20°C, día/noche y (2) 40–45°C/20–25°C, día/noche. Los resultados indican que las plantas de las dos líneas (resistente y susceptible) crecidas a la temperatura más elevada, acumulaban mayor cantidad de virus.

El objetivo de este capítulo de tesis es estudiar el efecto de la temperatura en la interacción TYLCV-tomate, en condiciones controladas, utilizando la agroinfiltración como método de infección y *Solanum lycopersicum*, tomate, cv Moneymaker, como hospedador de TYLCV. Esta aproximación nos permitirá determinar, si el efecto de la temperatura sobre la acumulación de TYLCV en tomate, se debe a cambios en la interacción de la planta-virus y no al efecto de la temperatura en la interacción planta-insecto. Además, estudiaremos el impacto de la temperatura sobre la infección de TYLCV en una planta modelo de la interacción planta-patógeno, realizando ensayos similares utilizando como planta hospedadora *N. benthamiana*.

RESULTADOS

3.1 Efecto del estrés térmico en la infección de TYLCV en tomate.

3.1.1 Diseño experimental.

La figura 3.1 muestra el diseño experimental seguido para estudiar el efecto de la temperatura en la infección de TYLCV en tomate. En cada réplica, sesenta plantas de tres a cuatro semanas crecidas a 24°C en condiciones de día largo (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad), se infiltraron en las yemas axilares con un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía un clon infectivo de TYLCV o el vector binario sin virus (pBINX', *mock*). A continuación, todas las

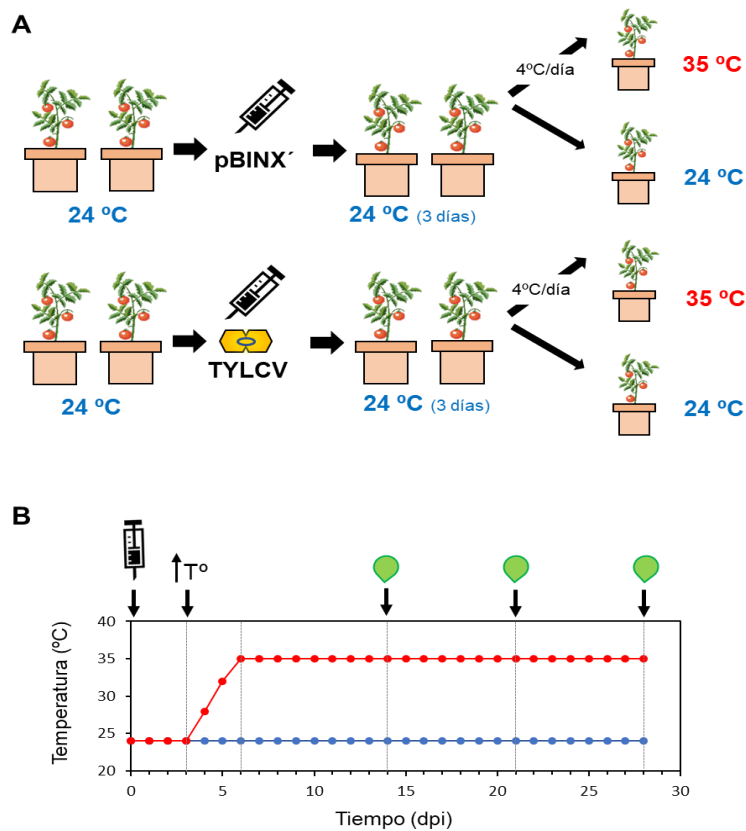


Figura 3.1. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de tomate en sustrato a 24°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 3-4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 30 individuos que fueron agroinoculados con el vector pBINX' o con el clon infectivo de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 3 días a 24°C para garantizar que la transferencia del T-DNA se realizara a la misma temperatura en todas las plantas. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 15 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de alta temperatura (35°C), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (24°C). **(B)** El grupo de plantas bajo tratamiento de alta temperatura (rojo) se sometió a un aumento diario de la temperatura de 4°C hasta alcanzar los 35°C, mientras que las plantas bajo tratamiento control se mantuvieron a 24°C (azul) durante todo el experimento. Se monitorizaron los síntomas cada dos días. Se midió la altura y el número de hojas a 0 dpi, 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi. Además, se recolectaron muestras para cuantificar la cantidad relativa de TYLCV a los 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi (indicado con una hoja). Las plantas de tomate fueron regadas alternativamente cada día con 75 ml de agua o 25 ml de fertilizante y 50 ml de agua.

plantas se mantuvieron durante tres días a 24°C para que la transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* se realizara en todas las plantas a la misma temperatura. Al tercer día post-inculación (dpi) cada grupo de plantas agroinoculadas con TYLCV o pBINX' (*mock*), se subdividieron en dos grupos: un grupo al que se le aplicó un tratamiento de estrés térmico aumentando la temperatura a razón de 4°C al día hasta alcanzar los 35°C y otro grupo que se mantuvo a 24°C (control). Para evitar diferencias debidas al posible estrés hídrico que pudieran sufrir las plantas sometidas a altas temperaturas, se realizó un riego controlado, para así mantener una distribución homogénea del agua en todas las plantas. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones durante cuatro semanas tras la infección.

Para caracterizar la infección en cada grupo de plantas se evaluó: (i) la intensidad de los síntomas cada dos días, (ii) la cantidad de virus en las hojas apicales a los 14, 21 y 28 dpi y (iii) la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice y el número de hojas nuevas desarrolladas desde los 0 dpi a los 28 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas RI, RII y RIII) utilizando aproximadamente sesenta plantas en cada una de las réplicas (quince por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

3.1.2 El aumento de temperatura favorece la acumulación de virus en plantas de tomate.

Aunque no se detectaron cambios significativos en el desarrollo de los síntomas (figura 3.2A) a diferentes temperaturas, la cantidad de virus que se acumula a los 21 y 28 dpi es significativamente mayor en las plantas crecidas a 35°C que las cultivadas a 24°C (figura 3.2B). Sin embargo, a los 14 dpi no hay diferencia significativa en la cantidad de virus a ambas temperaturas (figura 3.2B). Estos resultados tanto en los síntomas como en la acumulación de virus se repiten en las tres réplicas biológicas. Resulta llamativo que la diferencia en la acumulación de DNA del virus no se vea reflejada en la intensidad y/o en diferencias temporales en los síntomas que muestran las plantas crecidas a las dos temperaturas. Cuando se analizó en detalle el desarrollo temporal de los síntomas, se observó que estos aparecen a los 12 dpi y su intensidad se incrementa hasta aproximadamente los 18 dpi, sin que posteriormente se produzca un aumento significativo de los mismos. Sorprendentemente, aunque se observó que a 14 dpi la carga viral y la severidad de los síntomas era similar en plantas mantenidas a 24°C y 35°C, a los 21 dpi las plantas en condiciones de estrés térmico presentaron una mayor cantidad de DNA viral que las plantas en condiciones control, a pesar de mostrar una intensidad de los síntomas similar. Probablemente la carga viral observada en las plantas infectadas a 24°C es suficiente para producir la máxima severidad posible de los síntomas, y las acumulaciones virales superiores que se producen a 35°C, no conllevan a una mayor intensidad de la sintomatología.

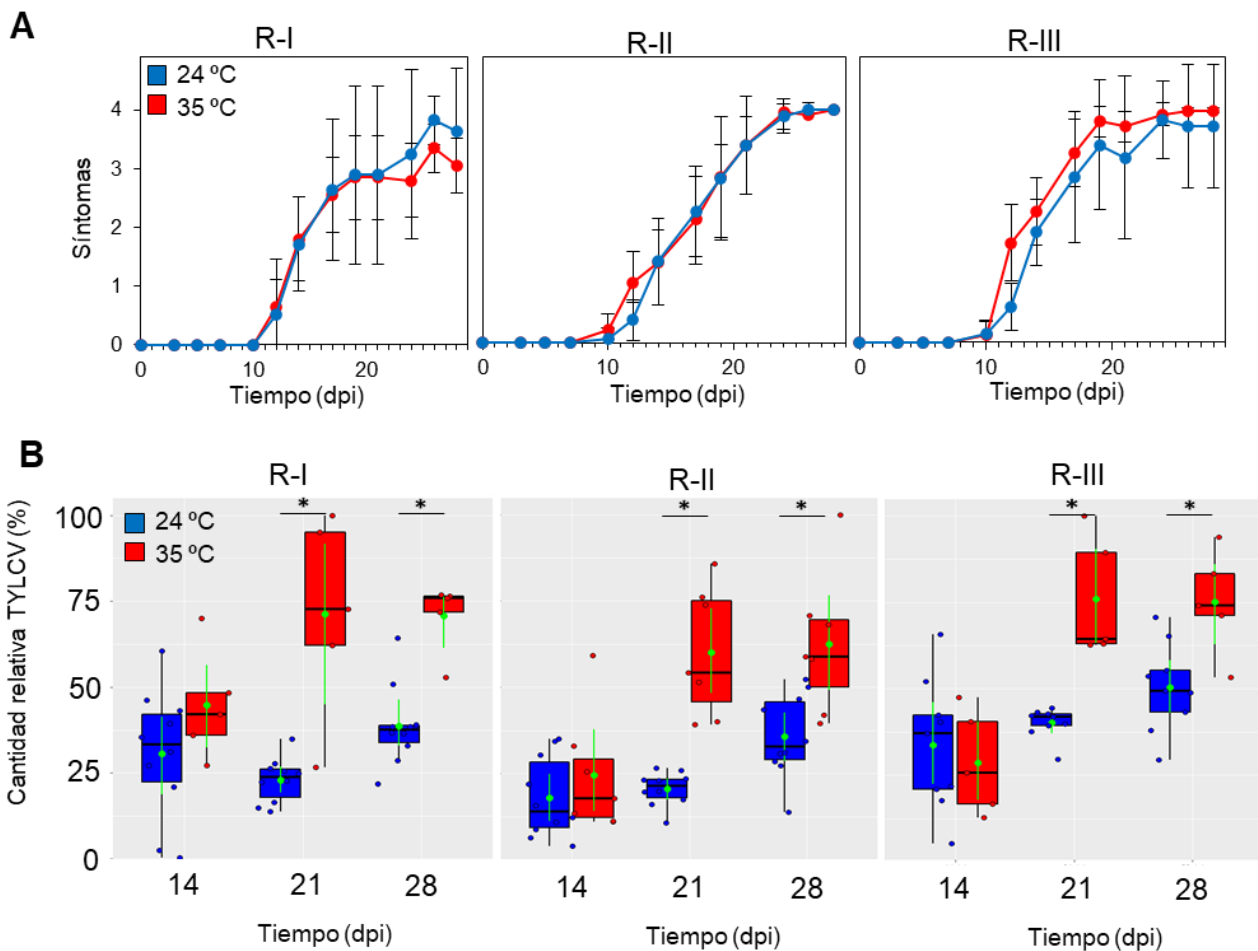


Figura 3.2. Análisis del desarrollo de la infección **(A)** Severidad de los síntomas en plantas de tomate infectadas con TYLCV y mantenidas a 21°C (control) y 35°C (alta temperatura). Los valores representan la media. Las barras de error representan la desviación estándar (SD). Se realizaron 3 réplicas, cada tratamiento presenta al menos 9 plantas. 0 indica ausencia de síntomas, 1 indica un leve amarilleamiento, 2 indica abarquillamiento moderado y superficie foliar arrugada, 3 indica amarilleamiento, abarquillamiento y arrugamiento severo de la hoja y 4 indica completo abarquillamiento y arrugamiento de la hoja, así como reducción de la superficie foliar **(B)** Acumulación relativa de TYLCV a 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi. Se utilizó el gen ITS como normalizador. Los resultados se analizaron mediante una prueba de t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,01$. La barra horizontal en el interior de cada caja representa la mediana y las barras verticales superior e inferior, el límite superior e inferior de la distribución, respectivamente. El punto verde del interior de cada caja representa la media y las barras verdes representan la SD. Los puntos rojos y azules representan el valor de cada muestra. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Se realizaron 3 réplicas, cada tratamiento presenta al menos 5 plantas, se excluyeron del análisis aquellas muestras que presentaron una desviación estándar entre réplicas técnicas superior o igual a 1.

El análisis del crecimiento de la planta de tomate y del número de hojas nuevas, muestra un comportamiento diferencial según la temperatura ensayada (figura 3.3A). Las plantas no infectadas *mock* crecidas a 35°C tienen un incremento medio de altura de 17.63 ± 3.58 cm, mientras que el aumento medio de las

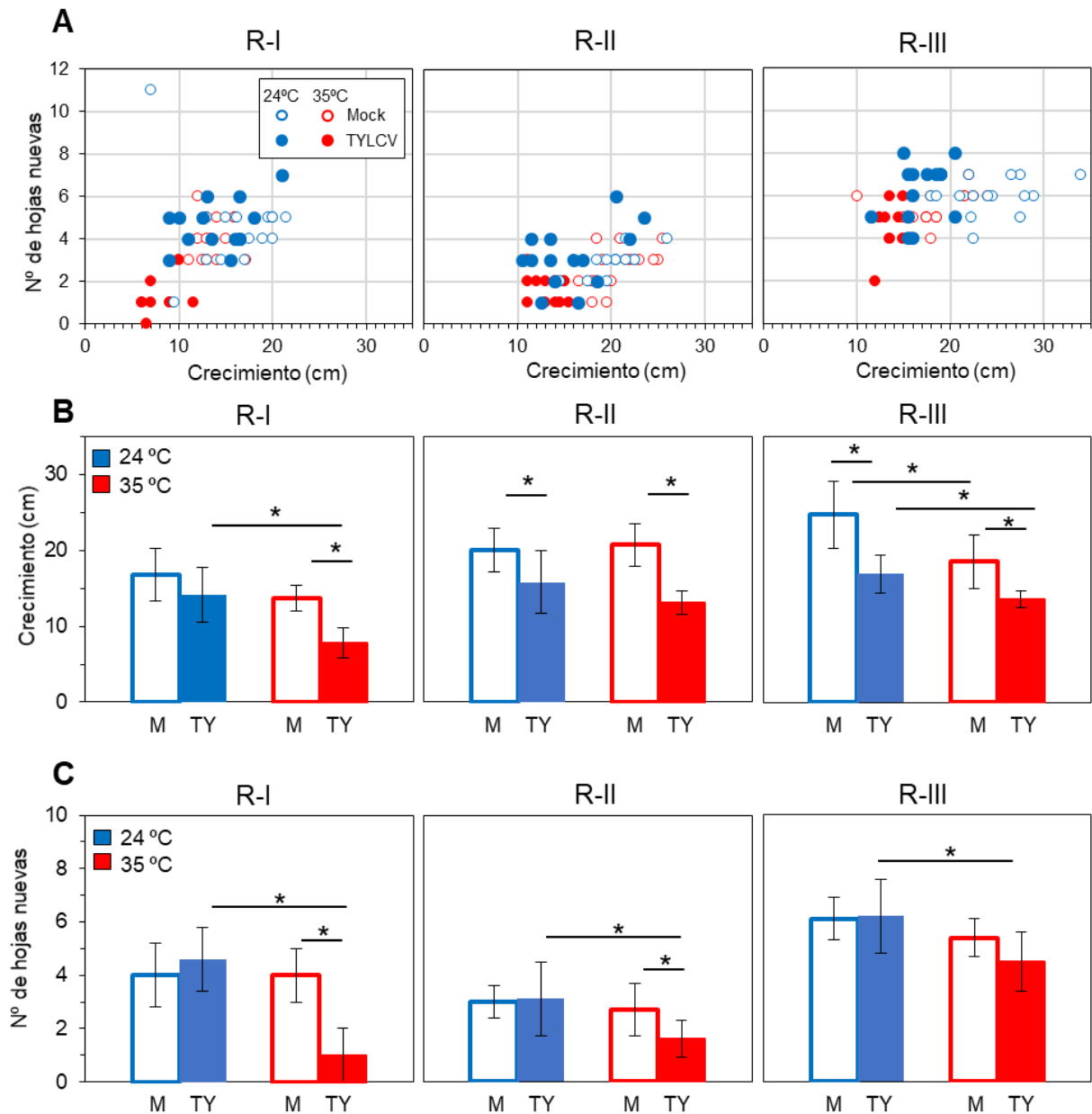


Figura 3.3. Fenotipado de la infección de TYLCV en plantas de tomate sometidas a alta temperatura (35°C) y bajo condiciones control (24°C). **(A)** Gráfico de dispersión resultante de enfrentar el crecimiento (eje X) y el número de hojas nuevas (eje Y) de cada planta. **(B)** Crecimiento y **(C)** número de hojas nuevas de las plantas de cada tratamiento. Las barras representan la media y las barras de error representan la SD. Se analizó el crecimiento y el número de hojas nuevas de cada planta calculando la diferencia de altura y número de hojas entre 0 y 28 dpi. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. Se realizaron 3 réplicas biológicas, y cada tratamiento presenta al menos 10 plantas

cultivadas a 24°C es de 20.5 ± 3.97 cm. (figura 3.3B). Cuando se analizó el número de hojas nuevas formadas a partir del punto de agroinfiltración, en plantas *mock* se observó un efecto similar al que ocurre con el crecimiento del tallo: a 35°C, hay una leve disminución en el número de hojas nuevas formadas comparado con el control a 24°C (4.07 ± 1.4 hojas a 35°C frente 4.37 ± 1.58 hojas a 24°C) (figura 3.3A y 3.3C).

Se detecta un fenómeno similar cuando se observan las plantas infectadas con TYLCV y se compara su comportamiento a distintas temperaturas. En general, las plantas infectadas y crecidas a 35°C, presentaron un crecimiento del tallo (incremento medio de 11.5 ± 3.21 cm) menor al de las plantas infectadas crecidas a 24°C (15.6 ± 1.41 cm) siendo a su vez menor que el de las plantas *mock*, crecidas a la correspondiente temperatura (figura 3.3B). De esta forma, la acumulación de virus en las plantas a los 28 dpi correlaciona con una disminución del crecimiento del tallo a 35°C. Así mientras que a 24°C las plantas infectadas muestran un crecimiento menor (15.6 ± 1.41 cm de media) que las plantas no infectadas (20.5 ± 3.97 cm), la reducción en el crecimiento es todavía mayor a 35°C (media de 11.5 ± 3.21 cm para plantas infectadas frente a 17.63 ± 3.58 cm para plantas no infectadas). Es decir, existe un efecto negativo en el tamaño de la planta derivado de la infección por TYLCV, que es aditivo al efecto de la temperatura a 35°C (figura 3.3A y 3.3B). Este efecto es estadísticamente significativo en R-I y R-III, observándose la misma tendencia en R-II. De hecho, el efecto de la infección sobre el número de hojas nuevas desarrolladas es también negativo, siendo significativa la disminución en el número de hojas desarrolladas de plantas de tomate infectadas a 35°C tanto respecto al *mock* a 35°C como respecto las plantas infectadas a 24°C en dos de las tres réplicas realizadas (figura 3.3C). Estos datos correlacionan con la presencia de una mayor cantidad de virus a 35°C (figura 3.2B) y ponen en evidencia las limitaciones que supone en algunas circunstancias la evaluación de síntomas como medida de la infección (figura 3.2A). Nuestros datos confirman los obtenidos por Anfoka y colaboradores en 2016 e indican que en tomate el aumento de temperatura, independientemente de que pueda afectar a la interacción virus-insecto, afecta a la interacción planta-virus, permitiendo una mayor acumulación de DNA viral que provoca un menor crecimiento de la planta.

3.2 Efecto de la temperatura en la infección de TYLCV en *N. benthamiana*

Para estudiar si el efecto positivo en la acumulación de virus observado en plantas de tomate a 35°C es específico de esta especie o representa un efecto general sobre la acumulación de TYLCV en distintos hospedadores, llevamos a cabo experimentos similares a los anteriormente descritos, utilizando la especie modelo en la interacción planta-patógeno, *N. benthamiana*.

3.2.1 Diseño experimental

Como la temperatura óptima de crecimiento de *N. benthamiana* es inferior a la de tomate, realizamos los experimentos para determinar el efecto de la temperatura en la infección por TYLCV a tres temperaturas, 21°C (control), 28°C

(estrés térmico moderado) y 35°C. Debido a limitaciones experimentales los ensayos se realizaron en dos experimentos independientes comparando siempre las plantas cultivadas a 28°C o a 35°C, con plantas crecidas a 21°C.

La figura 3.4 muestra el diseño experimental seguido para estudiar el efecto de la temperatura en la infección de TYLCV en *N. benthamiana*. Plántulas de tres a cuatro semanas crecidas a 21°C en condiciones de día largo (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) se infiltraron en las yemas axilares con un cultivo de *A. tumefaciens* conteniendo un clon infectivo de TYLCV o el vector binario sin virus (pBINX', *mock*). A continuación, todas las plantas se mantuvieron durante tres días a 21°C para que la transferencia del T-DNA de *A. tumefaciens* se realizara

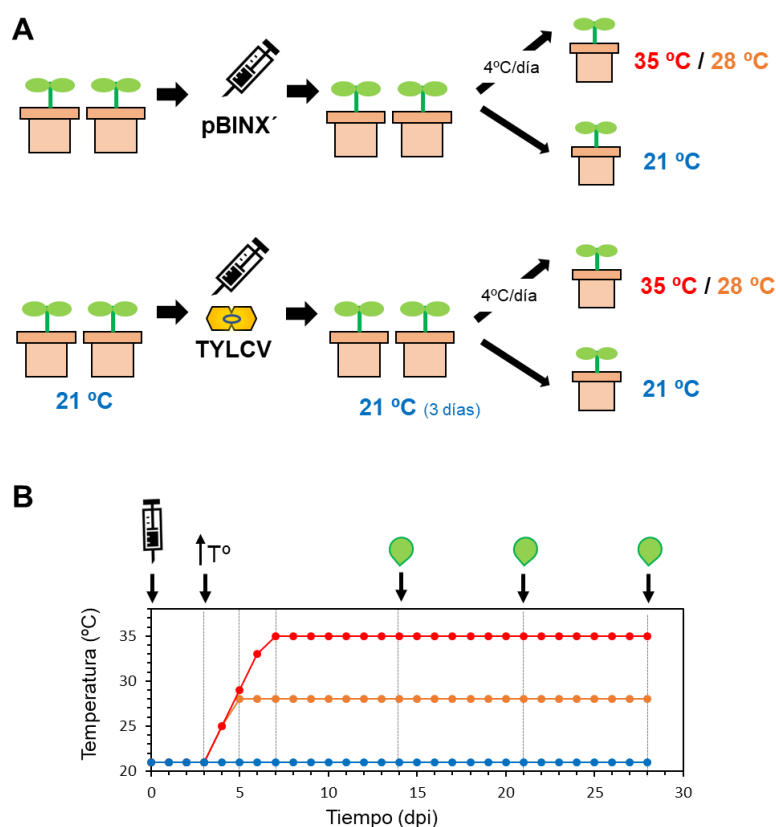


Figura 3.4. Diseño experimental. **(A)** Se establecieron semillas de *N. benthamiana* en sustrato a 21°C y 16 h de luz/8 h de oscuridad. Cuando las plantas tuvieron 4 hojas (3 semanas), se dividieron en dos grupos de 30 individuos que fueron inoculados con el vector pBINX' o con el clon infectivo de TYLCV. Las plantas se mantuvieron 3 días a 21°C para garantizar que la transferencia del T-DNA se realizara a la misma temperatura en todas las plantas. Pasado este período, cada grupo se subdividió en dos grupos de 15 plantas; uno de ellos se sometió a un tratamiento de temperatura moderada (28°C, indicado en naranja) o alta temperatura (35°C, indicado en rojo), mientras que el otro grupo se mantuvo en condiciones control (21°C). **(B)** El grupo de plantas bajo tratamiento de temperatura moderada (naranja) o alta temperatura (rojo) se sometió a un aumento diario de la temperatura de 4°C hasta alcanzar los 28°C (temperatura moderada) o 35°C (alta temperatura), mientras que las plantas bajo tratamiento control se mantuvieron a 21°C (azul) durante todo el experimento. Se monitorizaron los síntomas cada dos días. Se midió la altura y el número de hojas a 0 dpi, 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi. Además, se recolectaron muestras para cuantificar la cantidad relativa de TYLCV a los 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi (indicado con una hoja). Las plantas de *N. benthamiana* fueron regadas alternativamente cada día con 50 ml de fertilizante y 50 ml de agua.

en todas las plantas a la misma temperatura. A los 3 dpi, cada grupo de plantas agroinoculadas con TYLCV o pBINX' (*mock*), se subdividieron en dos grupos, un grupo al que se le aplicó un tratamiento de estrés térmico aumentando la temperatura a razón de 4°C al día hasta alcanzar los 28°C o 35°C y otro grupo que se mantuvo a 21°C. Para evitar diferencias debidas al posible estrés hídrico que pudieran sufrir las plantas sometidas a altas temperaturas, se realizó un riego controlado, para así mantener una distribución homogénea del agua en todas las plantas. Las plantas se mantuvieron en estas condiciones cuatro semanas tras la infección.

Para caracterizar la infección en cada grupo de plantas se evaluó: (i) la intensidad de los síntomas cada dos días, (ii) la cantidad de virus en las hojas apicales a los 14, 21 y 28 dpi y (iii) la altura de cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice y el número de hojas nuevas desarrolladas desde los 0 dpi a los 28 dpi. Para cada experimento se realizaron tres réplicas biológicas (réplicas RI, RII y RIII) utilizando aproximadamente sesenta plantas en cada una de las réplicas (quince por condición). Los resultados de cada réplica se muestran de manera independiente.

3.2.2 La alta temperatura en *N. benthamiana*, dificulta la infección por TYLCV.

El análisis de los síntomas no mostró diferencias significativas en la aparición, ni en la intensidad de los mismos entre las plantas cultivadas a 21°C y las crecidas a 28°C (figura 3.5A). Sin embargo, en las plantas cultivadas a 35°C se detectó una reducción muy significativa en la intensidad de los síntomas (figura 3.5A). Aunque los síntomas aparecieron al mismo tiempo (10 dpi) en las dos temperaturas (21°C y 35°C), los síntomas se intensificaron en las plantas crecidas a 21°C hasta alcanzar el máximo nivel a los 16 dpi, mientras que en las plantas cultivadas a 35°C la intensidad de los síntomas es inferior y, aunque también alcanzan su propio máximo en torno a los 16 dpi, no llegaron en ningún caso al nivel máximo de intensidad utilizado en la escala (ver Tabla 5 de Material y Métodos).

La cantidad de virus acumulada en las plantas infectadas muestra una correlación con la intensidad de los síntomas. Aunque los niveles de virus en las plantas cultivadas a 21°C y 28°C son similares a 28 dpi, la dinámica temporal de acumulación difiere. En general, a 21°C se detectó un aumento en la acumulación del DNA viral durante la infección, alcanzándose el máximo en el último punto analizado (28 dpi) (figura 3.5B). Por el contrario, se observó que en las plantas mantenidas a 28°C, el máximo en la acumulación de DNA del virus se produce a los 21 dpi en lugar de a los 28 dpi. A 21 dpi, las plantas crecidas a 28°C presentan significativamente una mayor carga viral que las plantas crecidas a 21°C (figura 3.5B), lo que sugiere un efecto positivo del aumento de la

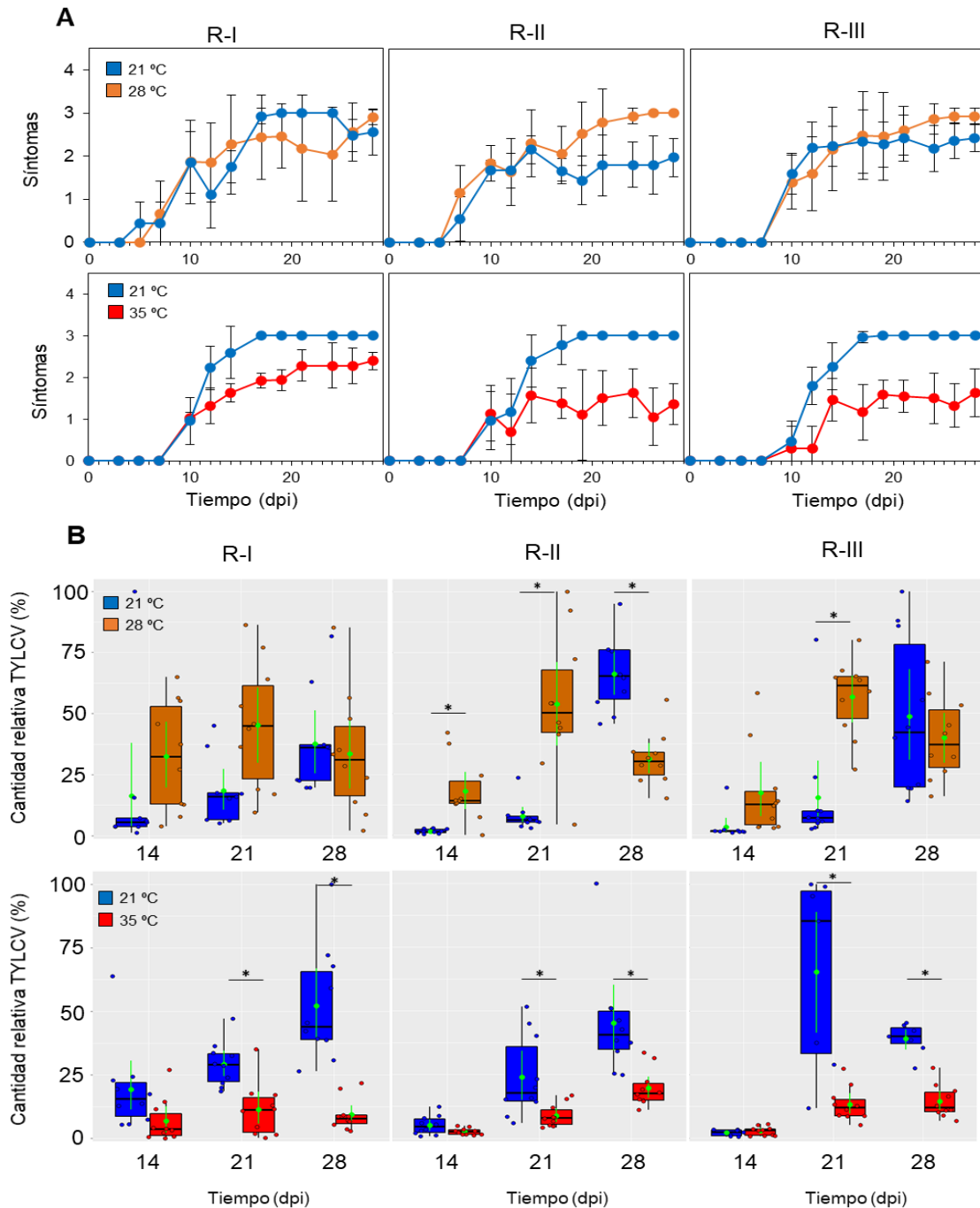


Figura 3.5. Análisis del desarrollo de la infección **(A)** Severidad de los síntomas en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TYLCV y mantenidas a 21°C (control), 28°C (temperatura moderada) y 35°C (alta temperatura). Los valores representan la media. Las barras de error representan la SD. Se realizaron 3 réplicas, cada tratamiento presenta al menos 10 plantas. 0 indica ausencia de síntomas, 1 indica leve curvatura de la hoja, 2 indica abarquillamiento y superficie foliar arrugada y 3 indica reducción del tamaño y amarilleamiento de la hoja **(B)** Acumulación relativa de TYLCV a 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi. Se utilizó el gen ITS como normalizador. Los resultados se analizaron mediante una prueba t-Student; un asterisco indica una diferencia significativa con $p = 0,01$. La barra horizontal en el interior de cada caja representa la mediana y las barras verticales superior e inferior, el límite superior e inferior de la distribución, respectivamente. El punto verde del interior de cada caja representa la media y las barras verdes representan la SD. Los puntos rojos y azules representan el valor de cada muestra. La cantidad relativa de virus para cada planta/media se representa relativizada a la planta/media que presentó el valor más elevado, a la cual se le otorgó el valor de 100%. Se realizaron 3 réplicas, cada tratamiento presenta al menos 7 plantas, se excluyeron del análisis aquellas muestras que presentaron una desviación estándar entre réplicas técnicas superior o igual a 1.

temperatura en la capacidad de propagación del virus, similar al observado en las plantas de tomate (figura 3.2B). La comparación en la cantidad de virus entre las plantas cultivadas a 21°C y 35°C correlaciona con la diferencia observada en la intensidad de los síntomas: las plantas infectadas y crecidas a 35°C tienen menos síntomas y menos cantidad de virus que las plantas infectadas y mantenidas a 21°C (figuras 3.5A y 3.5B). La cantidad de virus detectada en las plantas crecidas a 35°C, es similar a los 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi, siendo a 21 dpi y a 28 dpi significativamente menor que la acumulación viral a 21°C, al contrario de lo que ocurre en tomate (figuras 3.5B y 3.2B).

El análisis del crecimiento de la planta y del número de hojas nuevas, muestra un comportamiento diferencial en las plantas *mock* a las dos temperaturas ensayadas, 28°C y 35°C (figura 3.6A). Las plantas no infectadas crecidas a 28°C tienen un incremento medio de altura de 21.4 ± 3.51 cm, mientras que el aumento medio de las cultivadas a 21°C es de 16.9 ± 3.03 cm. Es decir, se detecta un efecto positivo sobre el tamaño en las plantas *mock* cuando estas crecen a 28°C. Por el contrario, las plantas no infectadas crecidas a 35°C, no mostraron diferencias significativas en el crecimiento del tallo con las cultivadas a 21°C (13.4 ± 3.91 cm y 14.9 ± 1.55 cm, respectivamente) (figura 3.6B).

Cuando se analizaron los resultados del número de hojas nuevas formadas a partir del punto de agroinfiltración en plantas *mock* (figura 3.6C), se observó un efecto similar al que ocurre con el crecimiento del tallo: a 28°C, hay un aumento significativo en el número de hojas nuevas formadas comparado con el control a 21°C, (21.1 ± 2.3 hojas a 28°C frente 15.3 ± 1.6 hojas a 21°C), mientras que esto no se observa al comparar las plantas crecidas a 35°C y a 21°C, al menos en dos de las tres réplicas biológicas ensayadas.

El escenario es diferente cuando se observan las plantas infectadas con TYLCV y se compara su comportamiento a distintas temperaturas. En general, las plantas infectadas y crecidas tanto a 28°C como a 35°C, presentan un crecimiento del tallo (incremento medio de 10.9 ± 2.54 cm a 28°C y 7.8 ± 2.6 cm a 35°C) similar al de las plantas infectadas crecidas a 21°C, 9.8 ± 1.72 cm (control de 28°C) y 7.6 ± 1.58 cm (control 35°C) y siempre menor que el de las plantas *mock*, crecidas a la correspondiente temperatura (figura 3.6B). De esta forma, la acumulación de virus en las plantas a los 28 dpi correlaciona con una disminución del crecimiento del tallo a todas las temperaturas. Es decir, existe un efecto negativo en el tamaño de la planta derivado de la infección por TYLCV, que enmascara el efecto positivo que muestra el mantenimiento a 28°C en el crecimiento de las plantas (figura 3.6A y 3.6B). Por el contrario, no se observó un efecto estadísticamente significativo sobre el número de hojas nuevas al comparar el número de hojas desarrolladas entre plantas infectadas y en condiciones control (21°C) y plantas infectadas y en condiciones de estrés térmico (35°C), siendo los valores muy similares entre los grupos de plantas sometidas a las diferentes condiciones en dos de las tres réplicas (R-I y R-III). Al

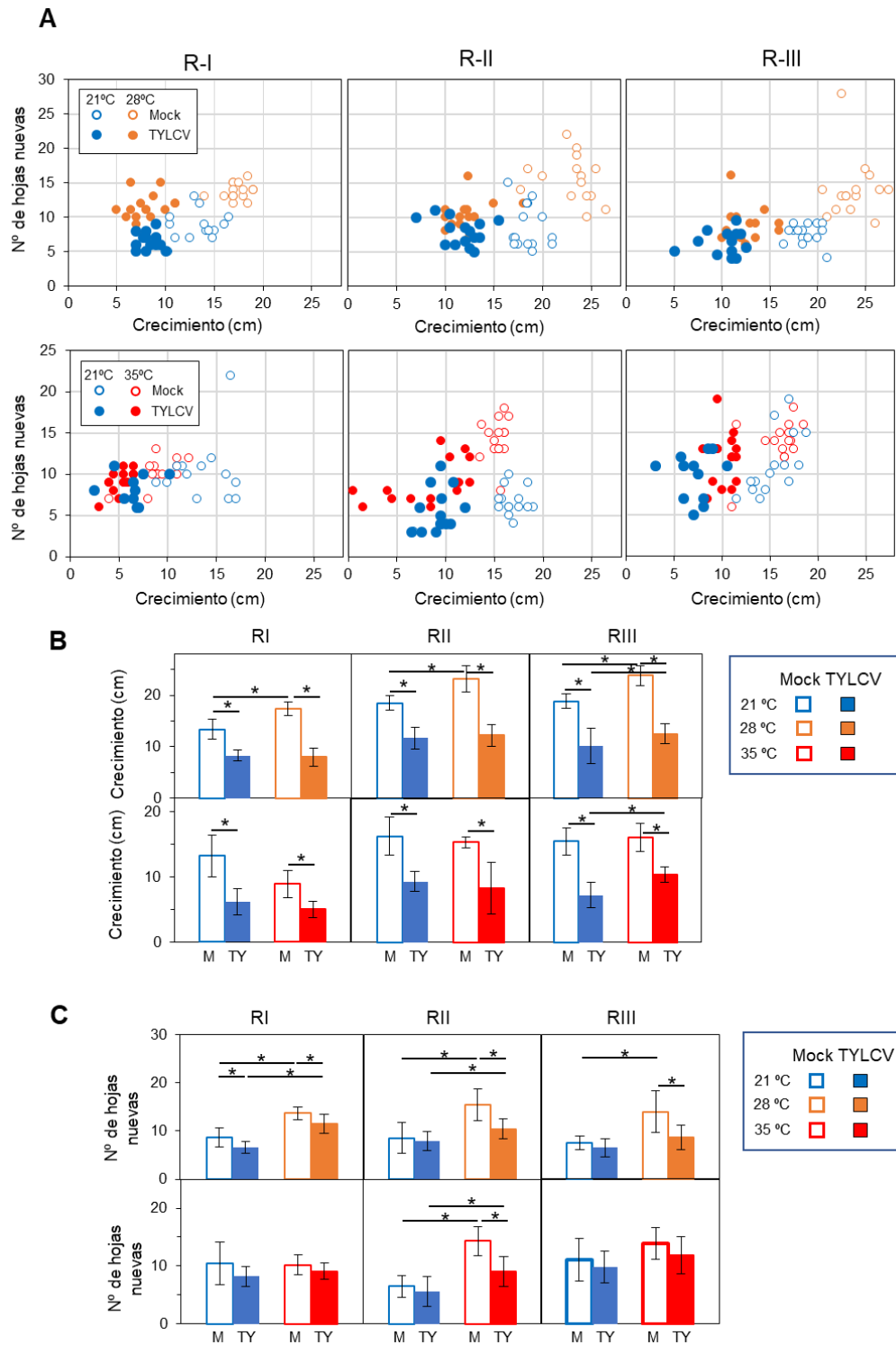


Figura 3.6. Fenotipado de la infección bajo estrés por alta temperatura (35°C), temperatura moderada (28°C) y en condiciones control (21°C) en plantas de *N. benthamiana*. **(A)** Gráfico de dispersión resultante de enfrentar el crecimiento (eje X) y el número de hojas nuevas (eje Y) de cada planta. **(B)** Crecimiento y **(C)** número de hojas nuevas de las plantas de cada tratamiento, así como su SD. Las barras representan la media y las barras de error representan la SD. Se analizó el crecimiento y el número de hojas nuevas de cada planta calculando la diferencia de altura y número de hojas entre 0 y 28 dpi. La media de cada par de tratamientos fue comparada mediante una prueba t-Student con un $\alpha=0,01$; se indica con un asterisco las diferencias estadísticamente significativas. Se realizaron 3 réplicas, cada tratamiento presenta al menos 10 plantas.

comparar el número de hojas nuevas entre las plantas en condiciones control mantenidas a 28°C, observamos que tanto las plantas *mock*, como las plantas infectadas a 28°C presentan un mayor número de hojas que sus respectivos controles a 21°C. Estas diferencias son estadísticamente significativas, en las tres réplicas al comparar *mock* 21°C con *mock* 28°C y en dos de las tres réplicas realizadas al comparar (TYLCV 21°C con TYLCV 28°C). Además, la infección por TYLCV inhibió el desarrollo de hojas nuevas tan sólo a 28°C, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en las tres réplicas.

Estos resultados sugieren que el aumento moderado (28°C) de la temperatura en *N. benthamiana* produce un efecto positivo sobre la propagación del virus, similar al observado en las plantas de tomate, pero que un aumento mayor (35°C) conlleva la inhibición del desarrollo de la infección sin que se detecte un efecto sobre el fenotipo de la planta.

DISCUSIÓN

Aunque es conocido que la temperatura afecta a las infecciones virales desde hace más de un siglo (Kassanis, 1952), los estudios sistemáticos que muestran las interacciones entre el estrés a alta temperatura y las infecciones virales son limitados (Arroyo Mateos, 2015; Chung *et al.*, 2016; Del Toro *et al.*, 2015; Llamas-Llamas, 1998; Makarova *et al.*, 2018; Nancarrow *et al.*, 2014; Velázquez *et al.*, 2010). Desde principios del siglo XX se conoce el efecto de “heat masking”, por el que las altas temperaturas enmascaran las infecciones virales, conllevando una reducción de la carga viral (Johnson, 1922). Este fenómeno ha provocado que se popularicen las técnicas de termoterapia para la reproducción vegetativa de plantas libres de virus (Grondeau *et al.*, 1994). Sin embargo, la disminución de la carga viral ante un aumento de temperatura no es común a todos los virus (Arroyo Mateos, 2015; Prash & Sonnewald, 2013; Zhang *et al.*, 2012). De hecho, la respuesta del virus a este estrés abiótico es dependiente tanto de la especie viral, como del hospedador y de la intensidad del estrés (Aguilar *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en la presente tesis muestran que la infección por el geminivirus TYLCV a alta temperatura se desarrolla de forma diferencial en dos especies de la familia de las solanáceas, *N. benthamiana* y *S. lycopersicum*. En *N. benthamiana*, TYLCV presenta una menor acumulación viral y produce síntomas más leves a altas temperaturas (35°C) que en infecciones realizadas a 21°C, mientras que plantas de tomate infectadas con TYLCV a 35°C presentan la misma severidad de síntomas y una mayor acumulación viral que las infectadas y mantenidas a la temperatura control (24°C).

Uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas frente a los virus, tanto de RNA como de DNA, es el silenciamiento génico. Tal es la importancia de este mecanismo de defensa, que los virus codifican proteínas que actúan

como supresores del silenciamiento génico tanto a nivel post-transcripcional (PTGS) como transcripcional (TGS) (Csorba *et al.*, 2015; García-Ruiz, 2019; Wang *et al.*, 2019; Yousif & Koch, 2019). Durante la infección de *N. benthamiana* se observó que las plantas infectadas a 35°C presentaban un silenciamiento génico que se extendía con mayor rapidez que las plantas infectadas a 21°C (datos no mostrados), sugiriendo que la menor acumulación viral podría ser causada por una mayor eficiencia del silenciamiento génico. Los pequeños RNAs interferentes (siRNAs, *small interfering RNAs*), son moléculas de RNA de no más de 25 nt que están relacionadas con la defensa de la planta ante agentes virales. Varios trabajos han descrito un aumento de los siRNAs frente al virus en plantas infectadas sometidas a altas temperaturas, lo cual redundaría en un efecto negativo sobre la acumulación viral y la infección. Por ejemplo, plantas de *A. thaliana* infectadas a altas temperaturas con *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV) muestran una disminución de la severidad de los síntomas virales mientras que aumenta la acumulación de los siRNA (Szittyá *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha observado un aumento de la actividad de DLC2, enzima implicada en el procesamiento de RNA de doble cadena durante el silenciamiento génico, en plantas de *A. thaliana* infectadas con *Turnip crinkle virus* (TCV) a 26°C (Zhang *et al.*, 2012). Por ello, una hipótesis plausible que explicaría la menor acumulación viral observada en las infecciones de *N. benthamiana* a 35°C es que este fenómeno sea debido a un aumento de la eficiencia de los mecanismos de silenciamiento génico.

El hecho de que en tomate la infección por TYLCV a alta temperatura presente una mayor acumulación viral, al contrario de lo que ocurre en *N. benthamiana*, no es un resultado contradictorio, ya que el efecto de la temperatura sobre el silenciamiento génico es diferente según la especie vegetal. Por ejemplo, en *N. benthamiana* se ha observado como las altas temperaturas incrementan la actividad de silenciamiento génico (Chellappan *et al.*, 2005; Szittyá *et al.*, 2003; Velázquez *et al.*, 2010), mientras que en algodón y tomate se ha observado como las bajas temperaturas inducen una mayor intensidad de dicho fenómeno (Cai *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2006; Tuttle *et al.*, 2008). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con estudios previos realizados en invernadero con las líneas 967 y GF967 de tomate, donde se muestra que las altas temperaturas favorecen una mayor acumulación viral en plantas de tomate infectadas con TYLCV (Anfoka *et al.*, 2016).

Además de en la acumulación del DNA viral, también se observan diferencias entre estas dos solanáceas con respecto a la sintomatología de la infección por TYLCV a alta temperatura. Mientras que en *N. benthamiana* la severidad de los síntomas de la infección de TYLCV se ven reducidos a alta temperatura, en tomate no se observa un aumento de la severidad de los síntomas o en su velocidad de aparición a 35°C, a pesar de que se detecta una mayor acumulación

viral. Por lo tanto, en *N. benthamiana* parece existir una relación directamente proporcional entre la acumulación viral y la severidad de los síntomas, fenómeno que no se observa en tomate. El hecho de que, a los 14 dpi, cuando se está produciendo un aumento significativo en la intensidad de los síntomas, la cantidad de virus acumulada sea similar en las plantas cultivadas a las dos temperaturas, podría explicar la ausencia de diferencias significativas en los síntomas entre las plantas de tomate a 24°C y a 35°C. La mayor acumulación viral detectada a los 21 dpi en las plantas de tomate crecidas a alta temperatura (35°C) no se vería reflejada en una mayor intensidad de los síntomas porque estos han alcanzado previamente su máximo valor (ver Tabla 6 Material y Métodos). Alternativamente, no se puede descartar que en tomate la ausencia de correlación directa entre la acumulación de virus y el desarrollo de los síntomas se deba, al menos parcialmente, a un efecto directo de la temperatura en el desarrollo de los mismos, estableciendo una correlación diferente a cada temperatura entre la cantidad de virus y la intensidad de los síntomas.

Por último, cabe destacar los resultados obtenidos para la interacción TYLCV-*N. benthamiana* a 28°C. El hecho de que las plantas *mock* bajo el régimen de temperatura de 28°C crezcan más y posean un mayor número de hojas que las plantas crecidas a la temperatura control, 21°C, indica que esta especie vegetal se desarrolla mejor a esta temperatura media. Aunque la cuantificación de la cantidad viral es poco homogénea en las tres réplicas biológicas realizadas a 21 y 28°C, la tendencia indica que habría mayor acumulación viral en las plantas infectadas crecidas a dicha temperatura que a 21°C. Esta temperatura media, en principio favorable para el crecimiento y desarrollo, y por lo tanto para la división celular de *N. benthamiana*, parece serlo también para la replicación y/o movimiento viral, lo que conlleva a una mayor acumulación de TYLCV. Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos en otros patosistemas, en los que se observa que existe un rango de temperatura en el que el virus mantiene altas tasas de acumulación viral, mientras que infecciones en temperaturas fuera de rango, conllevan drásticas reducciones de la carga viral. Por ejemplo, en *Physalis floridana* se ha observado que el rango de temperatura óptima para el virus *Potato leafroll virus* (PLRV) se encuentra entre los 15°C y los 25°C, presentando infecciones a temperaturas superiores e inferiores una disminución de la carga viral. Mientras que en plantas de *Vigna unguiculata* (guisante) el virus *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) presenta una mayor acumulación viral a temperaturas de 30°C y 25°C, presentando una menor acumulación viral a temperaturas menores (Chung *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2018). Además, no podemos descartar que a 28°C la inducción del silenciamiento génico en *N. benthamiana* no llegue a los mismos niveles que a altas temperaturas (35°C) (Chellappan *et al.*, 2005; Szittyá *et al.*, 2003), favoreciéndose así la acumulación de TYLCV a 28°C frente a 35°C en *N. benthamiana*.

Aún quedan cuestiones sin resolver. Por ejemplo, aunque los datos sugieren que el mecanismo tras la disminución en la carga viral a alta temperatura en *N. benthamiana* es un incremento en la actividad de silenciamiento génico, son necesarios experimentos que lo confirmen. Una futura línea de investigación podría centrarse en analizar la acumulación de DNA viral a alta temperatura en mutantes de *N. benthamiana* para genes implicados en el silenciamiento génico. Este experimento se debería repetir en mutantes de tomate para el silenciamiento génico. También sería interesante comparar la cantidad de siRNAs producidos frente a TYLCV en plantas de *N. benthamiana* y tomate crecidas a temperatura control y a 35°C con el objetivo de comprobar si existe una mayor inducción del silenciamiento génico a alta temperatura.



Material y Métodos

1. Microorganismos y medios de cultivo

La manipulación de los microorganismos utilizados en esta tesis tales como *Escherichia coli* o *Agrobacterium tumefaciens* ha sido realizada siguiendo la metodología general (Sambrook & Russell, 2001).

1.1 *Escherichia coli*

Los cultivos de *E. coli* cepa DH5 α y TOP10 han sido utilizados indistintamente para la amplificación de plásmidos y su mantenimiento.

1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Se ha utilizado la cepa de *A. tumefaciens* GV3101:pMP90 para las infecciones por geminivirus en tomate (*Solanum lycopersicum*) y *Nicotiana benthamiana*. Los cultivos se mantuvieron a -80 °C, inoculándose en una placa de medio LB sólido con los antibióticos de selección adecuados y manteniéndose a una temperatura de 28 °C durante 48 horas. Tras el período de incubación, se inoculó la biomasa cultivada en placa en un medio LB líquido con los correspondientes antibióticos, manteniéndose 12 horas en agitación a 28°C.

1.3 TYLCV

El clon de TYLCV usado en la presente tesis es TYLCV-Israel (Número de acceso en Genbank: AJ489258) (2781 mer). Se utilizaron clones infectivos insertados en plásmidos para su expresión en planta mediante el sistema de transformación de *A. tumefaciens*.

La manipulación de ácidos nucleicos ha seguido la metodología general (Sambrook & Russell, 2001). Los plásmidos utilizados quedan indicados en la Tabla 1.

Tabla 1. Plásmidos utilizados en la presente tesis.

Nº Colección	Nombre del plásmido	Vector	Fragmento clonado	Uso	Cepa	Resistencia
1489	pGWB501-TYLCV	pGWB501	TYLCV (1.22 mer)	Infección	GV3101::pMP90	Rif, Sp, Gm
3037	pGWB501	pGWB501	-	Infección	GV3101::pMP90	Rif, Sp, Gm
2374	pBINX'	pBINX'	-	Infección	LBA4404	Rif, Kan
1778	pBIN-TYLCV	pBIN	TYLCV (2 mer)	Infección	LBA4404	Rif, Kan

1.4 Medios de cultivo

Para el cultivo de *E. coli* se usó el medio 2YT (3,5% de triptona, 0,5% de NaCl y 2% de extracto de levadura a pH=7; esterilizado mediante autoclave), los cultivos se mantuvieron 12-20 horas a 37°C en agitación (170-180 revoluciones por minuto (rpm)) con los antibióticos correspondientes.

Para el cultivo de *A. tumefaciens* se utilizó el medio de Luria y Bertani (LB) (10% de bactotripton, 10% de NaCl y 5% de extracto de levadura a pH=7; esterilizado mediante autoclave) (*Bertani*, 1951), los cultivos se mantuvieron durante 12-20 horas en agitación (170-180 rpm) a 28 °C con los antibióticos correspondientes.

La concentración final de los antibióticos en el medio utilizados en la presente tesis viene indicada en la Tabla 2. Se usaron las mismas concentraciones para *E. coli* y *A. tumefaciens*.

	Concentración (µg/ml)
Tetraciclina (Tet)	10
Gentamicina (Gm)	10
Rifampicina (Rif)	50
Espectinomicina (Sp)	50
Kanamicina (Kan)	50

Tabla 2. Concentración de los diferentes antibióticos usados en el cultivo bacteriano.

2. Material vegetal y condiciones de cultivo

Los experimentos realizados en *N. benthamiana* se llevaron a cabo en plantas de 4 semanas de edad crecidas a 21-24°C y en condiciones lumínicas de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). El sustrato en el que las plantas crecían presentaba una proporción 3:1 de sustrato comercial:vermiculita, excepto en los experimentos de estrés por sequía y salinidad donde se utilizó la proporción a 1:2.

Los experimentos realizados en tomate (*S. lycopersicum* cv. Moneymaker) se llevaron a cabo en plantas de entre 3 y 4 semanas de edad crecidas a 24°C en condiciones lumínicas de día largo. El sustrato en el que las plantas de tomate crecían presentaba sustrato comercial y vermiculita en proporción 3:1, excepto en los experimentos de estrés por sequía y salinidad donde se utilizó la proporción a 1:2.

Los experimentos realizados con *A. thaliana* fueron realizados en plantas con 3 semanas de edad crecidas a 21°C en condiciones de día corto (8 horas de luz y 16 horas de oscuridad). El sustrato en el que las plantas crecían presentaba una proporción 5:3 de sustrato comercial y vermiculita.

Para su cultivo y crecimiento, las semillas de *A. thaliana* fueron esterilizadas en una solución preparada a tal efecto (70% etanol y 0,1% de Tween20) manteniéndose 15 minutos en agitación. Tras la incubación se eliminó el sobrenadante y se limpiaron las semillas con alcohol puro. Finalmente se secaron en papel de filtro y se traspararon a placas de medio Murashige and Skoog (MS), donde fueron estratificadas durante dos días en oscuridad a 4°C.

El cultivo y germinación in vitro del material vegetal se ha realizado en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) (MS, Sigma®) suplementado con sacarosa (30 g/L).

2.1 Plantas transgénicas utilizadas en este trabajo

Para los ensayos de sequía se utilizaron las siguientes líneas transgénicas de *A. thaliana* (Tabla 3).

Tabla 3. Plantas transgénicas usadas en la presente tesis.

Nombre línea transgénica	Transgén	Uso	Resistencia	Especie	Generada por
35S:GFP	35S:GFP	Ensayo de sequía.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Wang <i>et al.</i> 2019.
35S:C2 (L8 & L16)	35S:C2	Ensayo de sequía.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Sin publicar. Subclonados a partir de los clones de entrada descritos en Wang <i>et al.</i> , 2017.
35S:C3 (L8 & L17)	35S:C3	Ensayo de sequía.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Sin publicar. Subclonados a partir de los clones de entrada descritos en Wang <i>et al.</i> , 2017.
35S:C4 (L5 & L7)	35S:C4	Ensayo de sequía. Ensayo de germinación en ABA.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Rosas-Díaz <i>et al.</i> , 2018.
35S:CP (L3 & L10)	35S:CP	Ensayo de sequía.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Sin publicar. Subclonados a partir de los clones de entrada descritos en Wang <i>et al.</i> , 2017.
35S:V2 (L4 & L5)	35S:V2	Ensayo de sequía.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Sin publicar. Subclonados a partir de los clones de entrada descritos en Wang <i>et al.</i> , 2017.
35S:C4 _{G2A} (L1 & L7)	35S:C4 _{G2A}	Ensayo de sequía. Ensayo de germinación en ABA.	Hygromicina	<i>A. thaliana</i>	Rosas-Díaz <i>et al.</i> , 2018.
SCR:YFP	SCR:YFP	Ensayo de sequía.	BASTA	<i>A. thaliana</i>	Donada amablemente por Lucia Strader. Michniewicz <i>et al.</i> , 2015.
SCR:C4 (L2 & L18)	SCR:C4	Ensayo de sequía.	BASTA	<i>A. thaliana</i>	Fan <i>et al.</i> , 2019.

Para estudiar qué proteína de TYLCV provoca la tolerancia a sequía se utilizaron las siguientes líneas: 35S:*GFP*, 35S:*C2* L8, 35S:*C2* L16, 35S:*C3* L8, 35S:*C3* L17, 35S:*C4* L5, 35S:*C4* L7, 35S:*CP* L3, 35S:*CP* L10, 35S:*V2* L4, 35S:*V2* L5. No se usaron plantas que expresaran la proteína Rep debido a la toxicidad de esta proteína en planta.

Para estudiar si la tolerancia a sequía desencadenada por expresar C4 dependía del compartimento celular en el que se encuentra, se usaron las líneas 35S:*C4*_{G2A} L1, 35S:*C4*_{G2A} L7, que expresan *C4*_{G2A}, una proteína C4 mutante en el sitio de meristilación y que tan sólo se acumula en el cloroplasto. Para estudiar si la proteína C4 provocaba la tolerancia a sequía debido a una reestructuración de la arquitectura de la raíz, se utilizaron las líneas *SCR*:*C4* L2 y *SCR*:*C4* L18 que expresan C4 sólo en el endodermo, y *SCR*:*YFP* como control.

3. Oligonucleótidos

Para la realización de la presente tesis se han utilizado los siguientes oligonucleótidos indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la presente tesis.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Gen diana	Aplicación	Referencia
25srRNA (ITS) Fw	ATAACCGCATC AGGTCTCCA	25srRNA de <i>N. benthamiana</i> /tomate.	qPCR	Mason <i>et al</i> , 2008.
25srRNA (ITS) Rv	CCGAAGTTACG GATCCATTT	25srRNA de <i>N. benthamiana</i> /tomate.	qPCR	Mason <i>et al</i> , 2008.
Up-Czos-1614	GCTCGTAGAGG GTGACGAAG	<i>CP</i> TYLCV-IL.	qPCR	Pakkianathan <i>et al</i> , 2015.
Low-Czos-1724	TCTGCAATCCA GGACCTACC	<i>CP</i> TYLCV-IL.	qPCR	Pakkianathan <i>et al</i> , 2015.
P5CS1 At Fw	TTGAAGGTCTTT ACACAGGCCCT	<i>P5CS1</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Presente tesis.
P5CS1 At Rw	TCGGAGCCCAT AAACGAGCATC T	<i>P5CS1</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Presente tesis.
NCED3 Fw	CACGATTTTCGC GATTACAGAGA	<i>NCED3</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Takahashi <i>et al.</i> , 2018.
NCED3 Rw	CCGGCAGCTTG AAAACGA	<i>NCED3</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Takahashi <i>et al.</i> , 2018.
RD29A Fw	GCCGACGGGAT TTGACG	<i>RD29A</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Fujii <i>et al.</i> , 2007.
RD29A Rw	GCCGGAAATTT ATCCTCTTCTGA	<i>RD29A</i> de <i>A. thaliana</i> . (cDNA)	qPCR	Fujii <i>et al.</i> , 2007.
ACT2Fw	CTAAGCTCTCA AGATCAAAGGC TTA	Actina de <i>A. thaliana</i>	qPCR	McKinney and Meagher, 1998
ACT2 Rw	ACTAAAACGCA AAACGAAAGCG GTT	Actina de <i>A. thaliana</i>	qPCR	McKinney and Meagher, 1998

4 Biología Molecular

4.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Se centrifugó 1,5 ml de cultivo saturado a 6000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadieron 4 μ l de RNAasa (10 mg/ μ l) y 100 μ l de solución I (50 mM de glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH=8), 10 mM de EDTA). Se resuspendieron las células y se añadieron 100 μ l de solución II (0,2 M de NaOH y 1% de SDS). Se mezcló por inversión y se añadieron 120 μ l de solución III (5M acetato de potasio, 11,5% de ácido acético glacial) y se volvió a mezclar por inversión. A continuación, se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 7 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo donde se añadieron 200 μ l de isopropanol, se mezcló y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación se centrifugó a 13000 rpm durante 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se limpió el precipitado de DNA con 1 ml de etanol al 70%. Tras mezclarlo, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Una vez seco se añadieron 20-50 μ l de agua Milli-Q.

Para extraer DNA plasmídico de *A. tumefaciens*, el protocolo fue similar, difiriendo del protocolo utilizado para *E. coli* en la cantidad de cultivo utilizada, siendo 3 ml de cultivo de *A. tumefaciens* el material de partida.

4.2 Transformación de *A. tumefaciens* mediante electroporación

Se partió de 50 ml de un cultivo de *A. tumefaciens* saturado, que fue centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos. Durante el período de centrifugación se preparó una solución de sacarosa, disolviéndose 5 g de sacarosa en 50 ml de agua MilliQ, que fue filtrada y se mantuvo a 4°C. Tras la centrifugación, el precipitado se lavó con 30 ml de la solución de sacarosa filtrada y se volvió a centrifugar a 4000 rpm durante 7 minutos. Se repitió el lavado con 30 ml de solución con sacarosa y la centrifugación a 4000 rpm durante 7 minutos. Una vez el cultivo ha pasado por los sucesivos lavados, se puede mantener en hielo para su transformación o resuspender en una solución a 30% de glicerol para su conservación a -80°C.

Para transformar el cultivo, se añadió 1 μ l de DNA a 100 μ l de cultivo de células electrocompetentes, se transfirió el cultivo a una cubeta de electroporación y la introdujimos en la rejilla donde realizamos el choque eléctrico con los siguientes valores:

Voltaje: 2,5 Kv

Capacitancia: 25 μ F

Resistencia: 400 Ω

Finalmente añadimos 1 ml de LB y traspasamos el cultivo a tubos de 1,5 ml, manteniéndolos en agitación 2 horas a 28°C. Tras la incubación se inocularon en placas con los antibióticos correspondientes 10 µl, 100 µl y un concentrado del cultivo. Se mantuvo en incubación durante 48 horas a 28°C y, posteriormente, se identificaron las colonias positivas mediante PCR de diagnóstico.

4.3 Extracción de DNA genómico de planta

Este protocolo se utilizó para la extracción de DNA genómico de *N. benthamiana*, tomate y *A. thaliana*. Se maceró y homogeneizó el material de partida, una cantidad total de 50-100 mg de tejido congelado a -80°C, en 500 µl de tampón de extracción (2% Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), 1.5 M de NaCl, 100 mM Tris pH 8, 100 mM EDTA pH 8). Después de homogeneizarlo se incubó a 65°C durante 15 minutos. Tras la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 300 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó la solución. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase superior que fue transferida a un nuevo tubo donde se añadieron 300 µl de isopropanol. Tras volver a homogeneizarlo se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. En este paso se precipitó el DNA dando lugar a un precipitado translúcido. Se descartó el sobrenadante y se limpió el precipitado de sales, lavándolo en 500 µl de etanol 70% frío. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar 10 minutos. Finalmente se añadió agua Milli-Q. Para eliminar el RNA se añadieron 2 µl de RNAasa (10 mg/µl) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Para la extracción de material genómico de los ensayos de sequía y de salinidad se añadió 300 µl de cloroformo en lugar de cloroformo alcohol isoamílico (24:1).

4.4 Cuantificación relativa del DNA viral mediante qPCR

La acumulación viral se cuantificó mediante qPCR. Para la cuantificación viral de las muestras procedentes del ensayo de estrés por alta temperatura se utilizó el SsoFastEvaGreenSupermix (Bio-rad, #1725200) mientras que para las muestras procedentes del ensayo de estrés por sequía y por salinidad se utilizó el Hieff™SYBR® Green Master Mix (YEASEN, #11201ES03).

La reacción de qPCR utilizada para cuantificar la acumulación viral en los experimentos de alta temperatura presentaba un volumen final de 10 µl, estando compuesta por: 5 µl de SsoFastEvaGreenSupermix (Bio-rad), 3 µl de agua destilada, 1 µl de oligonucleótidos (10 pmoles) y 1 µl de DNA con una concentración de 10 ng/µl. El programa de PCR utilizado es el siguiente: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C.

La reacción de qPCR utilizada para cuantificar la acumulación viral en los experimentos de sequía y salinidad presentaba un volumen final de 50 µl, estando compuesta por: “Hieff™SYBR® Green MasterMix” (2x), 1 µl de

oligonucleótidos (10 pmoles) (para identificar los oligonucleótidos utilizados, ver sección 3) y 10 ng de DNA procedente de la muestra. El programa de PCR utilizado es el siguiente: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C y 1 ciclo final de 15 segundos a 95°C, 60 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C.

4.5 Extracción de RNA de plantas de *A. thaliana*

El RNA fue extraído de 100 mg de tejido proveniente de hojas de *A. thaliana*, utilizándose el kit E.Z.N.A.[®]Plant RNA (Kit Omega BIO-TEK # R6827). Se añadió al tejido triturado 500 µl de tampón “RB”, con una concentración de 2-mercaptoetanol de 20 µl/ml. A continuación, se pasó la solución a columnas previamente introducidas en tubos de 2 ml. Se centrifugó durante 5 minutos a 14000g a temperatura ambiente. Una vez limpio, el lisado se transfirió a tubos de 1,5 ml, donde se añadió 1 volumen de etanol al 70%. Se sometió la solución a vórtex y se transfirió a unas columnas de unión al RNA (HiBind[®] RNA, BIO-TEK) insertadas en tubos de 2 ml. Se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se limpió la columna con 500 µl de tampón de lavado I y se centrifugó a 10000 g durante 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se insertó la columna en un tubo de 1,5 ml, donde se volvió a limpiar con 700 µl de tampón de lavado II y se sometió a la muestra a una centrifugación a 10000 g durante 30 segundos. Se repitió el último lavado con 500 µl de tampón de lavado II y se realizó una última centrifugación a 10000 g durante 30 segundos. Una vez descartado el sobrenadante se volvió a centrifugar la muestra a 10000 g durante 2 minutos para eliminar cualquier traza de etanol. Finalmente, el RNA se resuspendió en 30 µl de agua destilada libre de RNAasas, inoculándose el agua en la membrana y centrifugando a 14000 g durante 1 minuto. Una vez resuspendido, el RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Labtech, Ringmer, East Sussex, UK), y se observó su calidad en gel, cargando 1 µl de RNA en un gel de agarosa al 1%.

4.6 RT-qPCR de plantas de *A. thaliana*

Se partió de 1000 ng de RNA proveniente de muestras de *A. thaliana* para digerir con DNAasa I y retrotranscribirse en cDNA usando el kit iScript[™] cDNA Synthesis (Bio-Rad #1708890). Para realizar el tratamiento con DNAasa se partió de 14 µl de RNA con una cantidad de RNA de 1000 ng, 1,5 µl del “iScript tDNAase buffer” y 0,5 µl de “iScript DNAase”, presentando la reacción un volumen final de 16 µl. Para confirmar la digestión de los posibles restos de DNA tras el tratamiento de DNAasa I, se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos para Actina.

Para la reacción de retrotranscripción, el volumen final de la reacción era de 20 µl, constandingo de: 4 µl de “5x iScript Reaction Mix”, 1 µl de la enzima “iScript

Reverse Transcriptase” y 15 µl de RNA molde. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se sometió a las muestras al siguiente protocolo de PCR: 5 minutos a 25 °C, 20 minutos a 46 °C, 1 minuto a 95 °C y una temperatura final de conservación a 4 °C.

Las muestras de cDNA fueron analizadas mediante qPCR con el Hieff™ SYBR® Green MasterMix (YEASEN, #11201ES03). Cada reacción presentaba el tampón Hieff™ SYBR® Green MasterMix a 1x, los oligonucleótidos (para identificar los oligonucleótidos utilizados, ver sección 3) a una concentración de 0,2 µM y 1 µl de la muestra de cDNA en un volumen final de 50 µl. Se utilizó el siguiente programa de qPCR para cuantificar la acumulación de transcritos de los genes de interés: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y un ciclo final de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 15 segundos a 95°C. Se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 4 para los distintos genes cuya expresión ha sido cuantificada.

5 Ensayos de infección con TYLCV

5.1 Ensayos de infección en *N. benthamiana*

Para los ensayos de infección en *N. benthamiana* con alta temperatura se utilizaron, el clon infectivo pBINX'-TYLCV y el plásmido pBINX' (*mock*), mientras que, para los experimentos de salinidad y sequía, se utilizaron el clon infectivo pGWB501-TYLCV y el plásmido pGWB501 (indicado en la Tabla 3). Se inocularon los clones en placas de LB sólido, suplementadas con los antibióticos correspondientes. Se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente se recogió biomasa y se inoculó en 5 ml de medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, manteniéndose 12 horas en agitación a 28°C. A continuación se inoculó 1 ml del precultivo en 50 ml de medio LB líquido suplementado con los mismos antibióticos, manteniéndose en agitación a 28°C durante 12 horas. Finalmente, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 g., se eliminó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en un volumen de medio LB sin antibióticos. Los cultivos se resuspendieron para obtener una solución de $DO_{595} = 1$.

Las plantas infectadas tenían una edad de entre 3 y 4 semanas. Se inoculó aproximadamente 1 ml de cultivo en dos yemas axilares basales de la planta mediante inyección con aguja hipodérmica.

5.2 Ensayos de infección en tomate

Para los ensayos de infección en tomate con alta temperatura se utilizaron, el clon infectivo pBINX'-TYLCV y el plásmido pBINX' (*mock*), mientras que, para los experimentos de salinidad y sequía, se utilizaron el clon infectivo pGWB501-

TYLCV y el plásmido pGWB501. Se inocularon los clones en placas de LB sólido, suplementadas con los antibióticos correspondientes. Se incubaron a 28°C durante 48 horas. Posteriormente, se recogió biomasa y se inoculó en 5 ml de medio LB líquido, suplementado con los antibióticos correspondientes, manteniéndose 12 horas en agitación a 28°C. A continuación, se inoculó 1 ml del precultivo en 50 ml de medio LB líquido suplementado con los mismos antibióticos, manteniéndose en agitación a 28°C durante 12 horas. Finalmente, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 g., se eliminó el sobrenadante y se disolvió el pellet en un volumen de medio LB sin antibióticos. Los cultivos se resuspendieron en el volumen adecuado para obtener una solución de $DO_{600} = 1$.

Las plantas infectadas tenían una edad de entre 3 y 4 semanas. Se inoculó aproximadamente 1 ml de cultivo en dos yemas axilares basales de la planta mediante inyección con aguja hipodérmica.

5.3 Cuantificación de síntomas

Para la evaluación de la severidad de los síntomas debidos a la infección por TYLCV nos basamos en los índices ya publicados para *N. benthamiana* y tomate (Ogwok *et al.*, 2010; Osei *et al.*, 2012) mostrados en la tabla 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Índice de severidad de los síntomas producidos por TYLCV en *N. benthamiana*.

Índice	Descripción
0	Ausencia de síntomas
1	Aparición de una curvatura leve en la hoja
2	Abarquillamiento y arrugamiento de la superficie foliar
3	Reducción del tamaño y amarilleamiento de la hoja

Tabla 6. Índice de severidad de los síntomas producidos por TYLCV en tomate.

Índice	Descripción
0	Ausencia de síntomas
1	Aparición de un leve amarilleamiento
2	Moderado abarquillamiento y arrugamiento de la superficie foliar
3	Amarilleamiento, abarquillamiento y arrugamiento severo de la hoja
4	Completo abarquillamiento y arrugamiento de la superficie foliar. Reducción del tamaño de la hoja

7 Ensayos de estrés abióticos

7.1 Ensayos de estrés por alta temperatura

Se seleccionaron 60 plantas de entre 3 y 4 semanas de edad que presentaban un número de hojas y una altura similar. Estas plantas se dividieron en dos grupos de 30 plantas que se inocularon con el clon infectivo pBINX'-TYLCV o con el plásmido pBINX'(mock). Tras la inoculación se mantuvieron las plantas a día largo y 21°C (*N. benthamiana*) o 24°C (*S. lycopersicum*) durante 3 días para favorecer la transferencia de T-DNA por parte de *A. tumefaciens*. Tras los 3 días se separaron las plantas en grupos de 15 plantas según las que recibirían el tratamiento por alta temperatura o las que seguirían el tratamiento control. La temperatura se elevó 3 grados cada día hasta alcanzar 28°C o 35°C dependiendo del tratamiento.

Se regaron todas las plantas cada día alternativamente con 50 ml (*N. benthamiana*) o 75 ml (*S. lycopersicum*) de agua o con 25 ml de fertilizante y 25 ml de agua.

Las plantas se mantuvieron en este régimen durante 4 semanas, momento en el que se calculó su crecimiento y el número de hojas que habían desarrollado durante el experimento. Se recogieron muestras de las hojas apicales a los 14 dpi, 21 dpi y 28 dpi.

7.2 Ensayos de estrés por sequía

Para estudiar las interacciones entre el estrés abiótico por sequía y el estrés biótico de la infección de TYLCV se decidió realizar tres ensayos de sequía diferentes. En el primero se estudió el efecto de la sequía en la infección por TYLCV en *N. benthamiana* y tomate, iniciándose el tratamiento a 5 dpi (sección 7.2.1). En el segundo experimento, se estudió el efecto de la infección de TYLCV en la respuesta al estrés por sequía en *N. benthamiana* y tomate, comenzando la sequía a 21 dpi (sección 7.2.2). Por último, para observar el efecto de cada proteína viral en la respuesta al estrés por sequía, se llevó a cabo un tercer ensayo de estrés por sequía en *A. thaliana* transgénicas que expresaban cada una de las 6 proteínas de TYLCV a excepción de Rep (sección 7.2.3). Para evaluar el efecto de la sequía en *N. benthamiana* y tomate se utilizaron los índices indicados en las tablas 7 y 8 respectivamente. A continuación, se describen detalladamente cómo se realizaron cada uno de estos ensayos.

Tabla 7. Índice de severidad de los cambios producidos por la sequía en *N. benthamiana*.

Índice	Descripción
0	Ausencia de síntomas
1	Aparición de una curvatura leve en la hoja
2	Abarquillamiento y arrugamiento de la superficie foliar
3	Reducción del tamaño y amarilleamiento de la hoja

Tabla 8. Índice de severidad de los cambios producidos por la sequía en tomate.

Índice	Descripción
0	No presenta cambios debido a la sequía
1	Las hojas empiezan a perder agua, aparece una menor turgencia.
2	Las hojas basales están completamente caídas. Las hojas apicales se mantienen turgentes y erectas
3	La planta pierde la capacidad de mantenerse erecta.
4	Las hojas basales están completamente secas, puede ir acompañado de la aparición de tejidos dañados. Las hojas apicales están completamente caídas

7.2.1 Ensayos de estrés por sequía para estudiar el efecto de la sequía en la infección viral

Se seleccionaron 24 plantas (de *N. benthamiana* o de tomate) de entre 3 y 4 semanas de edad que presentaran una altura y un número de hojas similar. Estas plantas se dividieron en 2 grupos de 12 plantas; un grupo fue inoculado con el clon infectivo pGWB501-TYLCV, mientras que el otro grupo fue inoculado con el plásmido pGWB501 (*mock*). Tras la infección, las plantas se mantuvieron tres días en sustrato húmedo, y, posteriormente, cada grupo de plantas se subdividió en 2 grupos de 6 plantas; un grupo que estaría bajo régimen de sequía y otro grupo que se continuaría regando como control. El grupo con el tratamiento de sequía se dejó de regar a los 5 dpi, regándose a partir de los 8 dpi con 5 ml de agua. A partir de los 8 dpi, con el objetivo de permitir sobrevivir a las plantas, se las regó cada día con 5 ml de agua, mientras que el grupo control se mantuvo con el sustrato saturado de humedad durante todo el experimento.

Las plantas se mantuvieron en régimen de sequía hasta los 21 dpi, momento en el que se calculó el crecimiento y el número de hojas que habían desarrollado durante el experimento. Se recogieron hojas apicales a los 14 dpi y a los 21 dpi para posteriormente cuantificar la cantidad de DNA de TYLCV.

7.2.2 Ensayo de estrés por sequía para estudiar el efecto de la infección viral en la respuesta al estrés por sequía

Se seleccionaron 24 plantas (de *N. benthamiana* o de tomate) de entre 3 y 4 semanas de edad que presentaran un número de hojas y una altura similar. Estas plantas se subdividieron en 2 grupos de 12 plantas; un grupo fue inoculado con el clon infectivo pGWB501-TYLCV, inoculándose el otro grupo con el plásmido pGWB501 (*mock*). Tras la infección se mantuvieron tres días en sustrato húmedo, y, posteriormente, cada grupo de plantas se dividió en 2 grupos de 6 plantas; un grupo que se mantuvo bajo tratamiento de sequía y otro grupo que se continuó regando como control.

El grupo con el tratamiento de sequía se dejó de regar a los 21 dpi, regándose a partir de los 24 dpi con 5 ml de agua para permitir sobrevivir a la planta, mientras

que el grupo control se mantuvo con el sustrato saturado de humedad durante todo el experimento.

Las plantas se mantuvieron en régimen de sequía durante 1 semana, momento en el que se calculó el crecimiento y el número de hojas que habían desarrollado durante el experimento. Se recogieron muestras a los 21 dpi y a los 28 dpi para posteriormente cuantificar la cantidad de DNA de TYLCV.

7.2.3 Ensayo de estrés por sequía en plantas de *A. thaliana*

Para los ensayos de sequía con plantas de *A. thaliana*, se esterilizaron semillas (ver Tabla 3) que se germinaron en placas de MS tras pasar 2 días de estratificación. Las plantas se mantuvieron en placa a día corto durante una semana, tras lo cual fueron trasplantadas a macetas con una relación 5/3 de sustrato/vermiculita. Se trasplantaron 5 plantas a cada maceta y se regó de forma diaria con 3 ml de agua cada plántula durante la primera semana y con 2 ml durante la segunda semana. Al inicio de la tercera semana se dejaron de regar las plantas que conformaban el grupo bajo estrés por sequía y a las plantas control se las continuó regando, llevando el sustrato a saturación.

7.3 Ensayos de estrés por salinidad

Para estudiar las interacciones entre el estrés abiótico por salinidad y el estrés biótico de la infección de TYLCV se decidió realizar dos ensayos de salinidad diferentes. En el primero se estudió el efecto de la salinidad en la infección por TYLCV en *N. benthamiana* y tomate, iniciándose el tratamiento a 9 dpi (sección 7.3.1). A continuación, en el segundo ensayo, se estudió el efecto de la infección por TYLCV en la respuesta a estrés salino en *N. benthamiana* y tomate, iniciándose el tratamiento a 15 dpi (sección 7.3.2).

Para la cuantificación de la eficiencia del Fotosistema II (PSII) se utilizó el fluorómetro de luz modulada por amplitud de pulso (PAM) FluorPen modelo U100. El FluorPen U100 capta la fluorescencia basal emitida por el PSII (denominada Fv). A continuación, produce un corto pulso de luz saturado a 1 μ s. Tras la excitación electrónica, el PSII emite su fluorescencia máxima (denominada Fm). En la presente tesis, para cuantificar la eficiencia del PSII se utilizó el coeficiente Fv/Fm, calculado por el dispositivo.

7.3.1 Ensayo de estrés por salinidad para estudiar el efecto de la salinidad en el virus

Se seleccionaron 24 plantas de entre 3 y 4 semanas de edad que presentaran un número de hojas y una altura similar. Estas plantas se subdividieron en 2 grupos de 12 plantas que se inocularon con el clon infectivo pGWB501-TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*). Tras la infección se mantuvieron durante 9 días en sustrato húmedo tras lo cual cada grupo de plantas se subdividió en 2

grupos de 6 plantas. El grupo con el tratamiento de salinidad fue regado a los 9 dpi con 50 ml de agua a 0,8 M de NaCl mientras el grupo control recibió el mismo volumen de agua sin sal. Se fue incrementando la salinidad del agua con el que las plantas eran regadas; a los 11 dpi se las regó con agua suplementada con 1,6 M de NaCl y a los 12 dpi con 2 M. A partir de los 12 dpi se regaron alternativamente con 50 ml de agua suplementada con 2 M de sal y con 50 ml de agua sin sal. Las plantas se mantuvieron en régimen de salinidad hasta los 21 dpi, momento en el que se calculó el crecimiento y el número de hojas que habían desarrollado durante el experimento. Se recogieron muestras a los 14 dpi y a los 21 dpi.

7.3.2 Ensayo de estrés por salinidad para estudiar el efecto del virus en la respuesta al estrés por salinidad

Se seleccionaron 24 plantas de entre 3 y 4 semanas de edad que presentaran un número de hojas y una altura similar. Estas plantas se subdividieron en 2 grupos de 12 plantas que se inocularon con el clon infectivo pGWB501-TYLCV o con el plásmido pGWB501 (*mock*). Posteriormente, cada grupo de plantas se subdividió en 2 grupos de 6 plantas. El grupo con el tratamiento de salinidad se regó con 50 ml de agua suplementada con 0,8 M de NaCl a los 15 dpi. Incrementamos la salinidad del agua con el que regamos las plantas paulatinamente. A los 17 dpi las plantas fueron regadas con 50 ml de agua a 1,6 M, a los 20 dpi incrementamos la concentración hasta 2 M. En el ensayo en tomate se incrementó a los 21 dpi hasta 4 M. A partir de los 21 días las plantas eran regadas alternativamente con 50 ml de agua suplementada con 2 M de NaCl (en el caso de *N. benthamiana*) o 4 M (en el caso de tomate) y con 50 ml de agua sin sal.

Las plantas se mantuvieron en régimen de salinidad durante 1 semana, momento en el que se calculó el crecimiento y el número de hojas que habían desarrollado durante el experimento. Se recogieron muestras a los 21 dpi y a los 28 dpi.

8. Ensayos de interacción con ABA

8.1 Ensayo de germinación en ABA

Se esterilizaron semillas de *A. thaliana* (ver Tabla 2) que se dispersaron en placas de MS, en el caso del control, o de MS suplementado con 0,3 uM de ABA en el caso de las plantas con tratamiento. Se utilizaron 24 semillas por línea y tratamiento. Una vez inoculadas, se dejaron en oscuridad a 4 °C durante 2 días, tras lo cual las placas se pasaron a día corto. Tras 6 días se contabilizaron el número de semillas germinadas, aquellas que presentaban cotiledones y aquellas que aún no los habían desarrollado.

8.2 Cuantificación de ABA

Se partió de 30 mg de material proveniente de plantas individuales de *A. thaliana* tras 13 días de tratamiento de sequía, el cual fue introducido en un tubo de 1,5 ml. A continuación, se añadió 0,5 ml de metanol que contenía 2 ng de ABA-d₆. Se agitó el tubo a 1000 rpm durante 1 hora a 10 °C. Posteriormente el tubo fue centrifugado a 20000 rcf durante 10 minutos a 20 °C. 0,3 ml del sobrenadante resultante fueron diluidos en agua en un vial de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (ACQUITY UPLC BECH C18 1.7 µm Van Guard TM, 2.1x 5 mm). Finalmente 50 µl de la solución fueron inyectados a través de una columna (ACQUITY UPLC BECH C18 1.7 µm 2.1x150 mm) en el espectrómetro de masas acoplado a cromatografía líquida (LC-MS) (Waters Liquid chromatography ACQUITY UPLC I-class acoplado a AB SCIEX TripleTOF® 5600+). El ABA-d₆ fue usado como control interno. Los análisis de los resultados fueron realizados con el software PeakView 1.2.



Conclusions

1. A continued drought treatment applied at the early stages of the infection, leads to a decrease in TYLCV accumulation in both *N. benthamiana* and tomato plants. A continued drought treatment applied to *N. benthamiana* and tomato plants in which the TYLCV infection has already been established, has no effect on viral accumulation; the established viral infection alleviates the stress phenotypes caused by drought.
2. The virus-encoded C4 protein is sufficient to confer drought resistance to *A. thaliana* plants through a mechanism that relies on the presence of this protein at the plasma membrane. This effect is uncoupled from its impact on xylem patterning and it requires the expression of C4 outside of the *SCARECROW* (*SCR*) expression domain.
3. C4 does not significantly affect ABA accumulation, the expression of ABA-related genes, or the plant response to exogenous ABA. Therefore, C4 seems to be promoting drought tolerance in an ABA-independent manner.
4. A continued salt stress treatment applied at the early stages of the infection, promotes a reduction in TYLCV accumulation in both *N. benthamiana* and tomato plants. A continued salt stress treatment applied to *N. benthamiana* and tomato plants which presented a established TYLCV infection has no effect on viral accumulation; the established viral infection does not modify the effect of salt on the PSII activity or on plant turgor.
5. Heat stress treatment (35°C) during TYLCV infection (3-28 dpi) promotes TYLCV accumulation in tomato. TYLCV-infected tomato plants, under heat stress conditions, show reduced growth and fewer new leaves than mock-inoculated plants under heat treatment or TYLCV-infected plants under control conditions, indicating that heat stress and TYLCV infection act additively.
6. Stress by high temperature (35°C) during TYLCV infection (3-28 dpi) inhibits TYLCV accumulation and mask TYLCV infection symptoms in *N. benthamiana*. On the other hand, moderate temperature (28°C) during TYLCV infection (3-28 dpi) promotes viral accumulation in *N. benthamiana* compared to control temperature (21°C). Regardless of the effect of temperature on TYLCV accumulation, TYLCV infection inhibits plant growth to similar levels at all studied temperatures (21°C, 28°C or 35°C), indicating that this effect of TYLCV on the plant is temperature-independent within the studied temperature range.



Bibliografía

- Aberle, H. J., Rütz, M. L., Karayavuz, M., Frischmuth, S., Wege, C., Hülser, D., & Jeske, H. (2002). Localizing the movement proteins of Abutilon mosaic geminivirus in yeast by subcellular fractionation and freeze-fracture immuno-labelling. *Archives of Virology*, *147*(1), 103–117. <https://doi.org/10.1007/s705-002-8305-8>
- Ach, R. A., Durfee, T. I. M., Miller, A. N. N. B., Taranto, P., Hanley-bowdoin, L., Zambryski, P. C., & Gruissem, W. (1997). RRB1 and RRB2 Encode Maize Retinoblastoma-Related Proteins That Interact with a Plant D-Type Cyclin and Geminivirus Replication Protein. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(9), 5077–5086.
- Achuo, E. A., Prinsen, E., & Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant Pathology*, *55*(2), 178–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>
- Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Harrach, B., Harrison, R. L., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Mushegian, A. R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S. G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F. M., Gorbalenya, A. E., & Davison, A. J. (2017). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Archives of Virology*, *162*(8). <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3358-5>
- Afridi, M. S., Amna, Sumaira, Mahmood, T., Salam, A., Mukhtar, T., Mehmood, S., Ali, J., Khatoon, Z., Bibi, M., Javed, M. T., Sultan, T., & Chaudhary, H. J. (2019). Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *139*, 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.041>
- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2011). The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, *25*(3), 2433–2442. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0072>
- Aguilar, E., Allende, L., Del Toro, F. J., Chung, B. N., Canto, T., & Tenllado, F. (2015). Effects of elevated CO₂ and temperature on pathogenicity determinants and virulence of potato virus X/Potyvirus-Associated synergism. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(12), 1364–1373. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-15-0178-R>
- Aguilar, E., Almendral, D., Allende, L., Pacheco, R., Chung, B. N., Canto, T., & Tenllado, F. (2015). The P25 Protein of Potato Virus X (PVX) Is the Main Pathogenicity Determinant Responsible for Systemic Necrosis in PVX-Associated Synergisms. *Journal of Virology*, *89*(4), 2090–2103. <https://doi.org/10.1128/jvi.02896-14>

- Aguilar, E., Cutrona, C., del Toro, F. J., Vallarino, J. G., Osorio, S., Pérez-Bueno, M. L., Barón, M., Chung, BN., Canto, T., Tenllado, F. (2017). Virulence determines beneficial trade-offs in the response of virus-infected plants to drought via induction of salicylic acid. *Plant Cell and Environment*, *40*, 2909-2930. <https://doi.org/10.1111/pce.13028>
- Aguilar, E., Del Toro, F. J., Figueira-Galán, D., Hou, W., Canto, T., & Tenllado, F. (2020). Virus infection induces resistance to *Pseudomonas syringae* and to drought in both compatible and incompatible bacteria- host interactions, which are compromised under conditions of elevated temperature and CO₂ levels. *Journal of General Virology*, *101*(1), 122–135. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001353>
- Aguilar, E., Garnelo Gomez, B., & Lozano-Duran, R. (2020). Recent advances on the plant manipulation by geminiviruses. *Current Opinion in Plant Biology*, *56*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.03.009>
- Ahanger, M. A., Tomar, N. S., Tittal, M., Argal, S., & Agarwal, R. M. (2017). Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *23*(4), 731–744. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0462-7>
- Ahmad, P., Hashem, A., Abd-Allah, E. F., Alqarawi, A. A., John, R., Egamberdieva, D., & Gucel, S. (2015). Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. *Frontiers in Plant Science*, *6*(9), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00868>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*. *16*(5), 529–540 <https://doi.org/10.1111/mpp.12204>
- Alazem, M., & Lin, N. S. (2017). Antiviral Roles of Abscisic Acid in Plants. *Frontiers in Plant Science*, *8*(10), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01760>
- Alazem, M., He, M.-H., Moffett, P., & Lin, N.-S. (2017). Abscisic Acid Induces Resistance against Bamboo Mosaic Virus through Argonaute 2 and 3. *Plant Physiology*, *174*(1), 339–355. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00015>
- Alberti, S. (2020). The plant response to heat requires phase separation. *Nature*, *585*(7824), 191–192. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02442-x>. PMID: 32848237.
- Allie, F., Pierce, E. J., Okoniewski, M. J., & Rey, C. (2014). Transcriptional analysis of South African cassava mosaic virus-infected susceptible and tolerant landraces of cassava highlights differences in resistance, basal

defense and cell wall associated genes during infection. *BMC Genomics*, 15(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1006>

Andicott, B. F. T., & Lyon, J. L. (1965). Physiology of abscisic acid. *Annual reviews of Plant Physiology*, 20: 139-164

Anfoka, G., Moshe, A., Fridman, L., Amrani, L., Rotem, O., Kolot, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Gorovits, R. (2016). Infection mitigates the heat stress response of plants grown at high temperatures. *Nature*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19715>

Aou-ouad, A. H. El, Bota, J., Obata, T., Montero, R., Fernie, A. R., Medrano, H., & Florez-sarasa, I. (2018). Combined drought and virus infection trigger aspects of respiratory metabolism related to grapevine physiological responses. *Journal of Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.009>

Archard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., & Harberd, N. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(1), 91–94. <http://www.sciencemag.org/content/311/5757/91.short>

Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. r., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model of replication. *Virology*, 203, 10.

Arguello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L., & Rivera-Bustamante, R. (1994a). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, 26(2), 553–556. <https://doi.org/10.1007/bf00013742>

Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.-J., Orozco, B. M., Settlege, S. B., & Hanley-Bowdoin, L. (2004b). A Novel Motif in Geminivirus Replication Proteins Interacts with the Plant Retinoblastoma-Related Protein. *Journal of Virology*, 78(9), 4817–4826. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4817-4826.2004>

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156(July), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042>

Arroyo Mateos, M. (2015). *Estudio sobre la interacción planta-geminivirus*. Universidad de Málaga.

Atkinson, N. J., & Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 1–21. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>

- Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B. D., Niemczyk, E., Barna, B., Gullner, G., Janeczko, A., Kogel, K.H., Schäfer, P., Schwarczinger, I., Zuccaro, A., Skoczowski, A. (2008). Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist*, *180*(2), 501–510. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02583.x>
- Barghetti, A., Sjögren, L., Floris, M., Paredes, E. B., Wenkel, S., & Brodersen, P. (2017). Heat-shock protein 40 is the key farnesylation target in meristem size control, abscisic acid signaling, and drought resistance. *Genes & Development*, *31*, 2282–2295. <https://doi.org/10.1101/gad.301242.117.4>
- Bass, H. W., Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L., & Robertson, D. (2000). Chromosome condensation induced by geminivirus infection of mature plant cells. *Journal of Cell Science*, *113*(7), 1149–1160.
- Batelli, G., Verslues, P. E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K. S., Grillo, S., & Zhu, J.-K. (2007). SOS2 Promotes Salt Tolerance in Part by Interacting with the Vacuolar H⁺-ATPase and Upregulating Its Transport Activity. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(22), 7781–7790. <https://doi.org/10.1128/MCB.00430-07>
- Behjatnia, S. A. A., Dry, I. B., & Rezaian, M. A. (1998). Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus. *Nucleic Acids Research*, *26*(4), 925–931. <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.925>
- Bergès, S. E., Vile, D., Vazquez-rovere, C., Blanc, S., Yvon, M., Bédiée, A., Rolland, G., & Dauzat, M. (2018). Interactions Between Drought and Plant Genotype Change Epidemiological Traits of Cauliflower mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, *9*(5), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00703>
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *62*, 293-300.
- Betts, R. A., Alfieri, L., Bradshaw, C., Caesar, J., Feyen, L., Friedlingstein, P., Gohar, L., Koutroulis, A., Lewis, K., Morfopoulos, C., Papadimitriou, L., Richardson, K. J., Tsanis, I., & Wyser, K. (2018). Changes in climate extremes, fresh water availability and vulnerability to food insecurity projected at 1.5°C and 2°C global warming with a higher-resolution global climate model. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *376*(2119). <https://doi.org/10.1098/rsta.2016.0452>
- Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Biology*, *65*(2), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>

- Borah, B. K., Zarreen, F., Baruah, G., & Dasgupta, I. (2016). Insights into the control of geminiviral promoters. *Virology*, 495, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.04.033>
- Boulton, M. I., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P. G., King, D. I., & Davies, J. W. (1989). Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. *The Journal of General Virology*, 70(9), 2309–2323. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-9-2309>
- Briddon, R. W. (2003a). Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex. *Molecular Plant Pathology*, 4(6), 427–434. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00188.x>
- Briddon, R. W. (2016). 2016.021 a-kP. A. v2. *Tolecusatellitidae*. Create the *Tolecusatellitidae*, a new family of single-stranded DNA satellites with two genera. *ICTV taxonomic proposal*. 1–17. <https://talk.ictvonline.org/ICTV/proposals/2016.021a-kP.A.v2.Tolecusatellitidae.pdf>
- Briddon, R. W., & Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology*, 344(1), 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.042>
- Briddon, R. W., Bull, S. E., Amin, I., Idris, A. M., Mansoor, S., Bedford, I. D., Dhawan, P., Rishi, N., Siwatch, S. S., Abdel-Salam, A. M., Brown, J. K., Zafar, Y., & Markham, P. G. (2003b). Diversity of DNA β , a satellite molecule associated with some monopartite begomoviruses. *Virology*, 312(1), 106–121. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00200-9)
- Briddon, R. W., Bull, S. E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I. D., Rishi, N., Siwatch, S. S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A. M., & Markham, P. G. (2004). Diversity of DNA 1: A satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA β complexes. *Virology*, 324(2), 462–474. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.041>
- Briddon, R. W., Pinner, M. S., Stanley, J., & Markham, P. G. (1990). Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology*, 177(1), 85–94. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90462-Z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90462-Z)
- Briddon, R. W., Watts, J., Markham, P. G., & Stanley, J. (1989). The coat protein of beet curly top virus is essential for infectivity. *Virology*, 172(2), 628–633. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90205-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90205-5)
- Brough C.L., Sunter G., Gardiner W.E., Bisaro D.M. Kinetics of tomato golden mosaic virus DNA replication and coat protein promoter activity in *Nicotiana tabacum* protoplasts. *Virology*. 1992 Mar;187(1),1-9. doi: 10.1016/0042-6822(92)90289-2. PMID: 1736521.

- Buchmann, R. C., Asad, S., Wolf, J. N., Mohannath, G., Bisaro, D. M., & Irol, J. V. (2009). Geminivirus AL2 and L2 Proteins Suppress Transcriptional Gene Silencing and Cause Genome-Wide Reductions in Cytosine Methylation. *Journal of Virology*, *83*(10), 5005–5013. <https://doi.org/10.1128/JVI.01771-08>
- Bulgakov, V. P., Wu, H., & Jinn, T. (2019). Coordination of ABA and Chaperone Signaling in Plant Stress Responses. *Trends in Plant Science*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.004>
- Cai, X., Wang, C., Xu, Y., Xu, Q., Zheng, Z., & Zhou, X. (2007). Efficient gene silencing induction in tomato by a viral satellite DNA vector. *Virus Research*, *125*(2), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.12.016>
- Calil, I. P., & Fontes, E. P. B. (2017). Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, *119*(5), 711–723. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw200>
- Cao, W. H., Liu, J., Zhou, Q. Y., Cao, Y. R., Zheng, S. F., Du, B. X., Zhang, J. S., & Chen, S. Y. (2006b). Expression of tobacco ethylene receptor NTHK1 alters plant responses to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, *29*(7), 1210–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01501.x>
- Cao, W. H., Liu, J., He, X. J., Mu, R. L., Zhou, H. L., Chen, S. Y., & Zhang, J. S. (2006a). Modulation of Ethylene Responses Affects Plant Salt-Stress Responses. *Plant Physiology*, *143*(2), 707–719. <https://doi.org/10.1104/pp.106.094292>
- Cao, Y. R., Chen, S. Y., & Zhang, J. S. (2008). Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signaling and Behaviour*, *9*, 761–763.
- Caracruel, Z., Lozano-Durán, R., Huguet, S., Arroyo-Mateos, M., Rodríguez-Negrete, E. a, & Bejarano, E. R. (2012). C2 from Beet curly top virus promotes a cell environment suitable for efficient replication of geminiviruses, providing a novel mechanism of viral synergism. *The New Phytologist*, *194*(3), 846–858. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04080.x>
- Carluccio, A. V., Prigigallo, M. I., Rosas-Diaz, T., Lozano-Duran, R., & Stavolone, L. (2018). S-acylation mediates Mungbean yellow mosaic virus AC4 localization to the plasma membrane and in turns gene silencing suppression. *PLOS Pathogens*, *14*(8), e1007207. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007207>
- Carr, J. P. (2017). Exploring how viruses enhance plants' resilience to drought and the limits to this form of viral payback. *Plant Cell and Environment*, *40*(12), 2906–2908. <https://doi.org/10.1111/pce.13068>

- Carvalho, C. M., Fontenelle, M. R., Florentino, L. H., Santos, A. A., Zerbini, F. M., & Fontes, E. P. B. (2008a). A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *Plant Journal*, *55*(5), 869–880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03556.x>
- Carvalho, C. M., Machado, J. P. B., Zerbini, F. M., & Fontes, E. P. B. (2008b). NSP-interacting GTPase: A cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. *Plant Signaling and Behavior*, *3*(9), 752–754. <https://doi.org/10.4161/psb.3.9.6641>
- Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference (RNAi) in the Nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Natural Review Genetics*, *2*(14), 110–112. <https://doi.org/10.1038/nrg3355.RNA>
- Castillo, A. G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A., & Bejarano, E. R. (2003). Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). *Virology*, *312*, 381–394. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00234-4)
- Castillo-González, C., Liu, X., Huang, C., Zhao, C., Ma, Z., Hu, T., Sun, F., Shou, Y., Zhou, X., Wang, X. J., & Zhang, X. (2015). Geminivirus-encoded TrAP suppressor inhibits the histone methyltransferase SUVH4 / KYP to counter host defence. *ELIFE*, *4*, 1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.06671>
- Chan, Z. (2012). Expression profiling of ABA pathway transcripts indicates crosstalk between abiotic and biotic stress responses in Arabidopsis. *Genomics*, *100*(2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.06.004>
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Ogbe, F., & Fauquet, C. M. (2005). Effect of Temperature on Geminivirus-Induced RNA Silencing in Plants 1. *Plant Physiology*, *138*(8), 1828–1841. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066563.1828>
- Chen, D., Ma, X., Li, C., Zhang, W., Xia, G., & Wang, M. (2014). A wheat aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, TaACO1, negatively regulates salinity stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Reports*, *33*(11), 1815–1827. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1659-7>
- Chen, L., Zhang, L., Li, D., Wang, F., & Yu, D. (2013). WRKY8 transcription factor functions in the TMV-cg defense response by mediating both abscisic acid and ethylene signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(21), E1963–E1971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221347110>
- Chen, T., Saeed, Q., He, Z., & Lu, L. (2019). Transmission efficiency of cotton leaf curl Multan virus by three cryptic species of Bemisia tabaci complex in cotton cultivars. *PeerJ*, *2019*(10), 1–13. <https://doi.org/10.7717/peerj.7788>



- Chen, X., Bao, H., Guo, J., Jia, W., Tai, F., Nie, L., Jiang, P., Feng, J., Lv, S., & Li, Y. (2014). Na⁺/H⁺ exchanger 1 participates in tobacco disease defence against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* by affecting vacuolar pH and priming the antioxidative system. *Journal of Experimental Botany*, *65*(20), 6107–6122. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru351>
- Cheng, E. H. M., & Lin, T. (2013). Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor AtERF53 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *82*, 223–237. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0054-z>
- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Shi, X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z., Fowke, L. C., Wang, H., & Zhou, Y. (2013). Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *75*(4), 642–655. <https://doi.org/10.1111/tpj.12228>
- Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, *53*(7), 912–918. <https://doi.org/10.1139/W07-050>
- Chernys, J. T., & Zeevaart, J. A. D. (2000). Characterization of the 9-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Gene Family and the Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis in Avocado 1. *Plant Physiology*, *124*(9), 343–353.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J.-K. (2006). Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. *Genetic Engineering*, *27*, 141–142.
- Chojak, J., Kuźniak, E., Świercz, U., Sekulska-Nalewajko, J., & Goćlawski, J. (2012). Interaction Between Salt Stress and Angular Leaf Spot (*Pseudomonas Syringae* Pv *Lachrymans*) in Cucumber. *Vegetable Crops Research Bulletin*, *77*, 5–16. <https://doi.org/10.2478/v10032-012-0011-4>
- Chojak-Koźniewska, J., Linkiewicz, A., Sowa, S., Radzioch, M. A., & Kuźniak, E. (2017). Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environmental and Experimental Botany*, *136*, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.004>
- Chojak-Koźniewska, J., Kuźniak, E., & Zimny, J. (2018). The effects of combined abiotic and pathogen stress in plants: Insights from salinity and *pseudomonas syringae* pv *lachrymans* interaction in cucumber. *Frontiers in Plant Science*, *871*(11), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01691>
- Choudhury, N. R., Malik, P. S., Singh, D. K., Islam, M. N., Kaliappan, K., & Mukherjee, S. K. (2006). The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6362–6377. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl903>

- Chowda-Reddy, R. V., Achenjang, F., Felton, C., Etarock, M. T., Anangfac, M. T., Nugent, P., & Fondong, V. N. (2008). Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus Research*, 135(1), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.02.014>
- Chung, B. N., Canto, T., Tenllado, F., Choi, K. S., Joa, J. H., & Ahn, J. J. (2016). The Effects of High Temperature on Infection by Potato virus Y, Potato virus A, and Potato leafroll virus. *The Plant Pathology Journal*, 32(4), 321–328.
- Chung, H. Y., & Sunter, G. (2014). Interaction between the transcription factor AtTIFY4B and begomovirus AL2 protein impacts pathogenicity. *Plant Molecular Biology*, 86(1–2), 185–200. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0222-9>
- Cohen, S., & Antignus, Y. (2011). Tomato Yellow Leaf Curl Virus, a Whitefly-Borne Geminivirus of Tomatoes. *Advances in Disease Vector Research*, 10, 259–288. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2590-4_10
- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyán, J. (2015). Viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 480, 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>
- Cutler, S., Ghassemaian, M., Bonetta, D., Cooney, S., Mccourt, P. (1996). A Protein Farnesyl Transferase Involved in Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis. *Science*, 273(5279), 1239–1241. <http://www.jstor.org/stable/2891255> A Protein Farnesyl Transferase Involved in Absc.
- Czosnek, H. (2009). Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Encyclopaedia of Virology*. <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00717-2>
- Czosnek, H., Ber, R., Antignus, Y., Cohen, S., Navot, N., & Zamir, D. (1987). Isolation of tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology*, 78, 508–512.
- Czosnek, H., Hariton-Shalev, A., Sobol, I., Gorovits, R., & Ghanim, M. (2017). The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/v9100273>
- Dáder, B., Fereres, A., Moreno, A., & Trębicki, P. (2016). Elevated CO₂ impacts bell pepper growth with consequences to *Myzus persicae* life history, feeding behaviour and virus transmission ability. *Scientific Reports*, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep19120>
- Dahal, G., Hughes, J. D., Thottappilly, G., & Lockhart, B. E. L. (1998). Effect of temperature on symptom expression and reliability of banana streak badnavirus detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* spp.). *Plant Disease*, 82(1), 16–21. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.16>

- Daliakopoulos, I. N., Apostolakis, A., Wagner, K., Deligianni, A., Koutskoudis, D., Stamatakis, A., & Tsanis, I. K. (2019). Effectiveness of *Trichoderma harzianum* in soil and yield conservation of tomato crops under saline irrigation. *Catena*, 175(11), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.12.009>
- Dasgupta, S., Hossain, M. M., Huq, M., & Wheeler, D. (2015). Climate change and soil salinity: The case of coastal Bangladesh. *Ambio*, 44(8), 815–826. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0681-5>
- Dastogeer, K. M. G., Li, H., Sivasithamparam, K., Jones, M. G. K., & Wylie, S. J. (2018). Fungal endophytes and a virus confer drought tolerance to *Nicotiana benthamiana* plants through modulating osmolytes, antioxidant enzymes and expression of host drought responsive genes. *Environmental and Experimental Botany*, 149(11), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.009>
- Davis, T. S., Bosque-Pérez, N. A., Foote, N. E., Magney, T., & Eigenbrode, S. D. (2015). Environmentally dependent host-pathogen and vector-pathogen interactions in the Barley yellow dwarf virus pathosystem. *Journal of Applied Ecology*, 52(5), 1392–1401. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12484>
- De Bokx, J., & Piron, D. (1977). Effect of temperature on symptom expression and relative concentration of Potato viruses S and M in cv. *Eerstel. Med. Fak. Landbouw. Rijksuniv. Gent*, 42/2, 1977, 2020.
- Del Toro, F. J., Choi, K. S., Rakhshandehroo, F., Aguilar, E., Tenllado, F., & Canto, T. (2019). Ambient conditions of elevated temperature and CO₂ levels are detrimental to the probabilities of transmission by insects of a Potato virus Y isolate and to its simulated prevalence in the environment. *Virology*, 530(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.001>
- Del Toro, F. J., Aguilar, E., Hernández-Walias, F. J., Tenllado, F., Chung, B. N., & Canto, T. (2015). High temperature, high ambient CO₂ affect the interactions between three positive-sense RNA viruses and a compatible host differentially, but not their silencing suppression efficiencies. *PLoS ONE*, 10(8), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136062>
- Del Toro, Francisco J., Mencía, E., Aguilar, E., Tenllado, F., & Canto, T. (2018). HCPro-mediated transmission by aphids of purified virions does not require its silencing suppression function and correlates with its ability to coat cell microtubules in loss-of-function mutant studies. *Virology*, 525(7), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.09.002>
- Desvoyes, B., & Gutierrez, C. (2020). Roles of plant retinoblastoma protein: cell cycle and beyond. *The EMBO Journal*, 39(19), 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105802>
- Dewes, C. F., Rangwala, I., Barsugli, J. J., Hobbins, M. T., & Kumar, S. (2017).

Drought risk assessment under climate change is sensitive to methodological choices for the estimation of evaporative demand. *PLoS ONE*, 12(3), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174045>

- Díaz-Pendón, J. A., Cañizares, M. C., Moriones, E., Bejarano, E. R., Czosnek, H., & Navas-Castillo, J. (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: Ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Molecular Plant Pathology*, 11(4), 441–450. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00618.x>
- DiLeo, M. V., Pye, M. F., Dye, S. M., Resende, R. S., MacDonald, J. D., & Bostock, R. M. (2018). Abscisic acid as a dominant signal in tomato during salt stress predisposition to phytophthora root and crown rot. *Frontiers in Plant Science*, 9(9), 871–879. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00525>
- Ding, Y., Fromm, M., & Avramova, Z. (2012). Multiple exposures to drought “train” transcriptional responses in Arabidopsis. *Nature Communications*, 3, 740–749. <https://doi.org/10.1038/ncomms1732>
- Dolgikh, V. A., Pukhovaya, E. M., & Zemlyanskaya, E. V. (2019). Shaping Ethylene Response: The Role of EIN3/EIL1 Transcription Factors. *Frontiers in Plant Science*, 10(8), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01030>
- Dong, H., Zhen, Z., Peng, J., Chang, L., Gong, Q., & Wang, N. N. (2011). Loss of ACS7 confers abiotic stress tolerance by modulating ABA sensitivity and accumulation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4875–4887. <https://doi.org/10.1093/jxb/err143>
- Donson, J., Morris-Krsinich, B. A., Mullineaux, P. M., Boulton, M. I., & Davies, J. W. (1984). A putative primer for second-strand DNA synthesis of maize streak virus is virion-associated. *The EMBO Journal*, 3(13), 3069–3073. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02260.x>
- Eagle, P. A., & Hanley-Bowdoin, L. (1997). cis elements that contribute to geminivirus transcriptional regulation and the efficiency of DNA replication. *Journal of Virology*, 71(9), 6947–6955. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261423><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC191979>
- Eastburn, D. M., McElrone, A. J., & Bilgin, D. D. (2011). Influence of atmospheric and climatic change on plant-pathogen interactions. *Plant Pathology*, 60, 54-69. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02402.x>
- El Aou-ouad, H., Pou, A., Tomás, M., Montero, R., Ribas-Carbo, M., Medrano, H., & Bota, J. (2017). Combined effect of virus infection and water stress on water flow and water economy in grapevines. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/ppl.12541>

- Elad, Y., & Pertot, I. (2014). Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. *Journal of Crop Improvement*, 28, 99-139. <https://doi.org/10.1080/15427528.2014.865412>
- Elmer, J. S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W. E., Bisaro, D. M., & Rogers, S. G. (1988). Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Research*, 16(14), 7043–7060. <https://doi.org/10.1093/nar/16.14.7043>
- Elmer, S., & Rogers, S. G. (1990). Selection for wild type size derivatives of tomato golden mosaic virus during systemic infection. *Nucleic Acids Research*, 18(8), 2001–2010. <https://doi.org/10.1093/nar/18.8.2001>
- Encabo, J. R., Macalalad-Cabral, R. J. A., Matres, J. M. K., Coronejo, S. C. T. P., Jonson, G. B., Kishima, Y., Henry, A., Choi, I. R. (2020). Infection with an asymptomatic virus in rice results in a delayed drought response. *Functional Plant Biology*, 47(3), 239–249. <https://doi.org/10.1071/FP19241>
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H., Okamoto, M., & Ikegami, K. (2008). Drought Induction of Arabidopsis 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Occurs in Vascular Parenchyma Cells 1. *Plant Physiology*, 147(8), 1984–1993. <https://doi.org/10.1104/pp.108.116632>
- Eunkyoo, O., Jia-Ying, Z., & Zhi-Yong, W. (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature Cell Biology*, 14(8), 802–809. <https://doi.org/10.1038/ncb2545>. Interaction
- Fan, P., Wang, H., Xue, H., Rosas-Diaz, T., Tang, W., Zhang, H., Xu, L., & Lozano-Duran, R. (2019). The receptor-like kinases BAM1 and BAM2 promote the cell-to-cell movement of miRNA in the root stele to regulate xylem patterning. *BioRxiv*, 603415. <https://doi.org/10.1101/603415>
- Fang, Y., & Xiong, L. (2015). General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(4), 673–689. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>
- Farahbakhsh, F., Hamzehzarghani, H., Massah, A., Tortosa, M., Yasayee, M., & Rodriguez, V. M. (2019). Comparative metabolomics of temperature sensitive resistance to wheat streak mosaic virus (WSMV) in resistant and susceptible wheat cultivars. *Journal of Plant Physiology*, 237(4), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.03.011>
- Fiallo-Olivé, E., Pan, L., Liu, S., & Navas-castillo, J. (2019). Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: dependence of the vector species. *Phytopathology*, 110, 10–17.
- Fiallo-Olivé, E., Tovar, R., & Navas-Castillo, J. (2016). Deciphering the biology of deltasatellites from the New World: maintenance by New World

begomoviruses and whitefly transmission. *New Phytologist*, 212(3), 680–692. <https://doi.org/10.1111/nph.14071>

- Finka, A., Farinia, A., Cuendet, H., Maathuis, F. J. M., Saidi, Y., & Goloubinoff, P. (2012). Plasma Membrane Cyclic Nucleotide Gated Calcium Channels Control Land Plant Thermal Sensing and Acquired Thermotolerance. *The Plant Cell*, 24(August), 3333–3348. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095844>
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 11, e0166. <https://doi.org/10.1199/tab.0166>
- Fondong, V. N. (2013). Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology*, 14(6), 635–649. <https://doi.org/10.1111/mpp.12032>
- Fontes, E. P. B., Eagle, P. A., Sipe, P. S., Luckow, V. A., & Hanley-Bowdoin, L. (1994a). Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8459–8465. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)37216-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)37216-2)
- Fontes, E. P. B., Gladfelter, H. J., Schaffer, R. L., Petty, I. T. D., & Hanley-Bowdoin, L. (1994b). Geminivirus replication origins have a modular organization. *Plant Cell*, 6(3), 405–416. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.3.405>
- Fontes, E. P. B., Santos, A. A., Luz, D. F., Waclawovsky, A. J., & Chory, J. (2004). The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. *Genes and Development*, 18(20), 2545–2556. <https://doi.org/10.1101/gad.1245904>
- Fontes, E. P., Luckow, V. A., & Hanley-Bowdoin, L. (1992). A geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. *The Plant cell*, 4(5), 597–608. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.5.597>
- Franklin, K. A., Lee, S. H., Patel, D., Kumar, S. V., Spartz, A. K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J. D., Wigge, P. A., & Gray, W. M. (2011). Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20231–20235. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110682108>
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H. M., & Marion-Poll, A. (2012). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant Journal*, 70(3), 501–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04887.x>
- Frischmuth, S., Wege, C., Hülser, D., & Jeske, H. (2007). The movement protein BC1 promotes redirection of the nuclear shuttle protein BV1 of Abutilon mosaic geminivirus to the plasma membrane in fission yeast. *Protoplasma*, 230(1–2), 117–123. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0223-x>

- Fu, D. Q., Zhu, B. Z., Zhu, H. L., Zhang, H. X., Xie, Y. H., Jiang, W. B., Zhao, X. D., & Luo, Y. B. (2006). Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. *Molecules and Cells*, 21(1), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.engstruct.2005.08.006>
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L., & Zhu, J. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signaling pathway. *Nature*, 462(7273), 660–664. <https://doi.org/10.1038/nature08599>
- Fujii, H., Verslues, P. E., & Zhu, J. K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(2), 485–494. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048538>
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509–525. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>
- Gafni, Y., & Epel, B. L. (2002). The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(5), 231–241. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0402>
- Gaind, S. (2016). Phosphate dissolving fungi: Mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiological Research*, 193, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.005>
- Gao, F., Han, X., Wu, J., Zheng, S., Shang, Z., Sun, D., Zhou, R., Li, B., Biology, C., & Engineering, C. (2012). A heat-activated calcium-permeable channel – Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6 – is involved in heat shock responses. *The Plant Journal*, 70, 1056–1069. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.04969.x>
- García-Arenal, F., & Zerbini, F. M. (2019). Life on the Edge: Geminiviruses at the Interface between Crops and Wild Plant Hosts. *Annual Review of Virology*, 6, 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015536>
- García-Ruiz, H. (2019). Host factors against plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, 20(11), 1588–1601.
- Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K. A. S., Grill, E., Romeis, T., & Hedrich, R.



(2010). Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 8023–8028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912030107>

Ghandi, A., Adi, M., Lilia, F., Linoy, A., Or, R., Mikhail, K., Mouhammad, Z., Czosnek, H., Rena, G. (2016). Tomato yellow leaf curl virus infection mitigates the heat stress response of plants grown at high temperatures. *Scientific Reports*, 6, 1-12 <https://doi.org/10.1038/srep19715>

Ghanim, M. (2014). A review of the mechanisms and components that determine the transmission efficiency of Tomato yellow leaf curl virus (Geminiviridae; Begomovirus) by its whitefly vector. *Virus Research*, 186, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.022>

Gharsallah, C., Gharsallah Chouchane, S., Werghi, S., Mehrez, M., Fakhfakh, H., & Gorsane, F. (2020). Tomato contrasting genotypes responses under combined salinity and viral stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(7), 1411–1424. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00835-w>

Gilbertson, R. L., Sudarshana, M., Jiang, H., Rojas, M. R., & Lucas, W. J. (2003). Limitations on Geminivirus Genome Size Imposed by Plasmodesmata and Virus-Encoded Movement Protein: Insights into DNA Trafficking The Plant Cell. *The Plant Cell*, 15(11), 2578–2591. <https://doi.org/10.1105/tpc.015057.2>

Gillette, W. K., Meade, T. J., Jeffrey, J. L., & Petty, I. T. D. (1998). Genetic determinants of host-specificity in bipartite geminivirus DNA A components. *Virology*, 251(2), 361–369. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9424>

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M., & Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal*, 16(4), 433–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00310.x>

Goel, A. K., Lundberg, D., Torres, M. A., Matthews, R., Akimoto-tomiyama, C., Farmer, L., Dangl, J.L., Grant, S. R. (2008). The Pseudomonas syringae Type III Effector HopAM1 Enhances Virulence on Water-Stressed Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(3), 361–370.

Gong, P., Tan, H., Zhao, S., Li, H., Liu, H., Ma, Y., Zhang, X., Rong, J., Fu, X., Lozano-Durán, R., Li, F., & Zhou, X. (2021). Geminiviruses encode additional small proteins with specific subcellular localizations and virulence function. *Nature Communications*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24617-4>

- Góngora-Castillo, E., Ibarra-Laclette, E., Trejo-Saavedra, D. L., & Rivera-Bustamante, R. F. (2012). Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology Journal*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-295>
- González, R., Butković, A., & Elena, S. F. (2020). From foes to friends: Viral infections expand the limits of host phenotypic plasticity. *Advances in Virus Research*, 106, 85–121. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.01.003>
- Gordon-Kamm, W., Dilkes, B. P., Lowe, K., Hoerster, G., Sun, X., Ross, M., Church, L., Bunde, C., Farrell, J., Hill, P., Maddock, S., Snyder, J., Sykes, L., Li, Z., Woo, Y. M., Bidney, D., & Larkins, B. A. (2002). Stimulation of the cell cycle and maize transformation by disruption of the plant retinoblastoma pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11975–11980. <https://doi.org/10.1073/pnas.142409899>
- Gorovits, R., & Czosnek, H. (2017). The Involvement of Heat Shock Proteins in the Establishment of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Infection. *Frontiers in Plant Science*, 8(3), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00355>
- Gorovits, R., Moshe, A., Amrani, L., Kleinberger, R., Anfoka, G., & Czosnek, H. (2017). The six Tomato yellow leaf curl virus genes expressed individually in tomato induce different levels of plant stress response attenuation. *Cell Stress and Chaperones*, 22, 345–355. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0766-0>
- Gottlieb, Y., Zchori-Fein, E., Mozes-Daube, N., Kontsedalov, S., Skaljac, M., Brumin, M., Sobol, I., Czosnek, H., Vavre, F., Fleury, F., & Ghanim, M. (2010). The Transmission Efficiency of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by the Whitefly *Bemisia tabaci* Is Correlated with the Presence of a Specific Symbiotic Bacterium Species. *Journal of Virology*, 84(18), 9310–9317. <https://doi.org/10.1128/JVI.00423-10>
- Groen, S. C., Jiang, S., Murphy, A. M., Cunniffe, N. J., Westwood, J. H., Davey, M. P., Bruce, T. J. A., Caulfield, J. C., Furzer, O. J., Reed, A., Robinson, S. I., Miller, E., Davis, C. N., Pickett, J. A., Whitney, H. M., Glover, B. J., & Carr, J. P. (2016). Virus Infection of Plants Alters Pollinator Preference: A Payback for Susceptible Hosts? *PLoS Pathogens*, 12(8), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005790>
- Grondeau, C., Samson, R., & Sands, D. C. (1994). A Review of Thermotherapy to Free Plant Materials from Pathogens , Especially Seeds from Bacteria A Review of Thermotherapy to Free Plant Materials from Pathogens , Especially Seeds from Bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13, 57–75.
- Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y., & Zhu, J. (2013). Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 840–851. <https://doi.org/10.1111/tpj.12169>

- Guan, Q., Yue, X., Zeng, H., & Zhu, J. (2014). The Protein Phosphatase RCF2 and Its Interacting Partner NAC019 Are Critical for Heat Stress – Responsive Gene Regulation and Thermotolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(1), 438–453. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118927>
- Guerrero, J., Regedanz, E., Lu, L., Ruan, J., Bisaro, D. M., & Sunter, G. (2020). Manipulation of the Plant Host by the Geminivirus AC2/C2 Protein, a Central Player in the Infection Cycle. *Frontiers in Plant Science*, 11(5), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00591>
- Guevara-González, R. G., Ramos, P. L., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). Complementation of coat protein mutants of pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology*, 89(7), 540–545. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.7.540>
- Guo, H., & Ecker, J. R. (2003). Plant Responses to Ethylene Gas Are Mediated by of EIN3 Transcription Factor. *Cell*, 115(6), 667–677. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00969-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00969-3)
- Guo, T., Guo, Q., Cui, X. Y., Liu, Y. Q., Hu, J., & Liu, S. S. (2015). Comparison of transmission of Papaya leaf curl China virus among four cryptic species of the whitefly Bemisia tabaci complex. *Scientific Reports*, 5(10), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep15432>
- Guo, T., Zhao, J., Pan, L. L., Geng, L., Lei, T., Wang, X. W., & Liu, S. S. (2018). The level of midgut penetration of two begomoviruses affects their acquisition and transmission by two species of Bemisia tabaci. *Virology*, 515(12), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.004>
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266–269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/701596>
- Gutierrez, C., & Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Genome*, 56, 313–329.
- Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., & Scharf, K. (2011). Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 Chaperones and Heat Stress Transcription Factors in Tomato. *The Plant Cell*, 23(2), 741–755. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076018>
- Haible, D., Kober, S., & Jeske, H. (2006). Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *Journal of Virological Methods*, 135(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.01.017>

- Halfter, U., Ishitani, M., & Zhu, J.-K. (1999). The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3735–3740. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3735>
- Hallan, V., & Gafni, Y. (2001). Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) capsid protein (CP) subunit interactions: Implications for viral assembly. *Archives of Virology*, *146*(9), 1765–1773. <https://doi.org/10.1007/s007050170062>
- Hammami, H., Baptista, P., Martins, F., Gomes, T., Abdelly, C., & Mahmoud, O. M. Ben. (2016). Impact of a natural soil salinity gradient on fungal endophytes in wild barley (*Hordeum maritimum* With.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2142-0>
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(11), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Harrison, B. D. (1956). Studies on the effect of temperature on virus multiplication in inoculated leaves. *J. Biol. Chem*, *4*, 521–534.
- Harrison, B. D. (1985). Advances in Geminivirus Research. *Annual Review of Phytopathology*, *23*(1), 55–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000415>
- Harrison, B. D., Swanson, M. M., & Fargette, D. (2002). Begomovirus coat protein: Serology, variation and functions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *60*(5), 257–271. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0404>
- Hartitz, M. D., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1999). The tomato golden mosaic virus transactivator (TrAP) is a single- stranded DNA and zinc-binding phosphoprotein with an acidic activation domain. *Virology*, *263*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9925>
- He, Y. Z., Wang, Y. M., Yin, T. Y., Fiallo-Olivé, E., Liu, Y. Q., Hanley-Bowdoin, L., & Wang, X. W. (2020). A plant DNA virus replicates in the salivary glands of its insect vector via recruitment of host DNA synthesis machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(29), 16928–16937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820132117>
- He, Z., & Li, J. (2015). Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Frontiers in Plant Science*, *6*(5), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00267>
- Hehnl, S., Wege, C., & Jeske, H. (2004). Interaction of DNA with the Movement Proteins of Geminiviruses Revisited. *Journal of Virology*, *78*(14), 7698–7706. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7698-7706.2004>

- Hesketh, E. L., Saunders, K., Fisher, C., Potze, J., Stanley, J., Lomonosoff, G. P., & Ranson, N. A. (2018). The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nature Communications*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04793-6>
- Heyraud-Nitschke, Françoise Schumacher, S., Laufs, J., Schaefer, S., Schell, J., & Gronenborn, B. (1995). Determination of the origin cleavage and joining domain of geminivirus Rep proteins. *Nucleic Acids Research*, 23(6), 910–916.
- Hily, J. M., Poulicard, N., Mora, M. Á., Pagán, I., & García-Arenal, F. (2016). Environment and host genotype determine the outcome of a plant-virus interaction: From antagonism to mutualism. *New Phytologist*, 209(2), 812–822. <https://doi.org/10.1111/nph.13631>
- Hoang, T. M. L., Tran, T. N., Nguyen, T. K. T., Williams, B., Wurm, P., Bellairs, S., & Mundree, S. (2016). Improvement of salinity stress tolerance in rice: Challenges and opportunities. *Agronomy*, 6(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/agronomy6040054>
- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., & Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRHobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., & Hattori, T. (1999). ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant Journal*, 19(6), 679–689. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00565.x>
- Höhnle, M., Höfer, P., Bedford, I. D., Briddon, R. W., Markham, P. G., & Frischmuth, T. (2001). Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology*, 290(1), 164–171. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1140>
- Horváth, G. V., Pettkó-Szandtner, A., Nikovics, K., Bilgin, M., Boulton, M., Davies, J. W., Gutiérrez, C., & Dudits, D. (1998). Prediction of functional regions of the maize streak virus replication-associated proteins by protein-protein interaction analysis. *Plant Molecular Biology*, 38(5), 699–712. <https://doi.org/10.1023/A:1006076316887>
- Hossain, M. A., Hussain Wani, S., Bhattacharjee, S., Burritt, D. J., & Phan Tran, L.-S. (2016). Drought Stress Tolerance in Plants. 2. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32423-4>
- Hossain, M. S., & Dietz, K. J. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science*, 7(5). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00548>
- Hosseini, S. A., Zamani, G. R., Yaghub, Z. M., & Khayyat, M. (2018). Effects of Cucumber Mosaic Virus infection and drought tolerance of tomato plants

under greenhouse conditions: Preliminary results. *Journal of Berry Research*, 8, 129–136. <https://doi.org/10.3233/JBR-170285>

- Hu, H., & Xiong, L. (2014). Genetic Engineering and Breeding of Drought-Resistant Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 715–741. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040000>
- Huang, Y. C., Niu, C. Y., Yang, C. R., & Jinn, T. L. (2016). The heat-stress factor HSFA6b connects ABA signaling and ABA-mediated heat responses. *Plant Physiology*, 172(10), pp.00860.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00860>
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development*, 24(16), 1695–1708. <https://doi.org/10.1101/gad.1953910>
- Hull, R. (2002). Disease Symptoms and Host Range. In R. Hull (Ed.), *Matthews' Plant Virology*, 47–74. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-361160-4.50054-2>
- Incarbone, M., & Dunoyer, P. (2013). RNA silencing and its suppression: Novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science*, 18(7), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.001>
- Ingham, D. J., Pascal, E., & Lazarowitz, S. G. (1995). Both bipartite geminivirus movement proteins define viral host range, but only BL1 determines viral pathogenicity. In *Virology* 207(1), 191–204. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1066>
- Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., & Nagata, T. (2004). A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. *Journal of Virological Methods*, 116(2), 209–211. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.015>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2008). Abscisic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1106–1111. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.08.002>
- Isayenkov, S. V., & Maathuis, F. J. M. (2019). Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science*, 10(February). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>
- Ismayil, A., Haxim, Y., Wang, Y., Li, H., Qian, L., Han, T., Chen, T., Jia, Q., Liu, A. Y., Zhu, S., Deng, H., Gorovits, R., Hong, Y., Hanley-bowdoin, L., & Liu, Y. (2018). Cotton Leaf Curl Multan virus C4 protein suppresses both transcriptional and post-transcriptional gene silencing by interacting with SAM synthetase. *PLoS Pathogens*, 14(8), 1–24.

- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., & Kato, T. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9- cis - epoxy-carotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 27, 325–333.
- Jackel, J. N., Buchmann, R. C., Singhal, U., & Bisaro, D. M. (2015). Analysis of Geminivirus AL2 and L2 Proteins Reveals a Novel AL2 Silencing Suppressor Activity. *Journal of Virology*, 89(6), 3176–3187. <https://doi.org/10.1128/jvi.02625-14>
- Jensen, M. K., Lindemose, S., Masi, F. de, Reimer, J. J., Nielsen, M., Perera, V., Workman, C. T., Turck, F., Grant, M. R., Mundy, J., Petersen, M., & Skriver, K. (2013). ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in Arabidopsis thaliana. *FEBS Open Biology*, 3, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.07.006>
- Jeske, H. (2009). Geminiviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 331, 185–226. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_11
- Jeske, H., Lütgemeier, M., & Preiß, W. (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal*, 20(21), 6158–6167.
- Ji, H., Pardo, J. M., Batelli, G., Van Oosten, M. J., Bressan, R. A., & Li, X. (2013). The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Molecular Plant*, 6(2), 275–286. <https://doi.org/10.1093/mp/sst017>
- Jiang, C., Bel, E. J., Cao, Y., Smith, J. A. C., & Harberd, N. P. (2013). An Arabidopsis Soil-Salinity – Tolerance Mutation Confers Ethylene-Mediated Enhancement of Sodium / Potassium Homeostasis. *The Plant Cell*, 25(9), 3535–3552. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115659>
- Jogawat, A., Saha, S., Bakshi, M., Dayaman, V., & Kumar, M. (2013). Jogawat et al. - 2013 - Piriformospora indica rescues growth diminution of rice seedlings during high salt stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8, 1–6.
- Johnson, J. (1922). The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants. *Phytopathology*, 12, 438–440.
- Johnstone, G. R. (1971). *Therapy of virus-infected plants by heat treatment*. University of Tasmania.
- Jones, R. A. C. (2016). Future Scenarios for Plant Virus Pathogens as Climate Change Progresses. *Advances in Virus Research*, 1, 87-147. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.02.004>
- Jung, J., Barbosa, A. D., Hutin, S., Kumita, J. R., Gao, M., Derwort, D., Silva, C. S., Lai, X., Pierre, E., Geng, F., Kim, S., Baek, S., Zubieta, C., Jaeger, K.

E., & Wigge, P. A. (2020). A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in Arabidopsis. *Nature*, 585(7824), 256-260. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2644-7>

Jung, J., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A. K., Box, M. S., Charoensawan, V., Cortijo, S., Kumar, M., Grant, A., Locke, J. C. W., Schäfer, E., Jaeger, K. E., & Wigge, P. A. (2016). Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Plant Science*, 354(6314), 886–889.

Jupin, I., De Kouchovsky, F., Jouanneau, F., & Gronenborn, B. (1994). Movement of Tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology*, 204, 82–90.

Kanakala, S., & Ghanim, M. (2016). Implication of the whitefly Bemisia tabaci cyclophilin B protein in the transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Frontiers in Plant Science*, 7(11), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01702>

Kassanis, B. (1952). Some Effects of High Temperature on the Susceptibility of Plants To Infection With Viruses. *Annals of Applied Biology*, 39(3), 358–369. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb01018.x>

Khan, A., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: An example of Paecilomyces formosus LHL10. *BMC Microbiology*, 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-3>

Khan, A., Pan, X., Najeeb, U., Tan, D. K. Y., Fahad, S., Zahoor, R., & Luo, H. (2018). Coping with drought: Stress and adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plant stress resilience and fitness. *Biological Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0198-z>

Kheyr-Pour, A., Bananej, K., Dafalla, G. A., Caciagli, P., Noris, E., Ahoonmanesh, A., Lecoq, H., & Gronenborn, B. (2000). Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology*, 90(6), 629–635. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.6.629>

Kido, K., Tanaka, C., Mochizuki, T., Kubota, K., Ohki, T., Ohnishi, J., Knight, L.M., Tsuda, S. (2008). High temperatures activate local viral multiplication and cell-to-cell movement of Melon necrotic spot virus but restrict expression of systemic symptoms. *Phytopathology*, 98(2), 181–186. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-2-0181>

Kim, S. Y., Seo, M., Bressan, R. A., Yun, D., & Hwang, I. (2012). A Vacuolar b - Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid

Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(5), 2184–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095935>

- Kissoudis, C., Sunarti, S., Van De Wiel, C., Visser, R. G. F., Van Der Linden, C. G., & Bai, Y. (2016). Responses to combined abiotic and biotic stress in tomato are governed by stress intensity and resistance mechanism. *Journal of Experimental Botany*, 67(17), 5119–5132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw285>
- Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A., & Hattori, T. (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *The Plant Journal*, 44(6), 939–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02583.x>
- Koini, M. A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C. A., Harberd, N. P., Whitlam, G. C., & Franklin, K. A. (2009). High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*, 19(5), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.046>
- Koo, Y. M., Heo, A. Y., & Choi, H. W. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *Plant Pathology Journal*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.12.2019.0295>
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E., & Scharf, K. D. (2007). Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(3), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.011>
- Krapp, S., Schuy, C., Greiner, E., Stephan, I., Alberter, B., Funk, C., Marschall, M., Wege, C., Bailer, S. M., Kleinow, T., & Krenz, B. (2017). Begomoviral movement protein effects in human and plant cells: Towards new potential interaction partners. *Viruses*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/v9110334>
- Krenz, B., Jeske, H., & Kleinow, T. (2012). The induction of stromule formation by a plant DNA-virus in epidermal leaf tissues suggests a novel intra- and intercellular macromolecular trafficking route. *Frontiers in Plant Science*, 3(12), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00291>
- Krenz, B., Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H., & Kleinow, T. (2010). A plastid-targeted heat shock cognate 70kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology*, 401(1), 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.011>
- Ku, Y. S., Sintaha, M., Cheung, M. Y., & Lam, H. M. (2018). Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103206>



- Kukreja, S., Nandwal, A. S., Kumar, N., Sharma, S. K., Sharma, S. K., & Unvi, V. (2005). Plant water status, H₂O₂ scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity. *Biologia Plantarum*, *49*(2), 305–308.
- Kumar, S. V., Wigge, P. A., Centre, J. I., Lane, C., & Nr, N. (2010). Mediate the Thermosensory Response in Arabidopsis. *Cell*, *140*(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.006>
- Kunik, T., Palanichelvam, K., Czosnek, H., Citovsky, V., & Gafni, Y. (1998). Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant Journal*, *13*(3), 393–399. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00037.x>
- Lacatus, G., & Sunter, G. (2009). The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology*, *392*(2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.004>
- Lai, J., Chen, H., Teng, K., Zhao, Q., Zhang, Z., Li, Y., Liang, L., & Xia, R. (2009). RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. *The Plant Journal*, *57*, 905–917. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03737.x>
- Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S., & Bäurle, I. (2016). A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *The EMBO Journal*, *35*(2), 162–175.
- Lanza, M., Haro, R., Conchillo, L. B., & Benito, B. (2019). The endophyte *Serendipita indica* reduces the sodium content of Arabidopsis plants exposed to salt stress: fungal ENA ATPases are expressed and regulated at high pH and during plant co-cultivation in salinity. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14619>
- Larkindale, J., & Knight, M. R. (2002). Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in Arabidopsis Involves Calcium, Abscisic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid. *Plant Physiology*, *128*(12), 682–695. <https://doi.org/10.1104/pp.010320.682>
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R., & Vierling, E. (2005). Heat Stress Phenotypes of Arabidopsis Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition. *Plant Physiology*, *138*(6), 882–897. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062257.882>
- Latham, J. R., Saunders, K., Pinner, M. S., & Stanley, J. (1997). Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *Plant Journal*, *11*(6), 1273–1283). <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061273.x>
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., & Gronenborn, B. (1995). Geminivirus replication: Genetic and biochemical

characterization of rep protein function, a review. *Biochimie*, 77(10), 765–773. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88194-6](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88194-6)

- Lazarowitz, S. G., & Beachy, R. N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *Plant Cell*, 11(4), 535–548. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.535>
- Lazarowitz, S. G., Wu, L. C., Rogers, S. G., & Elmer, J. S. (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell*, 4(7), 799–809. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.7.799>
- Lee, K. H., Piao, H. L., Kim, H., Choi, S. M., Jiang, F., Hartung, W., Hwang, I., Kwak, J. M., Lee, I., & Hwang, I. (2006). Activation of Glucosidase via Stress- Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell*, 126, 1109–1120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.034>
- Lefevre, H., Bauters, L., & Gheysen, G. (2020). Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11(4), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>
- Legg, J. Q., & Fauquet, C. M. (2004). Cassava mosaic geminiviruses. *Plant Molecular Biology*, 56(4), 585–599.
- Legris, M., Klose, C., Burgie, E. S., Rojas, C. C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P. A., & Vierstra, R. D. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 354(6314), 897–900.
- Lei, G., Shen, M., Li, Z., Zhang, B. O., Duan, K., Wang, N., Cao, Y., Zhang, W., Ma, B., Ling, H., Chen, S., & Zhang, J. (2011). EIN2 regulates salt stress response and interacts with a MA3 domain-containing protein ECIP1 in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment*, 34, 1678–1692. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02363.x>
- Leonhardt, N., Droillard, M., Reiter, I., Montillet, J., Genty, B., Nussaume, L., Noe, L. D., & Laurie, C. (2011). The Cytosolic / Nuclear HSC70 and HSP90 Molecular Chaperones Are Important for Stomatal Closure and Modulate Abscisic Acid-Dependent Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 156, 1481–1492. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174425>
- Lesk, C., Rowhani, P., & Ramankutty, N. (2016). Influence of extreme weather disasters on global crop production. *Nature*, 529(7584), 84–87. <https://doi.org/10.1038/nature16467>
- Lewis, J. D., & Lazarowitz, S. G. (2010). *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2491–2496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909080107>

- Li, B., Ferreira, M. A., Huang, M., Camargos, L. F., Yu, X., Teixeira, R. M., Carpinetti, P. A., Mendes, G. C., Gouveia-Mageste, B. C., Liu, C., Pontes, C. S. L., Brustolini, O. J. B., Martins, L. G. C., Melo, B. P., Duarte, C. E. M., Shan, L., He, P., & Fontes, E. P. B. (2019). The receptor-like kinase NIK1 targets FLS2/BAK1 immune complex and inversely modulates antiviral and antibacterial immunity. *Nature Communications*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12847-6>
- Li, B., Gao, K., Ren, H., & Tang, W. (2018). Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(9). <https://doi.org/10.1111/jipb.12701>
- Li, H., Liu, S., Yi, C., Wang, F., Zhou, J., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., & Yu, J. (2014b). Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants. *Plant, Cell and Environment*, *37*, 2768–2780. <https://doi.org/10.1111/pce.12360>
- Li, K., Wu, G., Li, M., Ma, M., Du, J., Sun, M., Sun, X., & Qing, L. (2018). Transcriptome analysis of *Nicotiana benthamiana* infected by Tobacco curly shoot virus. *Virology Journal*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1044-1>
- Li, R., Weldegergis, B. T., Li, J., Jung, C., Qu, J., Sun, Y., Qian, H., Tee, C., Van Loon, J. J. A., Dicke, M., Chua, N. H., Liu, S. S., & Ye, J. (2014). Virulence factors of geminivirus interact with MYC2 to subvert plant resistance and promote vector performance. *Plant Cell*, *26*(12), 4991–5008. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133181>
- Li, Shujia, Zhou, X., Chen, L., Huang, W., & Yu, D. (2010). Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress. *Molecules and Cells*, *29*(5), 475–483. <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0059-2>
- Li, Shuxia, Liu, J., Liu, Z., Li, X., Wu, F., & He, Y. (2014a). HEAT-INDUCED TAS1 TARGET1 Mediates Thermotolerance via HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR A1a – Directed Pathways in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *26*(4), 1764–1780. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124883>
- Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., Li, M., An, F., & Guo, H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, *163*(3), 670–683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>
- Li, Y., Li, Y., Liu, Y., Wu, Y., & Xie, Q. (2017). The sHSP22 Heat Shock Protein Requires the ABI1 Protein Phosphatase to Modulate Polar Auxin Transport and Downstream Responses. *Plant Physiology*, *176*(3), 2406–2425. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01206>

- Lim, E., Doucet, C. J., Hou, B., Jackson, R. G., Abrams, S. R., & Bowles, D. J. (2005). Resolution of (+)-abscisic acid using an Arabidopsis glycosyltransferase. *Tetrahedron: Assymetry*, *16*, 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.11.062>
- Lin, H., Yang, Y., Quan, R., Mendoza, I., Wu, Y., Du, W., Zhao, S., Schumaker, K. S., Pardo, J. M., & Guo, Y. (2009). Phosphorylation of SOS3-like calcium binding protein8 by SOS2 protein kinase stabilizes their protein complex and regulates salt tolerance in *arabidopsis*. *Plant Cell*, *21*(5), 1607–1619. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.066217>
- Lindsay, D. W., & Gudauskas, R. T. (1974). Effects of Maize Dwarf Mosaic Virus on water relations of corn. *Phytopathology*, *65*, 434–440.
- Liu, H. C., Liao, H. T., & Charng, Y. Y. (2011). The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, *34*(5), 738–751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02278.x>
- Liu, H., Boulton, M. I., & Davies, J. W. (1997). Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. *Journal of General Virology*, *78*(6), 1265–1270. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-6-1265>
- Liu, H., Boulton, M. I., Oparka, K. J., & Davies, J. W. (2001). Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: Implications for the transport of viral DNA. *Journal of General Virology*, *82*(1), 35–44. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-1-35>
- Liu, H., Boulton, M. I., Thomas, C. L., Prior, D. A. M., Oparka, K. J., & Davies, J. W. (1999). Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *12*(10), 894–900. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.10.894>
- Liu, H., Gao, F., Li, G., Han, J., & Zhou, R. (2008). The calmodulin-binding protein kinase 3 is part of heat-shock signal transduction in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, *55*, 760–773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03544.x>
- Liu, H., Li, G., Chang, H. U. I., Sun, D., Zhou, R., & Li, B. (2007). Calmodulin-binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in Arabidopsis. *Plant, Cell and Enviroment*, *30*, 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01613.x>
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Cheol-Soo, K., & Zhu, J. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3730–3734. <https://doi.org/10.1073/pnas.060034197>

- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., & Yamaguchi-shinozaki, K. (1998). Two Transcription Factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA Binding Domain Separate Two Cellular Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 10(8), 1391–1406. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.8.1391>
- Lizárraga, A., Ascasíbar, J., & González, M. L. (2017). Fast and Effective Thermotherapy Treatment for In Vitro Virus Eradication in Apple and Pear Trees. *American Journal of Plant Sciences*, 8(10), 2474–2482. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.810168>
- Llamas-Llamas M.E., Zavaleta-Mejia E., Gonzalez-Hernandez V.A., Cervantez-Diaz L., Santizo-Rincon J.A., O.-M. D. L. (1998). Effect of temperature on symptom expression of tomato spotted wilt virus in cucumber and *Nicotiana glutinosa*. *Plant Pathology*, 47, 341–347. <https://doi.org/10.4241/kyubyochu.34.21>
- Lobell, D. B., Schlenker, W., & Costa-Roberts, J. (2011). Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. *Science*, 333(7), 616–621.
- Lorrain, S., Allen, T., Duek, P. D., Whitelam, G. C., & Fankhauser, C. (2008). Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant Journal*, 53(2), 312–323. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03341.x>
- Louis, B., & Rey, C. (2015). Resistance gene analogs involved in tolerant cassava–geminivirus interaction that shows a recovery phenotype. *Virus Genes*, 51(3), 393–407. <https://doi.org/10.1007/s11262-015-1246-1>
- Lozano, G., Trenado, H. P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R. W., & Navas-castillo, J. (2016). Characterization of Non-coding DNA Satellites Associated with Sweepviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) – Definition of a Distinct Class of Begomovirus-Associated Satellites. *Frontiers in Microbiology*, 7(2), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>
- Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A. P., Taconnat, L., Xing, W. D., & Bejarano, E. R. (2011). Geminiviruses Subvert Ubiquitination by Altering CSN-Mediated Derubylation of SCF E3 Ligase Complexes and Inhibit Jasmonate Signaling in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, 23(3), 1014–1032. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080267>
- Luna, A. P., & Lozano-Durán, R. (2020). Geminivirus-Encoded Proteins: Not All Positional Homologs Are Made Equal. *Frontiers in Microbiology*, 11(5), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00878>
- Luna, A. P., Morilla, G., Voinnet, O., & Bejarano, E. R. (2012). Functional Analysis of Gene-Silencing Suppressors from Tomato Yellow Leaf Curl Disease

Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1294–1306.

- Luna, A. P., Rodríguez-Negrete, E. A., Morilla, G., Wang, L., Lozano-Durán, R., Castillo, A. G., & Bejarano, E. R. (2017). V2 from a curtovirus is a suppressor of post-transcriptional gene silencing. *Journal of General Virology*, 98(10), 2607–2614. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000933>
- Luna, A. P., Romero-Rodríguez, B., Rosas-Díaz, T., Cerero, L., Rodríguez-Negrete, E. A., Castillo, A. G., & Bejarano, E. R. (2020). Characterization of Curtovirus V2 Protein, a Functional Homolog of Begomovirus V2. *Frontiers in Plant Science*, 11(6), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00835>
- Luque, A., Sanz-Burgos, A. P., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M., & Gutierrez, C. (2002). Interaction of geminivirus rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology*, 302(1), 83–94. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1599>
- Ma, L., Huang, X., Yu, R., Jing, X. L., Xu, J., Wu, C. A., Zhu, C. X., & Liu, H. M. (2016). Elevated ambient temperature differentially affects virus resistance in two tobacco species. *Phytopathology*, 106(1), 94–100. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-14-0300-R>
- Ma, Yanlin, Cao, J., He, J., Chen, Q., Li, X., & Yang, Y. (2018). Molecular Mechanism for the Regulation of ABA Homeostasis During Plant Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 1, 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms19113643>
- Ma, Yue, Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Chistmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*, 209(5).
- Macho, A. P., & Lozano-Duran, R. (2019). Molecular dialogues between viruses and receptor-like kinases in plants. *Molecular Plant Pathology*, 20(9), 1191–1195. <https://doi.org/10.1111/mpp.12812>
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444, 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Makarova, S., Makhotenko, A., Spechenkova, N., Love, A. J., Kalinina, N. O., & Taliansky, M. (2018). Interactive Responses of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plants to Heat Stress and Infection with Potato Virus Y. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02582>
- McKinney, E. C., & Meagher, R. B. (1998). Members of the Arabidopsis actin gene family are widely dispersed in the genome. *Genetics*, 149(2), 663–675. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.2.663>

- Malmstrom, C. M., Melcher, U., & Bosque-Pérez, N. A. (2011). The expanding field of plant virus ecology: Historical foundations , knowledge gaps , and research directions. *Virus Research*, 159(2), 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.010>
- Mansoor, S., Khan, S. H., Bashir, A., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K. A., Briddon, R., Stanley, J., & Markham, P. G. (1999). Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology*, 259(1), 190–199. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9766>
- Mariano, A. C., Andrade, M. O., Santos, A. A., Carolino, S. M. B., Oliveira, M. L., Baracat-Pereira, M. C., Brommonshenkel, S. H., & Fontes, E. P. B. (2004). Identification of a novel receptor-like protein kinase that interacts with a geminivirus nuclear shuttle protein. *Virology*, 318(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.09.038>
- Martins, L. G. C., Raimundo, G. A. S., Ribeiro, N. G. A., Silva, J. C. F., Euclides, N. C., Loriato, V. A. P., Duarte, C. E. M., & Fontes, E. P. B. (2020). A Begomovirus Nuclear Shuttle Protein-Interacting Immune Hub: Hijacking Host Transport Activities and Suppressing Incompatible Functions. *Frontiers in Plant Science*, 11(4), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00398>
- Mason G., Caciagli P., Accotto G.P., Noris E. (2008) Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in Bemisia tabaci. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 282-289
- Mastouri, F., Björkman, T., & Harman, G. E. (2010). Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*, 100(11), 1213–1221. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0091>
- Matschi, S., Geiger, D., Scherzer, S., Hedrich, R., Mumm, P., Romeis, T., Al-Rasheid, K. A. S., Bauer, H., Liese, A., Ache, P., Stange, A., & Marten, I. (2009). Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21425–21430. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912021106>
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>
- McGarry, R. C., Barron, Y. D., Carvalho, M. F., Hill, J. E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W. L., & Lazarowitz, S. G. (2003). A novel Arabidopsis acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell*, 15(7), 1605–1618. <https://doi.org/10.1105/tpc.012120>

- McLaughlin, M. R., & Windham, G. L. (1996). Effects of Peanut Stunt Virus, *Meloidogyne incognita*, and drought on growth and persistence of white clover. *Phytopathology*, *86*, 1105–1111.
- Medina-Puche, L., Tan, H., Dogra, V., Wu, M., Rosas-Diaz, T., Wang, L., Ding, X., Zhang, D., Fu, X., Kim, C., & Lozano-Duran, R. (2020). A Defense Pathway Linking Plasma Membrane and Chloroplasts and Co-opted by Pathogens. *Cell*, *182*(5), 1109-1124.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.020>
- Mehrabi, Z., & Ramankutty, N. (2017). The cost of heat waves and droughts for global crop production. *BioRxiv*, 1–8.
- Mei, Y., Wang, Y., Hu, T., Yang, X., Lozano-Duran, R., Sunter, G., & Zhou, X. (2018a). Nucleocytoplasmic Shuttling of Geminivirus C4 Protein Mediated by Phosphorylation and Myristoylation Is Critical for Viral Pathogenicity. *Molecular Plant*, *11*(12), 1466–1481. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.004>
- Mei, Y., Yang, X., Huang, C., Zhang, X., & Zhou, X. (2018b). Tomato leaf curl Yunnan virus-encoded C4 induces cell division through enhancing stability of Cyclin D 1.1 via impairing NbSK η -mediated phosphorylation in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathogens*, *14*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006789>
- Merchante, C., Brumos, J., Yun, J., Hu, Q., Spencer, K. R., Enríquez, P., Binder, B. M., Heber, S., Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2015). Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell*, *163*(3), 684–697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.036>
- Merilo, E., Jalakas, P., Laanemets, K., Mohammadi, O., Horak, H., Kollist, H., & Brosché, M. (2015). Abscisic Acid Transport and Homeostasis in the Context of Stomatal Regulation. *Molecular Plant*, *8*(9), 1321–1333. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.06.006>
- Michalakis, Y., Olivieri, I., Renaud, F., & Raymond, M. (1992). Pleiotropic action of parasites: How to be good for the host. *Trends in Ecology and Evolution*, *7*(2), 59–62. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90108-N](https://doi.org/10.1016/0169-5347(92)90108-N)
- Miller, M. J., Barrett-Wilt, G. A., Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2010). Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(38), 16512–16517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004181107>
- Mills-lujan, K., & Deom, C. M. (2010). Geminivirus C4 protein alters *Arabidopsis* development. *Protoplasma*, *239*, 95–110. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0086-z>

- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1), 64–70. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133090>
- Mittler, R., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2012). How do plants feel the heat? *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.007>
- Mizoi, J., Kanazawa, N., Kidokoro, S., Takahashi, F., Qin, F., Morimoto, K., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2019). Heat-induced inhibition of phosphorylation of the stress-protective transcription factor DREB2A promotes thermotolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(3), 902–917. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002662>
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.08.004>
- Mohr, P. G., & Cahill, D. M. (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology*, 30, 461–469.
- Moldakimova, N. A., Mukiyanova, G. S., Yarmolinsky, D. G., Brychkova, G. G., Scholthof, H. B., Sagi, M., & Omarov, R. T. (2012). Effect of salinity on viral disease spread in plants. *Journal Of Stress Physiology & Biochemistry*, 8, 2012.
- Morgan, P. W., & Drew, M. C. (1997). Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 620–630. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000325.x>
- Morilla, G., Jeske, H., Bejarano, E. R., & Wege, C. (2004). Te`te a`Te`te of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus in Single Nuclei. *Journal of Virology*, 78(19), 10715–10723. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10715>
- Morin, S., Ghanim, M., Zeidan, M., Czosnek, H., Verbeek, M., & Van Den Heuvel, J. F. J. M. (1999). A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 256(1), 75–84. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9631>
- Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, 71(1–2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00193-3)
- Morris-Krsinich, A. M., Mullineaux, P. M., Donson, J., Boulton, M. I., Markham, P. G., Short, M. N., & Davies, J. W. (1985). Bidirectional transcription of maize

streak virus DNA and identification of the coat protein gene. *Nucleic Acids Research*, 12(21), 8235–8251.

- Mullineaux, P. M., Boulton, M. I., Bowyer, P., van der Vlugt, R., Marks, M., Donson, J., & Davies, J. W. (1988). Detection of a non-structural protein of Mr 11 000 encoded by the virion DNA of maize streak virus. *Plant Molecular Biology*, 11(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF00016014>
- Munns, R., & Termaat, A. (1986). Whole-plant responses to salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13(1), 143–160. <https://doi.org/10.1071/PP9860143>
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Murray, R. R., Emblow, M. S. M., Hetherington, A. M., & Foster, G. D. (2016). Plant virus infections control stomatal development. *Scientific Reports*, 6, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep34507>
- Nagar, S., Hanley-Bowdoin, L., & Robertson, D. (2002). Host DNA replication is induced by geminivirus infection of differentiated plant cells. *Plant Cell*, 14(12), 2995–3007. <https://doi.org/10.1105/tpc.005777>
- Nancarrow, N., Constable, F. E., Finlay, K. J., Freeman, A. J., Rodoni, B. C., Trebicki, P., Vassiliadis, S., Yen, A.L., Luck, J. E. (2014). The effect of elevated temperature on barley yellow dwarf virus-PAV in wheat. *Virus Research*, 186, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.023>
- Nancarrow, N., Constable, F. E., Finlay, K. J., Freeman, A. J., Rodoni, B. C., Trebicki, P., Vassiliadis, S., Yen, A. L., & Luck, J. E. (2014). The effect of elevated temperature on barley yellow dwarf virus-PAV in wheat. *Virus Research*, 186, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.023>
- Naqvi, A. R., Sarwat, M., Pradhan, B., Choudhury, N. R., Haq, Q. M. R., & Mukherjee, S. K. (2011). Differential expression analyses of host genes involved in systemic infection of Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV). *Virus Research*, 160(1–2), 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.002>
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual review of phytopathology*, 49, 219-248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>
- Navot, N., Pichersky, E., Zeidan, M., Zamir, D., & Czosnek, H. (1991). Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single



genomic component. *Virology*, 185(1), 151–161.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1926771>

- Nawaz-ul-Rehman, M. S., Nahid, N., Mansoor, S., Briddon, R. W., & Fauquet, C. M. (2010). Post-transcriptional gene silencing suppressor activity of two non-pathogenic alphasatellites associated with a begomovirus. *Virology*, 405(2), 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.024>
- Noris, E., Vaira, A. M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B., & Accotto, G. P. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *Journal of Virology*, 72(12), 10050–10057. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811744><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC110531>
- Nostar, O., Ozdemir, F., Bor, M., Turkan, I., & Tosun, N. (2013). Combined effects of salt stress and cucurbit downy mildew (*Pseudoperospora cubensis* Berk. and Curt. Rostov.) infection on growth, physiological traits and antioxidant activity in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 83, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.05.004>
- Noueiry, A. O., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell*, 76(5), 925–932. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90366-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90366-2)
- Nxele, X., Klein, A., & Ndimba, B. K. (2017). Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. *South African Journal of Botany*, 108, 261–266. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.003>
- Obreępalska-Stęplowska, A., Renaut, J., Planchon, S., Przybylska, A., Wieczorek, P., Barylski, J., & Palukaitis, P. (2015). Effect of temperature on the pathogenesis, accumulation of viral and satellite RNAs and on plant proteome in peanut stunt virus and satellite RNA-infected plants. *Frontiers in Plant Science*, 6(10), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00903>
- Ogwok, E., Patil, B. L., Alicai, T., & Fauquet, C. M. (2010). Transmission studies with Cassava brown streak Uganda virus (Potyviridae: Ipomovirus) and its interaction with abiotic and biotic factors in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virological Methods*, 169, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.030>
- Ohama, N., Kusakabe, K., Mizoi, J., Zhao, H., Kidokoro, S., & Koizumi, S. (2016). The Transcriptional Cascade in the Heat Stress Response of *Arabidopsis* Is Strictly Regulated at the Level of Transcription Factor Expression. *The Plant Cell*, 28(11), 181–201. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00435>

- Ohama, N., Sato, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-shinozaki, K. (2017). Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response. *Trends in Plant Science*, 22(1), 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.015>
- Olson, A. J., Pataky, J. K., D'Arcy, C. J., & Ford, R. E. (1990). Effects of drought stress and infection by Maize Dwarf Mosaic Virus on Sweet Corn. *Plant Disease*, 74, 147-151.
- Orozco, B. M., & Hanley-Bowdoin, L. (1996). A DNA structure is required for geminivirus replication origin function. *Journal of Virology*, 70(1), 148–158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8523519><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC189799>
- Orozco, B. M., Gladfelter, H. J., Settlege, S. B., Eagle, P. A., Gentry, R. N., & Hanley-Bowdoin, L. (1998). Multiple cis elements contribute to geminivirus origin function. *Virology*, 242(2), 346–356. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.9013>
- Osei, M. K., Akromah, R., Lamptey, J. N. L., & Quain, M. D. (2012). Phenotypic and molecular screening of tomato germplasm for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *African Journal of Agricultural Research*, 7(33), 4675–4684. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.672>
- Padidam, M., Beachy, R. N., & Fauquet, C. M. (1996). The role of AV2 ('precoat') and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology*, 224(2), 390–404. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0546>
- Pakkianathan, B. C., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Mahadav, A., Zeidan, M., Czosnek, H., & Ghanim, M. (2015). Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, Bemisia tabaci. *Journal of Virology*, 89(19), 9791–9803. <https://doi.org/10.1128/jvi.00779-15>
- Pan, L. L., Chi, Y., Liu, C., Fan, Y. Y., & Liu, S. S. (2020). Mutations in the coat protein of a begomovirus result in altered transmission by different species of whitefly vectors. *Virus Evolution*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa014>
- Pan, L., Chen, Q., Guo, T., Wang, X., Li, P., Wang, X., & Liu, S. (2018). Differential efficiency of a begomovirus to cross the midgut of different species of whiteflies results in variation of virus transmission by the vectors. *Science China Life Sciences*, 61(10), 1254–1265. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9283-4>
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056–4075. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3739-1>

- Park, C. Y., Lee, J. H., Yoo, J. H., Moon, B. C., Choi, M. S., Kang, Y. H., Lee, S. M., Kim, H. S., Kang, K. Y., Chung, W. S., Lim, C. O., & Cho, M. J. (2005). WRKY group IId transcription factors interact with calmodulin. *FEBS Letters*, *579*(6), 1545–1550. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.057>
- Pascal, E., Sanderfoot, A. A., Ward, B. M., Medville, R., Turgeon, R., & Lazarowitz, S. G. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes the cell nucleus. *Plant Cell*, *6*(7), 995–1006. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.7.995>
- Passioura, J. B., & Munns, R. (1984). Hydraulic Resistance of Plants. *Plant Physiology*, *11*(1), 341–350.
- Patil, B. L., & Fauquet, C. M. (2015). Light intensity and temperature affect systemic spread of silencing signal in transient agroinfiltration studies. *Molecular Plant Pathology*, *16*(5), 484–494. <https://doi.org/10.1111/mpp.12205>
- Peng, J., Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., & Zhu, H. (2014). Salt-Induced Stabilization of EIN3 / EIL1 Confers Salinity Tolerance by Deterring ROS Accumulation in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004664>
- Pierce, E. J., & Rey, M. E. C. (2013). Assessing Global Transcriptome Changes in Response to South African Cassava Mosaic Virus [ZA-99] Infection in Susceptible Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067534>
- Pitaksutheepong, C., Vimolrat, A., Nathwong, B., & Attathom, S. (2007). The N-terminal 62 amino acid residues of the coat protein of Tomato yellow leaf curl Thailand virus are responsible for DNA binding. *Journal of General Plant Pathology*, *73*(1), 72–75. <https://doi.org/10.1007/s10327-006-0317-5>
- Pooggin, M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing? *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 15233–15259. <https://doi.org/10.3390/ijms140815233>
- Pooma, W., Gillette, W. K., Jeffrey, J. L., & Petty, I. T. D. (1996). Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*, *218*(1), 264–268. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0189>
- Popova, O. V., Dinh, H. Q., Aufsatz, W., & Jonak, C. (2013). The RdDM Pathway Is Required for Basal Heat Tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *6*(2), 396–410. <https://doi.org/10.1093/mp/sst023>
- Prasad, A., Sharma, N., Hari-Gowthem, G., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2020). Tomato Yellow Leaf Curl Virus: Impact, Challenges, and

Management. *Trends in Plant Science*, 25(9), 897–911. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.015>

- Prasch, C. M., & Sonnewald, U. (2013). Simultaneous Application of Heat , Drought , and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks All use subject to JSTOR Terms and Conditions Simultaneous Arabidopsis Signaling and Virus of Heat , Drought , Application Shifts. *Plant Physiology*, 162(4), 1849–1866. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221044>
- Prigigallo, M. I., Stabolone, L., Carluccio, A. V., Rosas-Diaz, T., & Lozano-Duran, R. (2018). S-acylation mediates Mungbean yellow mosaic virus AC4 localization to the plasma membrane and in turns gene silencing suppression. *PLOS Pathogens*, 14(8), e1007207. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007207>
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745–760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3120>
- Pye, M. F., Dye, S. M., Resende, R. S., MacDonald, J. D., & Bostock, R. M. (2018). Abscisic acid as a dominant signal in tomato during salt stress predisposition to phytophthora root and crown rot. *Frontiers in Plant Science*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00525>
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P., & Ecker, J. R. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-Tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 338(6105), 390–393. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Qin, F., Sakuma, Y., Tran, L.-S. P., Maruyama, K., Kidokoro, S., Fujita, Y., Fujita, M., Umezawa, T., Sawano, Y., Miyazono, K., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008). Arabidopsis DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell Online*, 20(6), 1693–1707. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057380>
- Qin, S., Feng, W. W., Zhang, Y. J., Wang, T. T., Xiong, Y. W., & Xing, K. (2018). Diversity of bacterial microbiota of coastal halophyte *Limonium sinense* and amelioration of salinity stress damage by symbiotic plant growthpromoting actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-18>
- Qin, X., & Zeevaart, J. A. D. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proceedings of National Academy of Science*. 96(26): 15354-15361

- Qiu, Q.-S., Guo, Y., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Schumaker, K. S., & Zhu, J.-K. (2004). Regulation of Vacuolar Na⁺/H⁺ Exchange in *Arabidopsis thaliana* by the Salt-Overly-Sensitive (SOS) Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 207–215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307982200>
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T. E., & Morris, T. J. (2005). RDR6 Has a Broad-Spectrum but Temperature-Dependent Antiviral Defense Role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology*, 79(24), 15209–15217. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15209>
- Quan, R., Lin, H., Mendoza, I., Zhang, Y., Cao, W., Yang, Y., Shang, M., Chen, S., Pardo, J. M., & Guo, Y. (2007). SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell*, 19(4), 1415–1431. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042291>
- Quintero, F. J., Martinez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.-Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.-J., Zhu, J.-K., & Pardo, J. M. (2011). Activation of the plasma membrane Na/H antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2611–2616. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018921108>
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2008). Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, 82(18), 8997–9007. <https://doi.org/10.1128/jvi.00719-08>
- Raja, P., Wolf, J. N., & Bisaro, D. M. (2010). RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.004>
- Rajendran, K., Tester, M., & Roy, S. J. (2009). Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 32(3), 237–249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01916.x>
- Rao, N. K. S., Laxman, R. H., & Shivashankara, K. S. (2016). *Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2725-0_1
- Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., & Kumar, J. (2011). Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. *Plant and Soil*, 347(1), 387–400. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0858-z>
- Reid, F. P. C., Fischer, A. C., Lewis-brown, E., Meredith, M. P., Andersson, A. J., Antia, A., Bates, N. R., Bathmann, U., Brix, H., Dye, S., Edwards, M., Furevik, T., Gangstø, R., Hopcroft, R. R., Kendall, M., Kasten, S., Keeling, R., Quéré, C. Le, Mackenzie, T., Malin, G., Mauritzen, C., Ólafsson, J.,

Paull, C., Rignot, E., Shimada, K., Vogt, M., Wallace, C., Wangz, Z., Washington, R. (2009). Impacts of the Oceans on Climate Change. *Advances in Marine Biology* 56(12). [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(09\)56001-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(09)56001-4)

- Reindl, A., Schoffl, F., Koncz, C., Bakó, L., Tübingen, U., Institut, B., Genetik, A., Morgenstelle, A. Der, Pflanzenzüchtung, D., Koln, D.-, & Germany, J. S. (1997). Phosphorylation by a Cyclin-Dependent Kinase Modulates DNA Binding of the Arabidopsis Heat-Shock Transcription Factor HSFI in Vitro '. *Plant Physiology*, 115:93-100
- Reis, R. R., Andrade Dias Brito da Cunha, B., Martins, P. K., Martins, M. T. B., Alekcevetch, J. C., Chalfun-Júnior, A. Ô., Andrade, A. C., Ribeiro, A. P., Qin, F., Mizoi, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Nakashima, K., Carvalho, J. de F. C., de Sousa, C. A. Ô. F., Nepomuceno, A. L., Kobayashi, A. K., & Molinari, H. B. C. (2014). Induced over-expression of AtDREB2A CA improves drought tolerance in sugarcane. *Plant Science*, 221–222. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.003>
- Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., Polle, A., Lipka, V., & Teichmann, T. (2012). Verticillium infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24(9), 3823–3837. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103374>
- Rhein, M., Rintoul, S. R., Aoki, S., Campos, E., Chambiers, D., Feely, R. A., Gulev, S., Johnson, G. C., Josey, S. A., Kostianoy, A., Mauritzen, C., Roemmich, D., Talley, L. D., & WANG, F. (2013). Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. *Ocean* 13(4), 655–713). <https://doi.org/10.1007/s11802-014-2206-4>
- Rigden, J. E., Dry, I. B., Mullineaux, P. M., & Rezaian, M. A. (1993). Mutagenesis of the virion-sense open reading frames of tomato leaf curl geminivirus. In *Virology*, 193(2), 1001–1005. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1215>
- Riyazuddin, R., Verma, R., Singh, K., Nisha, N., Keisham, M., Bhati, K. K., Kim, S. T., & Gupta, R. (2020). Ethylene: A master regulator of salinity stress tolerance in plants. *Biomolecules*, 10(6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/biom10060959>
- Rock, C. D., & Zeevaart, J. A. N. A. D. (1991). The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proceedings of National Academy of Science*, 88(9), 7496-7499.
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y.O., Redman, R. S. (2008). Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME Journal*, 2(4), 404–416. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.106>

- Rodríguez-Negrete, E., Lozano-Durán, R., Piedra-Aguilera, A., Cruzado, L., Bejarano, E. R., & Castillo, A. G. (2013). Geminivirus Rep protein interferes with the plant DNA methylation machinery and suppresses transcriptional gene silencing. *New Phytologist*, *199*, 464–475.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-ca, B., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2001). Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology*, *125*, 110–125. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1194>
- Rojas, M. R., Noueir, A. O., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (1998). Bean dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell*, *95*(1), 105–113. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81786-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81786-9)
- Roossinck, M. J. (1991). Temperature-sensitive replication of cucumber mosaic virus in muskmelon (*Cucumis melo* cv. Iroquois), maps to RNA 1 of a slow strain. *Journal of General Virology*, *72*, 1747–1750.
- Roossinck, M. J. (2011). The good viruses: Viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *9*, 99-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2491>
- Roossinck, M. J. (2015). Move Over, Bacteria! Viruses Make Their Mark as Mutualistic Microbial Symbionts. *Journal of Virology*, *89*(13), 6532–6535. <https://doi.org/10.1128/jvi.02974-14>
- Roossinck, M. J., & Bazán, E. R. (2017). Symbiosis: Viruses as Intimate Partners. *Annual Review of Virology*, *4*(1), 123–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042323>
- Rosas-Díaz, T., Macho P, A., Beuzón R, C., Lozano-Durán, R., & Bejarano, E. R. (2016). The C2 Protein from Geminivirus Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus Decreases Sensivity to Jasmonates and Supresses Jasmonate-Mediated Defences. *Plants*, *5*(8). <https://doi.org/10.3390/plants5010008>
- Rosas-Diaz, T., Zhang, D., Fan, P., Wang, L., Ding, X., Jiang, Y., Jimenez-Gongora, T., Medina-Puche, L., Zhao, X., Feng, Z., Zhang, G., Liu, X., Bejarano, E. R., Tan, L., Zhang, H., Zhu, J. K., Xing, W., Faulkner, C., Nagawa, S., & Lozano-Duran, R. (2018). A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(6), 1388–1393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715556115>

- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B. A., Santana-Magal, N., Elimelech, M., Kontsedalov, S., Lebedev, G., Cilia, M., & Ghanim, M. (2015). Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion in Virology*, *15*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.008>
- Rouhier, N., & Jacquot, J.-P. (2008). An increasingly scented world. *New Phytologist*, *180*, 735–750.
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>
- Rybicki, E. P. (2015). A Top Ten list for economically important plant viruses. *Archives of Virology*, *160*(1), 17–20. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2295-9>
- Saeed, M., Krczal, G., & Wassenegger, M. (2014). Three gene products of a begomovirus–betasatellite complex restore expression of a transcriptionally silenced green fluorescent protein transgene in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Genes*, *50*(2), 340–344. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1155-8>
- Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y. G., Maathuis, F. J. M., & Goloubinoff, P. (2009). The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *The Plant Cell*, *21*(7), 2829–2843. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065318>
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., & Ohta, D. (2004). Arabidopsis CYP707As Encode (1)-Abscisic Acid 8 9 -Hydroxylase , a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid 1. *Plant Physiology*, *134*(4), 1439–1449. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037614.1>
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006a). Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(49), 18822–18827. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605639103>
- Sakuma, Yoh, Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b). Functional Analysis of an Arabidopsis Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell Online*, *18*(5), 1292–1309. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035881>
- Sambrook, J. & D. W. Russell. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.

- Sánchez-Montesinos, B., Diáñez, F., Moreno-Gavira, A., Gea, F. J., & Santos, M. (2019). Plant growth promotion and biocontrol of *Pythium ultimum* by saline tolerant trichoderma isolates under salinity stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph16112053>
- Sanderfoot, A. A., & Lazarowitz, S. G. (1995). Cooperation in viral movement: The geminivirus BL1 movement protein interacts with BR1 and redirects it from the nucleus to the cell periphery. *Plant Cell*, 7(8), 1185–1194. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.8.1185>
- Sanderfoot, A. A., Ingham, D. J., & Lazarowitz, S. G. (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle: The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiology*, 110(1), 23–33. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.23>
- Sangwan, V., Lárus Orvar, B., Beyerly, J., Hirt, H., & Dhindsa, R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*, 31, 629–638.
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S., Jamin, M., Cutler, S. R., Ma, A., & Rodriguez, P. L. (2009a). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, 462(12), 665–669. <https://doi.org/10.1038/nature08591>
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S., Jamin, M., Cutler, S. R., Ma, A., & Rodriguez, P. L. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, 462(12), 665–669. <https://doi.org/10.1038/nature08591>
- Santiago, J., Rodrigues, A., Saez, A., Rubio, S., Antoni, R., Dupeux, F., Park, S., & Ma, A. (2009b). Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs. *The Plant Journal*, 60, 575–588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03981.x>
- Saunders, K., & Stanley, J. (1995). Complementation of African cassava mosaic virus AC2 gene function in a mixed bipartite geminivirus infection. *Journal of General Virology*, 76(9), 2287–2292. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2287>
- Saunders, K., Lucy, A., & Stanley, J. (1992). RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Research*, 20(23), 6311–6315. <https://doi.org/10.1093/nar/20.23.6311>
- Schuster, R. C. S. (2010). Sumoylation of Arabidopsis heat shock factor A2 (HsfA2) modifies its activity during acquired thermotolerance. *Plant Molecular Biology*, 2, 33–45. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9652-1>

- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. D., & Mccarty, D. R. (1997). Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science*, 276(6), 1872–1875.
- Seo, J. K., Kim, M. K., Kwak, H. R., Choi, H. S., Nam, M., Choe, J., Choi, B., Han, S. J., Kang, J. H., & Jung, C. (2018). Molecular dissection of distinct symptoms induced by tomato chlorosis virus and tomato yellow leaf curl virus based on comparative transcriptome analysis. *Virology*, 516(8), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.001>
- Seo, M., Peeters, A. J. M., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-poll, A., Zeevaart, J. A. D., Koornneef, M., Kamiya, Y., & Koshiba, T. (2000). The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of National Academy of Sscience*, 3, 12908–12913.
- Settlage, S. B., Miller, A. B., Gruissem, W., & Hanley-bowdoin, L. (2001). Dual Interaction of a Geminivirus Replication Accessory Factor with a Viral Replication Protein and a Plant Cell Cycle Regulator. *Virology*, 576, 570–576. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0719>
- Settlage, S. B., See, R. G., Hanley-bowdoin, L., & Carolina, N. (2005). Geminivirus C3 Protein : Replication Enhancement and Protein Interactions. *Journal of Virology*, 79(15), 9885–9895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9885>
- Sharma, P., & Ikegami, M. (2010). Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology*, 396(1), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.012>
- Shen, X., Wang, Z., Song, X., Xu, J., Jiang, C., Zhao, Y., Ma, C., & Zhang, H. (2014). Transcriptomic profiling revealed an important role of cell wall remodelling and ethylene signaling pathway during salt acclimation in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 86(3), 303–317. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0230-9>
- Shen, Y.-Y., Wang, X.-F., Wu, F.-Q., Du, S.-Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.-L., Peng, C.-C., Yu, X.-C., Zhu, S.-Y., Fan, R.-C., Xu, Y.-H., & Zhang, D.-P. (2006). The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*, 443, 823-826.
- Shepherd, D. N., Martin, D. P., Van Der Walt, E., Dent, K., Varsani, A., & Rybicki, E. P. (2010). Maize streak virus: An old and complex “emerging” pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00568.x>

- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., & Zhu, J.-K. (2002). The putative plasma membrane Na(+)/H(+) antiporter SOS1 controls long-distance Na(+) transport in plants. *The Plant Cell*, *14*(2), 465–477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371.et>
- Shimada-Beltrán, H., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Early and late gene expression in pepper huasteco yellow vein virus. *Journal of General Virology*, *88*, 3145–3153. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83003-0>
- Shinwari, Z. K., Nakashima, K., Miura, S., Kasuga, M., Seki, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature-responsive gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *250*(1), 161–170. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9267>
- Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Trinks, D., Rajeswaran, R., Veluthambi, K., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2005). Promoters, Transcripts, and Regulatory Proteins of Mungbean Yellow Mosaic Geminivirus†. *Journal of Virology*, *79*(13), 8149–8163. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8149>
- Shukla, P. R., Skea, J., Calvo Buendia, E., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H. O., Roberts, D. C., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Portugal Pereira, J., Vyas, P., Huntley, E., Kissick, K., Belkacemi, M., Malley, J. (2019). Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. *IPCC*, *8*(5).
- Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., Yim, W. jong, & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *49*(4), 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.015>
- Silva, C. C., Molina, R. O., Back, L., Oliveira, C. M. G., Frias, A. A. T., Zanutto, C. A., & Nunes, W. M. C. (2019). The effect of drought conditions on sweet orange (*Citrus sinensis*) plants infected with citrus tristeza virus (CTV). *Tropical Plant Pathology*, *44*, 335–342.
- Singh, A., Permar, V., Basavaraj, Tomar, B. S., & Praveen, S. (2018). Effect of temperature on symptoms expression and viral RNA accumulation in groundnut bud necrosis virus infected *Vigna unguiculata*. *Iranian Journal of Biotechnology*, *16*(3), 227–234. <https://doi.org/10.21859/ijb.1846>
- Singh, D. K., Islam, M. N., Choudhury, N. R., Karjee, S., & Mukherjee, S. K. (2007). The 32 kDa subunit of replication protein A (RPA) participates in the DNA replication of Mung bean yellow mosaic India virus (MYMIV) by

interacting with the viral Rep protein. *Nucleic Acids Research*, 35(3), 755–770. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1088>

Singh, D. K., Malik, P. S., Choudhury, N. R., & Mukherjee, S. K. (2008). MYMIV replication initiator protein (Rep): Roles at the initiation and elongation steps of MYMIV DNA replication. *Virology*, 380(1), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.010>

Singh, R. P., Jha, P., & Jha, P. N. (2015). The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 184, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.002>

Sirichandra, C., Gu, D., Hu, H. C., Davanture, M., Lee, S., Djaoui, M., Valot, B., Zivy, M., Leung, J., Merlot, S., & Kwak, J. M. (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters*, 583(18), 2982–2986. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.08.033>

Skliris, N., Zika, J. D., Herold, L., Josey, S. A., & Marsh, R. (2018). Mediterranean sea water budget long-term trend inferred from salinity observations. *Climate Dynamics*, 51(7–8), 2857–2876. <https://doi.org/10.1007/s00382-017-4053-7>

Srivastava, R., Deng, Y., & Howell, S. H. (2014). Stress sensing in plants by an ER stress sensor / transducer. *Frontiers in Plant Science*, 5(2), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00059>

Stanley, J., & Townsend, R. (1985). Characterisation of DNA forms associated with cassava latent virus infection. *Nucleic Acids Research*, 13(7), 2189–2206. <https://doi.org/10.1093/nar/13.7.2189>

Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., & Bisaro, D. M. (1991). Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: Evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(18), 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>

Stief, A., Altmann, S., Hoffmann, K., & Pant, B. D. (2014). Arabidopsis miR156 Regulates Tolerance to Recurring Environmental Stress through SPL Transcription Factors. *The Plant Cell*, 26(4), 1792–1807. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.123851>

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Homashow, M. I. F. (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2), 1035–1040.

- Strange, R. N., & Scott, P. R. (2005). Plant Disease: A Threat to Global Food Security. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 83–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.113004.133839>
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Chu, J., & Li, C. (2012). Pif4-mediated activation of yucca8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genetics*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002594>
- Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1997). Regulation of a Geminivirus Coat Protein Promoter by AL2 Protein (TrAP): Evidence for Activation and Derepression Mechanisms. *Virology*, 280(232), 269–280.
- Sunter, G., Stenger, D. C., & Bisaron, D. M. (1994). Heterologous Complementation by Geminivirus AL2 y AL3 genes. *Virology*, 203, 203–210.
- Suyal, G., Mukherjee, S. K., Srivastava, P. S., & Choudhury, N. R. (2013). Arabidopsis thaliana MCM2 plays role(s) in mungbean yellow mosaic India virus (MYMIV) DNA replication. *Archives of Virology*, 158(5), 981–992. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1563-9>
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnár, A., Havelda, Z., Lovas, Á., Lakatos, L., Bánfalvi, Z., & Burgyán, J. (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO Journal*, 22(3), 633–640. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg74>
- Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2018). A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signaling. *Nature*, 556(7700), 235–238. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0009-2>
- Tao, J.-J., Chen, H.-W., Ma, B., Zhang, W.-K., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2015). The Role of Ethylene in Plants Under Salinity Stress. *Frontiers in Plant Science*, 6(11), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01059>
- Teixeira, R. M., Ferreira, M. A., Raimundo, G. A. S., & Fontes, E. P. B. (2021). Geminiviral triggers and suppressors of plant antiviral immunity. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040775>
- Telem, R., Wani, S., Singh, N., Nandini, R., Sadhukhan, R., Bhattacharya, S., & Mandal, N. (2013). Cisgenics - A Sustainable Approach for Crop Improvement. *Current Genomics*, 14(7), 468–476. <https://doi.org/10.2174/13892029113146660013>
- Tennant, P., & Fermin, G. (2018). Beneficial Interactions with Viruses. *Viruses*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811257-1.00011-5>

- Triky-Dotan, S., Yermiyahu, U., Katan, J., & Gamliel, A. (2005). Development of crown and root rot disease of tomato under irrigation with saline water. *Phytopathology*, *95*(12), 1438–1444. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1438>
- Trinks, D., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Akbergenov, R., Oakeley, E. J., Veluthambi, K., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2005). Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes. *Journal of Virology*, *79*(4), 2517–2527. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2517-2527.2005>
- Tsuzuki, T., Takahashi, K., & Yukiko, S. I. (2011). Mg-chelatase H subunit affects ABA signaling in stomatal guard cells, but is not an ABA receptor in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, *124*, 527–538. <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0426-x>
- Tuteja, N. (2007). Abscisic Acid and Abiotic Stress Signaling. *Plant Signaling & Behavior*, *(6)*, 135–138.
- Tuttle, J. R., Idris, A. M., Brown, J. K., Haigler, C. H., & Robertson, D. (2008). Geminivirus-mediated gene silencing from cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiology*, *148*(1), 41–50. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123869>
- Uchiyama, A., Shimada-Beltran, H., Levy, A., Zheng, J. Y., Javia, P. A., & Lazarowitz, S. G. (2014). The *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses. *Frontiers in Plant Science*, *5*(11), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00584>
- Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., & Myouga, F. (2009). Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Science*, *106*, 17588–17593.
- Unsel, S., Höhnle, M., Ringel, M., & Frischmuth, T. (2001). Subcellular targeting of the coat protein of African cassava mosaic geminivirus. *Virology*, *286*(2), 373–383. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1003>
- Usharani, K. S., Periasamy, M., & Malathi, V. G. (2006). Studies on the activity of a bidirectional promoter of Mungbean yellow mosaic India virus by agroinfiltration. *Virus Research*, *119*(2), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.12.013>
- Vanitharani, R., Chellappan, P., & Fauquet, C. M. (2005). Geminiviruses and RNA silencing. *Trends in Plant Science*, *10*(3), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.005>

- Varela, A. L. N., Oliveira, J. T. A., Komatsu, S., Silva, R. G. G., Martins, T. F., Souza, P. F. N., Lobo, A. K. M., Vasconcelos, I. M., Carvalho, F. E. L., & Silveira, J. A. G. (2019). A resistant cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotype became susceptible to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) after exposure to salt stress. *Journal of Proteomics*, *194*(11), 200–217. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.11.015>
- Varma, A., & Malathi, V. G. (2003). Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, *142*(2), 145–164. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00240.x>
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Bridson, R. W., Rivera-Bustamante, R., Murilo Zerbini, F., & Martin, D. P. (2017). Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Archives of Virology*, *162*(6), 1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>
- Velázquez, K., Renovell, A., Comellas, M., Serra, P., García, M. L., Pina, J. A., Navarro, L., Moreno, P., & Guerri, J. (2010). Effect of temperature on RNA silencing of a negative-stranded RNA plant virus: Citrus psorosis virus. *Plant Pathology*, *59*(5), 982–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02315.x>
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, *45*(4), 523–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>
- Vives-Peris, V., Gómez-Cadenas, A., & Pérez-Clemente, R. M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant Cell Reports*, *37*(11), 1557–1569. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z>
- Vlad, F., Droillard, M.-J., Valot, B., Khafif, M., Rodrigues, A., Brault, M., Zivy, M., Rodriguez, P. L., Merlot, S., & Lauriere, C. (2010). Phospho-site mapping , genetic and in planta activation studies reveal key aspects of the different phosphorylation mechanisms involved in activation of SnRK2s. *The Plant Journal*, *63*, 778–790. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04281.x>
- Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P. L., & Laurie, C. (2009). Protein Phosphatases 2C Regulate the Activation of the Snf1-Related Kinase OST1 by Abscisic Acid in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *21*(10), 3170–3184. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069179>
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of National Academy of Science*, *96*(24), 14147–14152.

- Wafa'a Odeh. (2018). *Analyzing the viral resistance of tomato plant to TYLCV, PVY, and TSWV under heat and drought conditions* Wafa'a Odeh. Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Wang, C., Wang, C., Zou, J., Yang, Y., Li, Z., & Zhu, S. (2019). Epigenetics in the plant – virus interaction. *Plant Cell Reports*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02414-0>
- Wang, H., Hao, L., Shung, C., Sunter, G., & Bisaro, D. M. (2003). Adenosine Kinase Is Inactivated by Geminivirus AL2 and L2 Proteins The Plant Cell. *The Plant Cell*, 15(12), 3020–3032. <https://doi.org/10.1105/tpc.015180>. Beet
- Wang, L., Guo, Y., Jia, L., Chu, H., Zhou, S., Chen, K., Wu, D., & Zhao, L. (2014). Hydrogen peroxide acts upstream of nitric oxide in the heat shock pathway in arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*, 164(4), 2184–2196. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229369>
- Wang, M. B., Masuta, C., Smith, N. A., & Shimura, H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR>
- Wang, M. R., Cui, Z. H., Li, J. W., Hao, X. Y., Zhao, L., & Wang, Q. C. (2018). In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0355-y>
- Wang, M. R., Hamborg, Z., Blystad, D. R., & Wang, Q. C. (2021). Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. *Annals of Applied Biology*, 178(3), 442–449. <https://doi.org/10.1111/aab.12646>
- Wang, N. N., Shin, M. C., & Li, N. (2005). The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of Arabidopsis ACC synthase genes AtACS4, AtACS5, and AtACS7 induced by hormones and stresses. *Journal of Experimental Botany*, 56(413), 909–920. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri083>
- Wang, R., Zhang, Y., Kieffer, M., Yu, H., Kepinski, S., & Estelle, M. (2016). HSP90 regulates temperature-dependent seedling growth in Arabidopsis by stabilizing the auxin co-receptor F-box protein TIR1. *Nature Communications*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms10269>
- Wang, Xiuyun, Zhuang, L., & Shi, Y. (2017). Up-Regulation of HSFA2c and HSPs by ABA Contributing to Improved Heat Tolerance in Tall Fescue and Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1981), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms18091981>

- Wang, Xu, Ma, X., Wang, H., Li, B., Clark, G., Guo, Y., Roux, S., Sun, D., & Tang, W. (2015). Proteomic Study of Microsomal Proteins Reveals a Key Role for Arabidopsis Annexin 1 in Mediating Heat Stress-Induced Increase in Intracellular Calcium Levels. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14.3, 686–694. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.042697>
- Wang, Y., Wang, A. T., & Li, A. K. (2008). Genetic analysis of involvement of ETR1 in plant response to salt and osmotic stress. *Plant Growth Regulation*, 54, 261–269. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9249-0>
- Wang, Y., Wu, Y., Gong, Q., Ismayil, A., Yuan, Y., Lian, B., Jia, Q., Han, M., Deng, H., Hong, Y., Hanley-Bowdoin, L., Qi, Y., & Liu, Y. (2019). Geminiviral V2 Protein Suppresses Transcriptional Gene Silencing through Interaction with AGO4. *Journal of Virology*, 93(6), 1–15. <https://doi.org/10.1128/jvi.01675-18>
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H., & Zhu, J. K. (2018). The Flowering Repressor SVP Confers Drought Resistance in Arabidopsis by Regulating Abscisic Acid Catabolism. *Molecular Plant*, 11(9), 1184–1197. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.009>
- Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17(9), 10754–10773. <https://doi.org/10.3390/molecules170910754>
- Ward, B. M., & Lazarowitz, S. G. (1999). Nuclear export in plants. Use of geminivirus movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant cell*, 11(7), 1267–1276. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.7.1267>
- Ward, B. M., Medville, R., Lazarowitz, S. G., & Turgeon, R. (1997). The geminivirus BL1 movement protein is associated with endoplasmic reticulum-derived tubules in developing phloem cells. *Journal of Virology*, 71(5), 3726–3733. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.5.3726-3733.1997>
- Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., & Jupin, I. (1997). Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: Roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*, 228(2), 132–140. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8406>
- Wei, J., Zhao, J.-J., Zhang, T., Li, F.-F., Ghanim, M., Zhou, X.-P., Ye, G.-Y., Liu, S.-S., & Wang, X.-W. (2014). Specific Cells in the Primary Salivary Glands of the Whitefly Bemisia tabaci Control Retention and Transmission of Begomoviruses. *Journal of Virology*, 88(22), 13460–13468. <https://doi.org/10.1128/jvi.02179-14>
- Wei, Z., Yuan, T., Tarkowská, D., Kim, J., Nam, H. G., Novák, O., He, K., Gou, X., & Li, J. (2017). Brassinosteroid Biosynthesis Is Modulated via a

Transcription Factor Cascade of COG1, PIF4, and PIF5. *Plant Physiology*, 174(2), 1260–1273. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01778>

- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L., & Guo, H. (2012). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, 22(11), 1613–1616. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>
- Westwood, J. H., Mccann, L., Naish, M., Dixon, H., Murphy, A. M., Stancombe, M. A., Bennett, M. H., Powell, G., Webb, A. A. R., & Carr, J. P. (2013). A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 14, 158–170. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00840.x>
- Wu, F., Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z., Du, S., Mei, C., & Zhao, C. (2009). The Magnesium-Chelatase H Subunit Binds Abscisic Acid and Functions in Abscisic Acid Signaling. *Plant Physiology*, 150(8), 1940–1954. <https://doi.org/10.1104/pp.109.140731>
- Wu, M., Ding, X., Fu, X., & Lozano-Durán, R. (2019). Transcriptional reprogramming caused by the geminivirus Tomato yellow leaf curl virus in local or systemic infections in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Genomics*, 20(542), 1–17.
- Wu, M., Wei, H., Tan, H., Pan, S., Liu, Q., Bejarano, E. R., & Lozano-Durán, R. (2020). Plant DNA polymerases alpha and delta mediate replication of geminiviruses. *BioRxiv*, 1–15.
- Wu, Z., Han, S., Zhou, H., Tuang, Z. K., Wang, Y., Jin, Y., Shi, H., & Yang, W. (2019). Cold stress activates disease resistance in *Arabidopsis thaliana* through a salicylic acid dependent pathway. *Plant Cell and Environment*, 42(9), 2645–2663. <https://doi.org/10.1111/pce.13579>
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., García, J. A., & Gutiérrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Molecular Biology*, 39(4), 647–656. <https://doi.org/10.1023/A:1006138221874>
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Hannon, G. J., & Gutiérrez, C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO Journal*, 15(18), 4900–4908. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00870.x>
- Xie, W. S., Antoniw, J. F., White, R. F., & Jolliffe, T. H. (1994). Effects of beet cryptic virus infection on sugar beet in field trials. *Annual Applied Biology*, 124, 451–459.
- Xie, Y., Liu, Y., & Zhu, Z. (2001). Expressing activity of promoter elements of large intergenic region from cotton leaf curl virus in host plant. *Science in*

China Series C - Life Sciences, 44(1), 8-17 ST-Expressing activity of promoter element.

- Xiong, L., & Zhu, J. (2003). Update on Abscisic Acid Biosynthesis Regulation Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis 1. *Plant Physiology*, 133(9), 29–36. <https://doi.org/10.1104/pp.103.025395.mutant>
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., & Zhu, J. (2001). The Arabidopsis LOS5 / ABA3 Locus Encodes a Molybdenum Cofactor Sulfurase and Modulates Cold Stress – and Osmotic Stress – Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, 13(9), 2063–2083.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., & Zhu, J. (2002). Regulation of Osmotic Stress-responsive Gene Expression by the LOS6 / ABA1 Locus in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8588–8596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109275200>
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J. P., Feldman, T., Sumner, L. W., & Roossinck, M. J. (2008). Virus infection improves drought tolerance, 180, 911-921 *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02627.x>
- Xu, X., Zhang, Q., Hong, J., Li, Z., Zhang, X., & Zhou, X. (2019). Cryo-EM structure of a begomovirus geminate particle. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms20071738>
- Xu, Z.-Y., Lee, K. H., Dong, T., Jeong, J. C., Jin, J. B., Kanno, Y., Kim, D. H., Kim, S. Y., Seo, M., Bressan, R. A., Yun, D.-J., & Hwang, I. (2012). A Vacuolar α -Glucosidase Homolog That Possesses Glucose-Conjugated Abscisic Acid Hydrolyzing Activity Plays an Important Role in Osmotic Stress Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(5), 2184–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095935>
- Yadira, O., Guzmán Uriarte, R., García Estrada, R. S., & León Félix, J. (2011). Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2), 109–118. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., & Nishimura, M. (2007). Cytosolic HSP90 Regulates the Heat Shock Response That Is Responsible for Heat Acclimation in Arabidopsis thaliana. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37794–37804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707168200>
- Yamaguchi-shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1992). A novel Arabidopsis DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins. *Nucleic Acids Research*, 20(24), 6737. <https://doi.org/10.1093/nar/20.24.6737>

- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). A Novel cis-Acting Element in an Arabidopsis Gene Is Involved in Responsiveness to Drought, Low-Temperature, or High-Salt Stress. *The Plant Cell*, 6(2), 251. <https://doi.org/10.2307/3869643>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance To Dehydration and Cold Stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 781–803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yamauchi, Y., Furutera, A., Seki, K., & Toyoda, Y. (2008). Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 786–793. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.04.018>
- Yamauchi, Y., Kunishima, M., Mizutani, M., & Sugimoto, Y. (2015). Reactive short-chain leaf volatiles act as powerful inducers of abiotic stress-related gene expression. *Scientific Reports*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep08030>
- Yang, H., Yuan, S., Luo, Y., Huang, J., Chen, Y. E., Sun, X., Huang, Y., Xi, DH Lin, HH. (2013). Diverse responses are involved in the defence of Arabidopsis thaliana against Turnip Crinkle Virus. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 68 (3–4), 148–154.
- Yang, X., Xie, Y., Raja, P., Li, S., Wolf, J. N., Shen, Q., Bisaro, D. M., & Zhou, X. (2011). Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β c1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. *PLoS Pathogens*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002329>
- Yang, Z., Wang, C., Xue, Y., Liu, X., Chen, S., Song, C. P., Yang, Y., & Guo, Y. (2019). Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09181-2>
- Yarwood, C. E. (1957). Heat tolerance of virus-infected and fungus-infested tissues. *Phytopathology*, 47, 538–539.
- Yasmeen, R., & Siddiqui, Z. S. (2018). Ameliorative effects of Trichoderma harzianum on monocot crops under hydroponic saline environment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2579-2>
- Yidong, L., & Shuqun, Z. (2004). Phosphorylation of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, 3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609.1>

- Yildirim, E., Taylor, A. G., & Spittler, T. D. (2006). Ameliorative effects of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. *Scientia Horticulturae*, *111*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.08.003>
- Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Motoaki, J. K., Daisuke, S., Osakabe, Y., Sakuma, Y., Schö, F., & Shinozaki, Z. K. (2011). Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetic Genomics*, *286*, 321–332. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0647-7>
- Yousif, F., & Koch, A. (2019). Catch Me If You Can! RNA Silencing-Based Improvement of Antiviral Plant Immunity. *Viruses*, *11*, 673–705.
- Yusa, A., Berry, P., Cheng, J. J., Ogden, N., Bonsal, B., Stewart, R., & Waldick, R. (2015). Climate change, drought and human health in Canada. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(7), 8359–8412. <https://doi.org/10.3390/ijerph120708359>
- Zandalinas, S. I., Balfagón, D., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., Inupakutika, M. A., & Mittler, R. (2016). ABA is required for the accumulation of APX1 and MBF1c during a combination of water deficit and heat stress. *Journal of Experimental Botany*, *67*(18), 5381–5390. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw299>
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., & Varsani, A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, *98*(2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>
- Zhan, X.-F., Jiang, T., Wu, Z., Du, S.-Y., Yu, Y.-T., Jiang, S.-C., Lu, K., Feng, X.-J., Wang, X.-F., & Zhang, D.-P. (2013). Cochaperonin CPN20 negatively regulates abscisic acid signaling in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, *83*, 205–218. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0082-8>
- Zhang, D. P. (2014). *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9424-4>
- Zhang, H., Li, Y., & Zhu, J. K. (2018b). Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. *Nature Plants*, *4*(12), 989–996. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0309-4>
- Zhang, J., Zhang, H., Srivastava, A. K., Pan, Y., Bai, J., Fang, J., Shi, H., & Zhu, J. K. (2018a). Knockdown of rice microRNA166 confers drought resistance by causing leaf rolling and altering stem xylem development. *Plant Physiology*, *176*(3), 2082–2094. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01432>
- Zhang, T., Luan, J. B., Qi, J. F., Huang, C. J., Li, M., Zhou, X. P., & Liu, S. S. (2012). Begomovirus-whitefly mutualism is achieved through repression of

plant defences by a virus pathogenicity factor. *Molecular Ecology*, 21(5), 1294–1304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05457.x>

Zhang, W., Olson, N. H., Baker, T. S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M. I., Davies, J. W., & McKenna, R. (2001). Structure of the maize streak virus geminate particle. *Virology*, 279(2), 471–477. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0739>

Zhang, W., Zhou, R.-G., Gao, Y.-J., Zheng, S.-Z., Xu, P., Zhang, S.-Q., & Sun, D.-Y. (2009). Molecular and Genetic Evidence for the Key Role of AtCaM3 in Heat-Shock Signal Transduction. *Plant Physiology*, 149(4), 1773–1784. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133744>

Zhang, X., Zhang, X., Singh, J., Li, D., & Qu, F. (2012). Temperature-Dependent Survival of Turnip Crinkle Virus -Infected Arabidopsis Plants Relies on an RNA Silencing-Based Defense That. *Journal of Virology*, 86(12), 6847–6854. <https://doi.org/10.1128/JVI.00497-12>

Zhang, X., Zhang, X., Singh, J., Li, D., & Qu, F. (2012). Temperature-Dependent Survival of Turnip Crinkle Virus -Infected Arabidopsis Plants Relies on an RNA Silencing-Based Defense That Requires DCL2, AGO2 y HEN1. *Journal of Virology*, 86(12), 6847–6854. <https://doi.org/10.1128/JVI.00497-12>

Zhang, X.-F., Tao, J., Yong-Tao, Y., Zhen, W., Shang-Chuan, J., Kai, L., Xiujing, F., Shan, L., Yan-Fen, L., Xiao-Fang, W., & Da-Peng, Z. (2014). Arabidopsis co-chaperonin CPN20 antagonizes Mg-chelatase H subunit to derepress ABA-responsive WRKY40 transcription repressor. *Science China Life Sciences*, 57(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4587-9>

Zhao, F., Li, Y., Chen, L., Zhu, L., Ren, H., Lin, H., & Xi, D. (2016). Temperature dependent defence of *Nicotiana tabacum* against Cucumber mosaic virus and recovery occurs with the formation of dark green islands. *Journal of Plant Biology*, 59(3), 293–301. <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0035-2>

Zhao, L., Rosario, K., Breitbart, M., & Duffy, S. (2019). Eukaryotic Circular Rep-Encoding Single-Stranded DNA (CRESS DNA) Viruses: Ubiquitous Viruses With Small Genomes and a Diverse Host Range. *Advances in Virus Research*, 3, 1-62. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.10.001>

Zhao, X., & Eric Schaller G. (2004). Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 562, 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00238-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00238-8)

Zhong, S., Liu, J., Jin, H., Lin, L., Li, Q., Chen, Y., Yuan, Y., & Wang, Z. (2013). Warm temperatures induce transgenerational epigenetic release of RNA silencing by inhibiting siRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Science*, 110(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1219655110>

- Zhou, H., Cao, W., Cao, Y., Liu, J., Hao, Y., Zhang, J., & Chen, S. (2006). Roles of ethylene receptor NTHK1 domains in plant growth , stress response and protein phosphorylation. *FEBS Letters*, *580*, 1239–1250. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.01.037>
- Zhou, X. (2013). Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual Review of Phytopathology*, *51*, 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>
- Zhou, Y., Rojas, M. R., Park, M., Seo, Y., Lucas, W. J., Gilbertson, R. L., & Irol, J. V. (2011). Histone H3 Interacts and Colocalizes with the Nuclear Shuttle Protein and the Movement Protein of a Geminivirus. *Journal of Virology*, *85*(22), 11821–11832. <https://doi.org/10.1128/JVI.00082-11>
- Zhu, J.K., Liu, J., & Xiong, L. (1998). Genetic Analysis of Salt Tolerance in Arabidopsis: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *The Plant Cell*, *10*(7), 1181. <https://doi.org/10.2307/3870720>
- Zhu, J.K. (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, *167*(3), 313–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>.Abiotic
- Zrachya, A., Glick, E., Levy, Y., Arazi, T., Citovsky, V., & Gafni, Y. (2007). Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology*, *358*(1), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.016>

Anexo I

Publicaciones

Brief Communication

The C4 protein from the geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* confers drought tolerance in *Arabidopsis* through an ABA-independent mechanism

Miguel Corrales-Gutierrez^{1,2,3} , Laura Medina-Puche^{1,2} , Yanling Yu^{1,2,4}, Liping Wang^{1,2,4} , Xue Ding^{1,2,4}, Ana P. Luna³ , Eduardo R. Bejarano³ , Araceli G. Castillo^{3,*}  and Rosa Lozano-Duran^{1,2,*} 

¹Shanghai Center for Plant Stress Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

²Center for Excellence in Molecular Plant Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

³Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Area de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

⁴University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Received 6 September 2019;

revised 6 September 2019;

accepted 18 October 2019.

*Correspondence (Tel (+86) 021-57078280; email lozano-duran@sibs.ac.cn (RLD); Tel +34951953214; fax +34952132001; ara@uma.es (AGC))

Keywords: geminivirus, drought, C4, TYLCV, tomato, ABA.

Drought causes important declines in crop yield, negatively impacting plant growth, physiology and reproduction. Plants have adopted a wide range of strategies to confront the negative effects of drought, including increasing water uptake by optimizing the root system, closing stomata to limit the water loss caused by transpiration, accumulating osmoprotectants, or producing the hormone abscisic acid (ABA). This intricate scenario makes drought resistance a highly complex trait, with polygenic nature, low heritability, and vastly influenced by genotype-environment interactions (Fang and Xiong, 2014).

A growing body of evidence indicates that viral infections can result in improved plant tolerance to abiotic stresses (see, among others: Aguilar *et al.*, 2017; Anfoka *et al.*, 2016; Westwood *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008), raising the tantalizing idea that the identification of the molecular mechanisms underlying these viral effects could unlock yet-unknown stress tolerance strategies and pave the way for the generation of stress-resilient plants. Geminiviruses are viruses with small circular, single-stranded DNA genomes that infect a broad range of plants. The geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) is a main causal agent of Tomato yellow leaf curl disease (TYLCD), one of the most devastating viral diseases affecting tomato crops in tropical and temperate areas worldwide. Interestingly, infection by TYLCV has been shown to alleviate heat stress responses in tomato (reviewed in Gorovits *et al.* 2019). Here, we show that infection by TYLCV enhances drought tolerance in tomato and *Nicotiana benthamiana* and that the virus-encoded protein C4 is the viral determinant conferring drought tolerance in *Arabidopsis* through an ABA-independent mechanism.

In order to determine whether the infection by TYLCV could affect drought tolerance in its natural host, tomato, as well as in the model *Solanaceae* species *N. benthamiana*, we agroinoculated plants with a TYLCV infectious clone and subjected half of the infected plants to drought treatment at 21 days post-

inoculation. Interestingly, TYLCV-infected plants from both species wilted more slowly after the drought treatment and displayed milder drought-related symptoms, suggesting that the presence of TYLCV promotes drought tolerance (Figure 1a,b).

In order to find out whether one of the virus-encoded proteins is sufficient to confer the observed enhanced drought tolerance, we subjected transgenic *Arabidopsis* lines constitutively expressing the viral genes (C2, C3, C4, V2 and CP) from a 35S promoter to drought treatment and evaluated their performance. Constitutive expression of Rep renders plants non-viable; hence, this protein was not included in this study. Drought did not affect expression of the transgenes (data not shown). As shown in Figure 1c, among the viral proteins tested, only C4 had an impact on the tolerance of *Arabidopsis* to drought: 35S:C4 transgenic plants stayed green and turgid following water deprivation, while transgenic plants expressing other viral proteins or control plants wilted and eventually died.

C4 localizes both at the plasma membrane and in chloroplasts (Rosas-Díaz *et al.*, 2018). Given this double subcellular localization pattern, we wondered whether C4 is promoting drought tolerance through its specific activity at one of these two locations. In order to answer this question, we tested the drought tolerance of transgenic *Arabidopsis* plants expressing the mutated C4 version, C4_{G2A}, which accumulates exclusively in chloroplasts (Rosas-Díaz *et al.* 2018). Despite showing transgene expression levels similar to those observed in 35S:C4 plants, 35S:C4_{G2A} plants displayed sensitivity to drought comparable to that of wild-type plants (Figure 1d), indicating that chloroplastic C4 is not sufficient to confer drought tolerance and suggesting that its plasma membrane localization is required for this effect.

Transgenic expression of C4 in *Arabidopsis* has been recently shown to interfere with xylem patterning in the root (Fan *et al.*, 2019). With the purpose to determine whether the effect of C4 on drought tolerance could be uncoupled from its impact on xylem patterning, we evaluated the drought tolerance of SCR:C4 transgenic *Arabidopsis* plants, which express C4 under the endodermis-specific *SCARECROW* (SCR) promoter but display xylem patterning defects similar to those observed in 35S:C4 plants (Fan *et al.*, 2019). As shown in Figure 1e, SCR:C4 plants did not show enhanced drought tolerance, indicating that the effects of C4 on xylem patterning and drought tolerance are independent and that the latter requires expression of C4 outside of the SCR expression domain.

Anexo II

Bibliografía recomendada sobre interacciones entre estreses abióticos y bióticos

Tabla 1. Relación de los principales artículos sobre interacciones entre estreses abióticos y bióticos en planta. Se muestran tanto el estrés o los estreses abióticos estudiados, el hospedador, incluyendo el cultivar (cv.) cuando es mencionado, el patógeno o los patógenos virales utilizados y la referencia bibliográfica.

Estrés abiótico	Planta	Virus	Referencia
Sequía	<i>Zea mays</i> (Maíz dulce)	MDMV	Linday & Gudauskas, 1975
Sequía	<i>Z. mays</i> (Maíz dulce)	MDMV	Nelms <i>et al.</i> , 1980
Sequía	<i>Z. mays</i> (Maíz dulce)	MDMV	Olson <i>et al.</i> , 1990
Sequía	<i>Beta vulgaris</i> (remolacha azucarera)	BCV	Xie <i>et al.</i> , 1994
Sequía	<i>Trifolium repens</i> (trébol blanco)	PSV	McLaughlin & Windham, 1996
Sequía	<i>B. vulgaris</i> (remolacha azucarera), <i>T. tabacum</i> , <i>N. benthamiana</i> , <i>Chenopodium amaranticolor</i> y <i>Oryza sativa</i> (arroz)	CMV, TMV, CMV y BMV	Xu <i>et al.</i> , 2008
Sequía	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CMV	Westwood <i>et al.</i> , 2013
Sequía	<i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>A. thaliana</i>	PPV y PVX	Aguilar <i>et al.</i> , 2017
Sequía	<i>Vitis vinifera</i> (vid)	GLRaV-3	El Aou-ouad <i>et al.</i> , 2017
Sequía	<i>A. thaliana</i>	CMV	Berges <i>et al.</i> , 2018
Sequía	<i>V. vinifera</i> (vid)	GLRaV-3	El Aou-ouad <i>et al.</i> , 2018
Sequía	<i>Solanum lycopersicum</i> (tomate)	CMV	Hosseini <i>et al.</i> , 2018
Sequía	<i>Triticum aestivum</i> L. (trigo)	BYDV	Davis <i>et al.</i> , 2015
Sequía	<i>N. benthamiana</i>	TMMV	Dastogeer <i>et al.</i> , 2018
Sequía	<i>Citrus sinensis</i> (naranja)	CTV	Silva <i>et al.</i> , 2019
Sequía	<i>O. sativa</i> (arroz)	RTSV	Encabo <i>et al.</i> , 2020
Salinidad	<i>S. menongena</i> (berenjena)	EMCV	Moldakimova <i>et al.</i> , 2012
Salinidad	<i>Vigna unguiculata</i> (guisante)	CPSMV	Varela <i>et al.</i> , 2019
Salinidad	<i>S. lycopersicum</i> cv. Mouna y cv. San Miguel (tomate)	TYLCSV	Gharsallah <i>et al.</i> , 2020
Alta temperatura	<i>N. glutinosa</i>	TSWV, TMV, TNV, TBCV y CMV	Kassanis, 1952
Alta temperatura	<i>P. vulgaris</i> (judía)	RTNV	Harrison, 1956
Alta temperatura	<i>P. vulgaris</i> (judía)	TMV, TRSV, TSWV y AMV	Yarwood, 1957
Alta temperatura	<i>Cucumis melo</i> cv. Iroquois (melón)	CMV	Roossinck, 1991
Alta temperatura	<i>Musa acuminata</i> cv. Dwarf Cavendish (banano)	BSV	Dahal <i>et al.</i> , 1997

Estrés abiótico	Planta	Virus	Referencia
Alta temperatura	<i>Datura stramonium</i> , <i>N. tabacum</i> cv. White Burley y <i>Physalis ixocarpa</i>	TSWV	Llamas-Llamas <i>et al.</i> , 1998
Alta temperatura	<i>Manihot sculenta</i> (mandioca)	ACMV, SLCMV, EACMCV y ICMV	Chellapan <i>et al.</i> , 2005
Alta temperatura	<i>C. melo</i> (melón)	MNSV	Kido <i>et al.</i> , 2007
Alta temperatura	<i>Curvularia protuberata</i>	CThTV	Márquez <i>et al.</i> , 2007
Alta temperatura	<i>N. benthamiana</i>	TRSV	Siddiqui <i>et al.</i> , 2008
Alta temperatura	<i>Carisa papaya</i> cv. Pusa Nanha (papaya)	PRSV	Mangrauthia <i>et al.</i> , 2009
Alta temperatura	<i>C. sinensis</i> (naranja)	CPsV	Velázquez <i>et al.</i> , 2010
Alta temperatura	<i>A. thaliana</i>	TCV	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Alta temperatura	<i>S. lycopersicum</i> (tomate)	CThTV	Al-Hamdani <i>et al.</i> , 2014
Alta temperatura	<i>N. benthamiana</i>	ToRSV	Ghoshal <i>et al.</i> , 2014
Alta temperatura	<i>N. benthamiana</i>	PPV y PVX	Del Toro <i>et al.</i> , 2015
Alta temperatura	<i>S. lycopersicum</i> (tomate)	TYLCV	Ghandi <i>et al.</i> , 2015
Alta temperatura	<i>N. glutinosa</i> y <i>N. benthamiana</i>	PVX y PVY	Ma <i>et al.</i> , 2015
Alta temperatura	<i>T. aestivum</i> cv. Yitpi	BYDV-PAV	Nancarrow <i>et al.</i> , 2015
Alta temperatura	<i>N. benthamiana</i>	PSV tanto en coinfección con stRNA como sin satRNA	Obrepalska <i>et al.</i> , 2015
Alta temperatura	<i>N. benthamiana</i>	PVY-O, PVA y PLRV	Chung <i>et al.</i> , 2016
Alta temperatura	<i>A. thaliana</i>	CMV	Hily <i>et al.</i> , 2016
Alta temperatura	<i>N. tabacum</i>	CMV	Zhao <i>et al.</i> , 2016
Alta temperatura	<i>S. lycopersicum</i> (tomate)	TYLCV, PVY y TSWV	Gorovits <i>et al.</i> , 2017
Alta temperatura	<i>V. unguiculata</i> (guisante)	GBNV	Singh <i>et al.</i> , 2017
Alta temperatura	<i>S. tuberosum</i> cv. Chicago y cv. Gala (patata)	PVY	Makarova <i>et al.</i> , 2018
Alta temperatura y sequía	<i>A. thaliana</i>	TuMV	Prasch & Sonnewald, 2013
Alta temperatura y sequía	<i>S. lycopersicum</i> (tomate)	TYLCV, PVY y TSWV	Wafah, 2018
Alta temperatura, salinidad y sequía	<i>A. thaliana</i>	TYLCSV	Arroyo Mateos, 2015

Anexo III

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Síntomas de enfermedades causadas por virus en plantas.....	24
Figura 2. Síntomas de TYLCV.....	25
Tabla 1. Clasificación de la familia <i>Geminiviridae</i>	26
Figura 3. Organización genómica de los geminivirus.....	28
Figura 4. El ciclo de vida de los geminivirus.....	29
Figura 5. El origen de replicación geminiviral.....	33
Figura 6. Tipos de replicación de los geminivirus.....	35
Figura 7. Principales rutas de silenciamiento génico.....	43
Figura 8. Síntesis de ABA.....	45
Figura 9. Transducción de la señal de ABA.....	48
Figura 10. Ruta SOS de respuesta a salinidad.....	51
Figura 11. Ruta del etileno de respuesta a estrés por salinidad.....	52
Figura 12. Respuesta a estrés por alta temperatura.....	57
Figura 1.1 Diseño experimental.....	77
Figura 1.2. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con TYLCV.....	79
Figura 1.3. Acumulación de TYLCV en plantas de <i>N. benthamiana</i> mostradas en la figura 1.2.....	80
Figura 1.4. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas tomate infectadas con TYLCV.....	82
Figura 1.5. Acumulación de TYLCV en plantas de tomate mostradas en la figura 1.4.....	83
Figura 1.6. Diseño experimental.....	84
Figura 1.7. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con TYLCV.....	86
Figura 1.8. Acumulación de TYLCV en plantas de <i>N. benthamiana</i> mostradas en la figura 1.7.....	87
Figura 1.9. Síntomas debido al estrés por sequía en plantas tomate infectadas con TYLCV.....	89
Figura 1.10. Acumulación de TYLCV en plantas de tomate mostradas en la figura 1.9.....	90

Figura 1.11. Análisis de tolerancia a sequía de plantas de <i>A. thaliana</i> que expresan cada una de las proteínas de TYLCV.	92
Figura 1.12. Imágenes de infrarrojo (IR) de las plantas de <i>A. thaliana</i> de la figura 1.11.....	93
Figura 1.13 Análisis de la tolerancia a sequía desencadenada por C4 y su relación con la localización de C4 en cloroplastos, membrana plasmática y endodermis.....	94
Figura 1.14 Imágenes IR de las plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas mostradas en la figura 1.13.....	95
Figura 1.15 Caracterización de la relación entre ABA y la tolerancia a sequía inducida por la proteína C4 de TYLCV.....	97
Figura 2.1. Diseño experimental.....	107
Figura 2.2. Eficiencia del PSII en plantas de <i>N. benthamiana</i> bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (<i>mock</i>) a 14 dpi y 21 dpi.	109
Figura 2.3. Síntomas de estrés por salinidad en <i>N. benthamiana</i>	111
Figura 2.4. Crecimiento de plantas de <i>N. benthamiana</i> sometidas a estrés por salinidad (verde oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (verde claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (<i>mock</i> , M).	112
Figura 2.5. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en <i>N. benthamiana</i> a 14 dpi y a 21 dpi.....	113
Figura 2.6. Diseño experimental.....	115
Figura 2.7 Eficiencia del PSII en plantas de tomate bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (<i>mock</i>) a 14 dpi y 21 dpi.....	117
Figura 2.8. Síntomas de estrés por salinidad en plantas de tomate.....	118
Figura 2.9. Crecimiento de plantas de tomate sometidas a estrés por salinidad (verde oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (verde claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (<i>mock</i> , M)..	119
Figura 2.10. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en tomate a 14 dpi y a 21 dpi.	120
Figura 2.11. Diseño experimental.....	122
Figura 2.12. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en <i>N. benthamiana</i> a 21 dpi y a 28 dpi.....	123
Figura 2.13. Crecimiento de plantas de <i>N. benthamiana</i> sometidas a estrés por salinidad (azul oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (azul claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (<i>mock</i> , M)..	124

Figura 2.14. Síntomas de estrés por salinidad en <i>N. benthamiana</i>	126
Figura 2.15. Eficiencia del PSII en plantas de <i>N. benthamiana</i> bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (<i>mock</i>) a 21 dpi y 28 dpi.	127
Figura 2.16. Diseño experimental.....	129
Figura 2.17. Efecto de la salinidad en la acumulación relativa de TYLCV en tomate a 21 dpi y a 28 dpi.	131
Figura 2.18. Crecimiento de las plantas de tomate sometidas a estrés por salinidad (azul oscuro, NaCl) y bajo condiciones control (azul claro) en plantas infectadas por TYLCV (TY) y plantas sin infectar (<i>mock</i> , M).....	132
Figura 2.19. Síntomas de estrés por salinidad en plantas de tomate.....	133
Figura 2.20. Eficiencia del PSII en plantas de tomate bajo estrés salino inoculadas con TYLCV o con el plásmido pGWB501 (<i>mock</i>) a 21 dpi y 28 dpi.....	134
Figura 3.1. Diseño experimental.....	144
Figura 3.2. Análisis del desarrollo de la infección.	146
Figura 3.3. Fenotipado de la infección de TYLCV en plantas de tomate sometidas a alta temperatura (35°C) y bajo condiciones control (24°C).....	147
Figura 3.4. Diseño experimental.....	149
Figura 3.5. Análisis del desarrollo de la infección.	151
Figura 3.6. Fenotipado de la infección bajo estrés por alta temperatura (35°C), temperatura moderada (28°C) y en condiciones control (21°C) en plantas de <i>N. benthamiana</i>	153
Tabla 1. Plásmidos utilizados en la presente tesis.	160
Tabla 2. Concentración de los diferentes antibióticos usados en el cultivo bacteriano.....	161
Tabla 3. Plantas transgénicas usadas en la presente tesis.	162
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la presente tesis.....	163
Tabla 5. Índice de severidad de los síntomas producidos por TYLCV en <i>N. benthamiana</i>	168
Tabla 6. Índice de severidad de los síntomas producidos por TYLCV en tomate.....	168
Tabla 7. Índice de severidad de los cambios producidos por la sequía en <i>N. benthamiana</i>	169
Tabla 8. Índice de severidad de los cambios producidos por la sequía en tomate.....	170