



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Análisis funcional de los dominios desmetilasa (AlkbB)
conservados en la replicasa de dos vitivirus: efecto en la
infección en *Nicotiana* sp.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Contreras Lucas, Lorenzo

Tutor/a: Aparicio Herrero, Frederic

Cotutor/a externo: Pallás Benet, Vicente

Director/a Experimental: Navarro Bohigues, José Antonio

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

Resumen

La metilación reversible del nitrógeno 6 (N6) de la adenosina (m6A) del RNA se realiza intrínsecamente por la acción concertada de algunas metiltransferasas y desmetilasas, y su efecto depende de otras proteínas que reconocen el RNA marcado. Esta modificación epigenética desempeña un papel fundamental en la regulación de diversas facetas del metabolismo del RNA en animales, plantas y levaduras, abarcando procesos como el plegamiento, la maduración, la exportación, la traducción y la degradación. Tanto en virus que afectan a mamíferos como a plantas, la modificación m6A del genoma viral también puede tener implicaciones para la virulencia, y el resultado específico (proviral o antiviral) depende de la naturaleza del virus. Se ha demostrado que en el caso del genoma del virus del mosaico de la alfalfa (AMV), los niveles altos de m6A reducen la infección. El virus contrarresta esta acción inhibitoria de la metilación interaccionando con una desmetilasa m6A citosólica, *AtALKBH9B* en *Arabidopsis*, reduciendo los niveles de m6A en su genoma y aumentando la infección. Las proteínas similares a la proteína de alquilación B (AlkB) de *Escherichia coli* que muestran actividad desmetilasa del RNA, pertenecen a la familia de las oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OG) y Fe (II). Estas proteínas desempeñan un papel crucial en la protección del RNA y el DNA frente a los daños causados por los agentes metilantes. Curiosamente, se han identificado dominios AlkB conservados, incluidos los motivos de unión a hierro (HXDXnH) y 2-OG (RXXXXXR), en las replicasas de ciertos virus de RNA monocatenario que infectan huéspedes leñosos. Aunque la función específica de estos dominios AlkB en el ciclo de infección de estos virus sigue siendo imprecisa, su conservación sugiere su importancia potencial en el establecimiento de las relaciones virus-hospedador. Durante este trabajo fin de máster, se ha estudiado la funcionalidad de los dominios AlkB conservados en las replicasas de los virus A y B de la vid (GVA y GVB) durante la infección. En concreto, realizamos un estudio mutacional de los dominios AlkB en GVA y GVB utilizando plantas de *Nicotiana sp.*, evaluando, además, el efecto del silenciamiento de los dos homólogos de *AtALKBH9B* en *Nicotiana spp.*, *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2*, en la infección. Previamente abordamos la puesta a punto de un sistema de regulación de las desmetilasas mediante silenciamiento inducido por virus (VIGS) y la obtención de una colección de cinco mutantes (M1, M2, M3, M4 y MA) de GVB con sus dominios AlkB mutados, similar a la disponible en el laboratorio para GVA. En M1/M2 y M3 los aminoácidos conservados del dominio de unión a hierro y a 2OG se sustituyeron por alaninas, (AXDXnH/AXAXnH y AXXXXXA respectivamente). En el mutante M4 se combinaron las mutaciones M2 y M3. Finalmente, el mutante M5 consistió en la sustitución por alanina de un aminoácido no conservado en el mismo dominio AlkB. Después de realizar los bioensayos, la cuantificación del título viral de ambos virus, así como del silenciamiento de las desmetilasas, se realizó mediante Northern blot y RT-qPCR. Se observó que, en el caso de GVA, el título viral se veía significativamente reducido en los mutantes M1, M3 y M4 (M2 no estaba disponible para GVA), solo en los bioensayos realizados con plantas con las desmetilasas silenciadas. Sin embargo, en el caso de los mutantes de GVB, aunque se observó una tendencia a una menor acumulación sobre todo de M3 y M4 en algún

bioensayo, estos resultados no fueron repetitivos, ni por tanto las diferencias de acumulación viral significativas independientemente de si los bioensayos fueron realizados en plantas silenciadas o no. Por ello, se puede concluir que el dominio Alkb de GVA puede tener un significado funcional durante la infección viral, aunque su actividad desmetilasa queda diluida por la presencia de las desmetilasas del huésped. Estas pueden desempeñar un papel relevante en el mecanismo de defensa de la planta, pero el propio virus puede hacer uso de ellas para mejorar su infección. Nuestros resultados sugieren además que los dominios AlkB de GVA pueden tener una mayor relevancia funcional en vid donde el virus está restringido al floema y en periodos de letargo metabólico donde la interacción entre el RNA viral y las desmetilasas de la planta puede verse restringida. La desmetilación del genoma no es la única forma empleada por estos virus para poder evadir la respuesta defensiva de la planta puesto que tanto GVA como GVB presentan proteínas supresoras del silenciamiento. Sin embargo, éstas parecen tener mecanismos de actuación diferentes pudiendo ser el motivo de la diferencia observada entre GVA y GVB frente al silenciamiento de las desmetilasas de la planta.

Palabras clave: ALKBH9B; desmetilasa de RNA; GVA; GVB; m6

**ANEXO I. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030****Anexo al Trabajo de Fin de Grado y Trabajo de Fin de Máster: Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030**

Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No Procede
ODS 1. Fin de la pobreza.		*		
ODS 2. Hambre cero.	*			
ODS 3. Salud y bienestar.		*		
ODS 4. Educación de calidad.				*
ODS 5. Igualdad de género.				*
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				*
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				*
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				*
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				*
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				*
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				*
ODS 12. Producción y consumo responsables.				*
ODS 13. Acción por el clima.				*
ODS 14. Vida submarina.				*
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		*		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				*
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				*

Descripción de la alineación del TFG/TFM con los ODS con un grado de relación más alto.

ODS 2: En la actualidad, más del 50 % de las enfermedades emergentes de las plantas son inducidas por virus, provocando anualmente, pérdidas de entre el 10-15 % de las cosechas, cuyo impacto económico se estima en más de 30.000 millones de dólares anuales (Jones & Naidu, 2019; Pallás et al., 2021). Por tanto, las enfermedades inducidas por virus suponen una amenaza mundial para la producción de los cultivos, la seguridad alimentaria y la diversidad de cultivos.

Agradecimientos

Este Trabajo de Fin de Máster es el resultado de meses de aprendizaje, dedicación y esfuerzo. Es por ello, que me gustaría agradecer a todas las personas que han formado parte de este proceso, de forma directa o indirecta, ya que sin ellas no hubiera sido posible.

En primer lugar, agradecer a todos los integrantes del laboratorio, a Lorena, Irene, David, Víctor, Mikha, Pedro, Fede y Jesús por ofrecer su ayuda en todo momento, a Vicente por depositar su confianza en mí desde el primer día y sobre todo a Toni, por tomarse todo el tiempo del mundo en explicarme cada uno de los protocolos y en resolverme todas las dudas que pudiera tener sin ponerme nunca una mala cara, por muchas veces que se lo preguntara.

Asimismo, agradecer a mis compañeros de máster por todos estos meses en Valencia, que aun siendo el primer año viviendo lejos de mi familia, me han hecho sentir como si aun estuviera en casa. Desde los momentos compartidos en clase y en la biblioteca, hasta cada uno de los planes que hemos hecho para conocer la ciudad. Y aunque me gustaría poder mencionar a todo el mundo, quiero mencionar especialmente a Gabriel, por todas esas comidas los fines de semana y por sacarme una sonrisa siempre, a Xulia, por ser mi compañera de rayadas y risas a partes iguales y a Jose, por estar ahí siempre que he necesitado algo y por todas esas tardes de fórmula 1 y fútbol.

Para ir terminando agradecer a mis amigos, a mi familia y a mi hermana por apoyarme en todo momento aun sin saber muy bien lo que estaba haciendo, sin olvidarme de Senna, que aunque sea un animal, es una razón más para seguir esforzándome.

Por último y más importante, quiero agradecerles a mis padres por haberme brindado una vida llena de oportunidades y por haberme apoyado en cada una de las decisiones que he tomado sin dudar ni un solo momento en que esa decisión sería la correcta. Nada de esto hubiera sido posible sin la confianza ciega que han tenido siempre en mí y en no dejarme nunca bajar los brazos. Espero que este trabajo sólo sea el final del máster y el inicio de algo mucho más grande.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 LOS VIRUS COMO PATÓGENOS DE PLANTAS	1
1.2 MODIFICACIONES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	2
1.3 EFECTOS E IMPORTANCIA DE LA MODIFICACIÓN N6-METILADENOSINA (M6A) EN LA REGULACIÓN Y PROCESAMIENTO DEL RNA.....	3
1.4 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA MODIFICACIÓN M6A EN ANIMALES Y PLANTAS.	4
1.4.1 Proteínas escritoras o “writers”	5
1.4.2 Proteínas lectoras o “readers”	5
1.4.3 Proteínas borradoras o “erasers”	6
1.5. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS ALKB: CONTEXTO, DESCUBRIMIENTO Y ESTRUCTURA MOLECULAR	7
1.5.1 La familia AlkB en animales y plantas.	7
1.5.2 Dominios de unión conservados	8
1.6 REGULACIÓN DE LA INFECCIÓN MEDIADA POR M6A EN VIRUS DE PLANTAS	9
1.6.1 Modificaciones m6A que favorecen la infección viral: el virus del mosaico amarillo del trigo (WYMV)	11
1.6.2 Modificaciones m6A que impiden la infección viral: el virus del mosaico de la alfalfa (AMV)	12
1.7 FAMILIAS DE VIRUS QUE CONTIENEN EL DOMINIO ALKB EN SUS REPLICASAS	13
1.7.1 Familia Closteroviridae.....	13
1.7.2 Familia Alphaflexiviridae.....	14
1.7.3 Familia Betaflexiviridae.....	14
1.7.4 Otras familias.....	15
1.8 GRAPEVINE VIRUS A Y B.....	15
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
2.1 MATERIAL VEGETAL Y CEPAS DE VIRUS UTILIZADOS	18
2.2 OBTENCIÓN DE LOS MUTANTES DEL DOMINIO ALKB DE GVB Y CLONES DE GVA UTILIZADOS	18
2.3 SILENCIAMIENTO DE LAS ALKBH9B DE <i>N. BENTHAMIANA</i>	20
2.4 INOCULACIÓN DE LOS VIRUS UTILIZADOS MEDIANTE AGROINFILTRACIÓN	21
2.5 BIOENSAYOS, RECOGIDA DE MUESTRA Y EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	22
2.6 ANÁLISIS NORTHERN BLOT E HIBRIDACIÓN MOLECULAR.....	22
2.7 CUANTIFICACIÓN DEL TÍTULO VIRAL Y LOS NIVELES DE SILENCIAMIENTO GÉNICO POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	23
2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	24
RESULTADOS.....	25
3.1 ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE LA CONSTRUCCIÓN PLX(GVB-WT) EN <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> Y <i>NICOTIANA OCCIDENTALIS</i> ...	25
3.2 SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS) DE LAS DOS ISOFORMAS DE LA DESMETILASA ALKBH9B PRESENTES EN <i>N. BENTHAMIANA</i>	27
3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE <i>NbALKBH9B1</i> Y <i>NbALKBH9B2</i> EN PLANTAS DE <i>N. BENTHAMIANA</i> INFECTADAS CON TRV	30
3.4 EFECTO SOBRE LA INFECCIÓN DE GVB EN <i>NICOTIANA SP.</i> DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN RESIDUOS CONSERVADOS DEL DOMINIO ALKB PRESENTE EN LA REPLICASA VIRAL	31
3.4.1 Análisis de las infecciones de GVB-WT y los mutantes del domino AlkB en <i>N. occidentalis</i>	31
3.4.2 Análisis de las infecciones de GVB y los mutantes del domino AlkB en <i>N. benthamiana</i>	33
3.5 EFECTO SOBRE LA INFECCIÓN DE GVA EN <i>N. BENTHAMIANA</i> DE LAS MUTACIONES PUNTUALES EN RESIDUOS CONSERVADOS DEL DOMINIO ALKB PRESENTE EN LA REPLICASA VIRAL	37
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

ABREVIATURAS

Virus

GVA Virus de la vid A

GVB Virus de la vid B

AMV Virus del mosaico de la alfalfa

ACLSV Virus de las manchas cloróticas del manzano

TRV Virus del cascabel del tabaco

WYMV Virus del mosaico amarillo del trigo

Otros

RNA ácido ribonucleico

DNA ácido desoxirribonucleico

ALKB alkylation repair homolog B

M6A N6-metiladenosina

HEL Helicasa

MTR Metiltransferasa

RdRp RNA polimerasa dependiente de RNA

2-OG 2-oxoglutarato

ORF Marco abierto de lectura

Introducción

1.1 Los virus como patógenos de plantas

Los virus son parásitos intracelulares obligados que requieren del control del metabolismo de la célula y de su maquinaria de traducción. Las plantas, como los animales, pueden ser infectadas por muchos virus a lo largo de su desarrollo, incluidos virus de DNA o RNA, bicatenario o monocatenario. Sin embargo, la mayoría de los virus de plantas presentan su material genético en forma de un RNA de cadena simple que codifica las proteínas necesarias para la replicación del virus, su encapsidación y movimiento, así como para suprimir la respuesta defensiva del huésped y en ocasiones su transmisión a otros huéspedes (Heinlein, 2015; Navarro et al., 2019). Los virus de RNA de plantas se clasifican en función de la composición de su genoma. Por un lado, se encuentran los virus con RNA monocatenarios de polaridad positiva, como los miembros de las familias *Potyviridae* (virus Y de la patata, PVY), *Bromoviridae* (virus del mosaico de la alfalfa, AMV y virus del mosaico del pepino, CMV) o de polaridad negativa como la familia *Ophioviridae*. Como se ha mencionado al principio de esta sección y aunque la familia *Partitiviridae* está constituida por virus de RNA bicatenario (Petrzik, 2019), la mayoría de los virus de plantas ($\approx 80\%$) contienen genomas de RNA monocatenario con un tamaño que oscila entre 2,5 y 10 kb, estando muchos de ellos entre 4 y 6 kb. Los síntomas de la infección viral se producen como resultado de complejas interacciones entre el virus y su planta huésped (Pallás and García, 2011). El aumento de la acumulación del virus en la planta puede producir daños en la fisiología de la misma, ya sea por la propia replicación del virus, o por los efectos producidos por la respuesta inmune de la planta, lo que da lugar a múltiples síntomas y patologías (García & Pallás, 2015; Jiang & Zhou, 2023).

Los virus de plantas causan cerca de la mitad de las enfermedades que afectan a muchos cultivos alrededor del mundo. En la actualidad, más del 50 % de las enfermedades emergentes de las plantas son inducidas por virus, provocando anualmente, pérdidas de entre el 10-15 % de las cosechas, cuyo impacto económico se estima en más de 30.000 millones de dólares anuales (Savary et al., 2019) (Jones & Naidu, 2019; Pallás et al., 2021). Por tanto, las enfermedades inducidas por virus suponen una amenaza mundial para la producción de los cultivos, la seguridad alimentaria y la diversidad de cultivares que, además, se está incrementando debido a dos razones principales. En primer lugar, las condiciones ambientales variables causadas por el cambio climático hacen que las epidemias sean más difíciles de gestionar. En segundo lugar, el crecimiento de la población está forzando cambios en las técnicas agrícolas (extensificación, intensificación y diversificación) que favorecen la transmisión entre especies y, por tanto, facilitan nuevas epidemias: virus endémicos que invaden nuevos cultivos o cultivos tradicionales infectados por nuevos virus (Jones, 2016).

Normalmente, el control de la diseminación de estos virus es muy complicado y se lleva a cabo básicamente con dos estrategias diferentes. La primera consiste en la reducción del inóculo y su dispersión. Esto se consigue con la eliminación de las plantas infectadas y las de aquellas

que puedan actuar como reservorios, así como el control de los vectores a través de la aplicación de plaguicidas. Estos químicos pueden llegar a ser nocivos para la salud humana y contribuir a la contaminación del medioambiente. Por tanto, es necesaria la búsqueda de métodos alternativos a su uso, para así mejorar el rendimiento de las cosechas y reducir los posibles efectos secundarios mencionados. La segunda estrategia consiste en la introducción de resistencias en cultivos de interés agronómico que, hasta que la legislación sobre organismos modificados genéticamente permita su uso libre, se realiza por mejora genética clásica.

Para poder luchar contra el impacto negativo generado por las patologías virales es fundamental comprender tanto los aspectos de la biología de los virus, como sus mecanismos de interacción con sus huéspedes que desencadenan la susceptibilidad o resistencia de estos. Las plantas han desarrollado diferentes capas de defensa frente a las infecciones virales. En primer lugar, el virus necesita superar una serie de barreras físicas y químicas preexistentes en las plantas. Si un virus patógeno logra superar esta primera línea de defensa, tendría que enfrentarse a las reacciones defensivas no específicas con las que la planta responde a unos patrones moleculares comunes a distintos patógenos (Jones & Dangl, 2006). Si un virus ha evolucionado para adquirir factores de virulencia que contrarresten esta defensa basal, está en capacidad de poder desencadenar la infección. En muchos casos, sin embargo, las plantas son capaces de reconocer estos factores de virulencia y crear una nueva capa de resistencia más específica que sólo se induce ante virus que expresan este factor de virulencia (Jones & Dangl, 2006). Un virus puede causar infección exitosa sólo en aquellas plantas que no han desarrollado respuestas defensivas específicas a sus factores de virulencia. Por otra parte, el sistema defensivo de las plantas consigue reconocer a las formas bicatenarias de los intermediarios replicativos de los virus de RNA como moléculas invasoras, lo que desencadena una cascada de reacciones celulares que finaliza con la inactivación de la expresión de estas moléculas, un proceso conocido como silenciamiento de RNA o RNAi. En las plantas, el RNAi sigue siendo el mecanismo de defensa antiviral basal más empleado hasta la fecha (López-Gomollón and Baulcombe, 2022), Sin embargo, recientemente, se ha puesto de manifiesto en este contexto que las modificaciones epigenéticas del RNA, especialmente la metilación reversible del nitrógeno de la posición del carbono 6 de la adenosina (N6-metiladenosina ó m6A), además de desempeñar un papel fundamental en la regulación de diversas facetas del metabolismo del RNA, puede funcionar como un sistema de regulación antiviral en las plantas.

1.2 Modificaciones de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos, como el RNA y DNA, son polímeros de gran importancia, ya que codifican la información necesaria para determinar la composición de las proteínas y su ensamblaje con otras macromoléculas (Belmont et al., 2001). El estudio de sus funciones y estructura ha sido de vital importancia para la comprensión de los sistemas biológicos y se remonta a más de un siglo y medio atrás, con el descubrimiento del DNA por Friedrich Miescher en 1869 (Weaver,

2012). Aunque desde entonces su estudio ha sido extenso, no ha sido hasta hace unos años cuando se ha visto que los ácidos nucleicos no sólo están formados por los cinco nucleósidos básicos: adenosina, guanósina, citosina, uridina (solo en el RNA) o timidina (solo en el DNA) (Grosjean, 2009), sino que estos nucleósidos pueden ser modificados químicamente, aumentando la complejidad de los genomas y actuando como un mecanismo de regulación de la expresión génica (Ontiveros et al., 2019). Estas modificaciones se han observado en todos los tipos de RNA y DNA (Duechler et al., 2016).

La primera modificación que se descubrió fue la referente a la N⁵-metilcitosina (m5dC), en 1925 por Johnson y Coghill en el genoma del agente causal de la tuberculosis, la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Grosjean, 2009). Su hallazgo pasó algo desapercibido porque en ese momento no se entendía completamente su función biológica. No fue hasta los años 1940-1950 cuando, especialmente con los estudios de Rollin Hotchkiss en otros organismos como ratones y células humanas, se comprendiera realmente el papel funcional de este “quinto” nucleósido en la regulación y en la expresión génica (Hotchkiss, 1948). Sin embargo, se han descrito relativamente pocas modificaciones del DNA, siendo las más comunes las metilaciones simples, como lo son la N⁶-metiladenosina (m6dA), la N⁴-metilcitosina (m4dC) o la nombrada anteriormente (m5dC) (Grosjean, 2009). Estas metilaciones tienen importancia tanto en procariontes, donde protegen el genoma del huésped de su degradación por endonucleasas, como en eucariotes, donde tienen funciones relacionadas con la regulación génica, la impronta genética y el desarrollo embrionario (Cheng, 1995).

Por otro lado, las modificaciones del RNA son mucho más complejas que las del DNA, ya que todas las posiciones de un anillo de pirimidina pueden ser modificadas de forma post-transcripcional, ya no sólo por metilación o hidroxilación, sino además por una serie de modificaciones como lo pueden ser la desaminación, oxidación, ribosilación, reducción o acetilación (Grosjean, 2009). Se han descrito más de 170 modificaciones distintas desde el descubrimiento de la pseudouridina por Davis y Allen (1957), denominándose a este conjunto como epitranscriptoma (Esteve-Puig et al., 2020). De forma general, este tipo de modificaciones ocurren en el RNA de transferencia (tRNA) y ribosomal (rRNA), aunque también se han descrito algunas que actúan sobre RNA mensajero (mRNA) (Baquero-Pérez et al., 2021). Estas modificaciones presentan un gran número de funciones sobre el mRNA, como lo son su procesamiento, traducción y regulación de su expresión (Esteve-Puig et al., 2020).

1.3 Efectos e importancia de la modificación N6-metiladenosina (m6A) en la regulación y procesamiento del RNA.

La N⁶-metiladenosina (m6A) es un tipo de metilación reversible que sucede en la posición N6 de la adenosina y que afecta, además de a los mRNA, tRNA y rRNA, a RNAs no codificantes pequeños y largos (He et al., 2019). En la década de 1970, la m6A se identificó en hidrolizados de mRNA procedentes de una línea de células tumorales de rata (Desrosiers et al., 1974) y, unos años más tarde, también se encontró en RNA de maíz (Nichols & Welder, 1981), virus de animales, levadura y bacterias (ver revisión en López-Pérez et al., 2021). Los primeros estudios

sobre la modificación m6A fueron descriptivos y se centraron en identificar los sitios de metilación del RNA mostrándose que su distribución estaba conservada en humanos y ratones. Poco después de su descubrimiento se intentó caracterizar la función de esta modificación alterando la misma y observando sus consecuencias en la fisiología y desarrollo de los organismos estudiados. Entonces, la presencia de m6A se relacionó con la inestabilidad del mRNA y se estableció que es una modificación clave que regula la vida media de los mRNA y, por lo tanto, influye en la expresión génica (Sommer et al., 1978). Pero no fue hasta casi veinte años después cuando se caracterizó la principal m6A metiltransferasa de RNA, la metiltransferasa de tipo 3, METTL3 (Bokar et al., 1994). Posteriormente, se demostró que los homólogos de METTL3 son necesarios para el éxito de los procesos de germinación de semillas de Arabidopsis y de esporulación de levaduras (Zhong et al., 2008). Inicialmente se consideró el marcaje m6A como algo estable, pero en 2011 se descubrió la primera desmetilasa de m6A, la proteína FTO (Fat mass and obesity-associated protein) (Jia et al., 2011), y poco después se identificó la segunda, ALKBH5 (Alkylation Repair Homolog 5) (Zheng et al., 2013), cambiando esa concepción original y pasando a ser considerando un proceso dinámico y reversible como se verá más adelante.

Hoy en día, está bien establecido que la metilación m6A es la modificación interna más prevalente en los mRNA eucariotas e influye en el destino y la función de los transcritos procesados. Es una modificación selectiva que se produce sobre la secuencia (R)RACH (R=A/G, H=A/C/U) (ver Duan et al., 2017 y Arribas-Hernández & Brodersen, 2020 para una revisión) y está enriquecida cerca de los codones de parada y en las 3' UTR (untranslated región o región no traducible). En mamíferos, hay una media de uno a tres residuos m6A por mRNA, pero, mientras que la mayoría de los mRNA solo tienen un sitio de modificación, otros pueden tener más de veinte (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012; Schwartz et al., 2014; Linder et al., 2015)). El transcriptoma de Arabidopsis contiene 0,5-0,7 picos de m6A por cada 1000 nucleótidos o de 0,7-1,0 picos de m6A por cada transcripción expresada activamente (Luo et al., 2014). Los genes con mayor presencia de m6A están implicados en la respuesta a la variación ambiental (Dominissini et al., 2012) y el desarrollo (Meyer et al., 2012), mientras que los niveles de m6A de los genes constitutivos son bajos en cultivos celulares de levadura y mamíferos (Schwartz et al., 2014; Ke et al., 2017). A diferencia de los mamíferos, los genes constitutivos, como los factores ribosomales y fotosintéticos, forman parte del mRNA enriquecido en m6A en Arabidopsis (Luo et al., 2014; Wan et al., 2015; Shen et al., 2016).

1.4 Proteínas implicadas en la modificación m6A en animales y plantas.

La modificación m6A está regulada por tres tipos de proteínas comúnmente denominadas proteínas escritoras o “writers” (m6A metiltransferasas), borradoras o “erasers” (m6A desmetilasas) y lectoras o “readers” (proteínas de unión a m6A). Las “writers” y “erasers” realizan la adición y eliminación reversible de esta modificación, respectivamente (Jiang et al., 2021), controlando la prevalencia y distribución de la marca m6A en el mRNA. En cambio, las proteínas lectoras, al reconocer esta modificación, determinan la estabilidad y/o el destino

celular del transcrito. En la Figura 1 se muestran los componentes de la maquinaria m6A mejor caracterizados en Arabidopsis. Las principales funciones relacionadas con cada uno de ellos se explican en las siguientes secciones.

1.4.1 Proteínas escritoras o “writers”

La incorporación de la modificación m6A al mRNA ocurre mediante un complejo compuesto por varias proteínas (Esteve-Puig et al., 2020). De acuerdo con la existencia de un motivo de metilación común, este complejo dependiente de S-adenosil-L-metionina (SAM) está conservado en eucariotas. En mamíferos, se identificaron inicialmente dos subcomplejos esenciales para la actividad metiltransferasa completa, MT-A y MT-B (Bokar et al., 1994). MT-A está constituido por dos subunidades distintas, la enzima catalítica METTL3 que utiliza SAM como sustrato donador del grupo metilo y el activador alostérico METTL14 que facilita la unión al mRNA (Bokar et al., 1997). Los cofactores adicionales que componen MT-B son la proteína asociada al tumor de Wilms (WTAP) (Ping et al., 2014), la proteína asociada a la metiltransferasa Vir-like m6A (VIRMA o KIAA1429) (Schwartz et al., 2014), la ubiquitina-proteína ligasa E3 CBLL1 o HAKAI (Horiuchi et al., 2013), la proteína Zn finger ZC3H13 y las proteínas de unión a RNA RBM15/15B (Knuckles et al., 2018). En plantas, el núcleo catalítico está formado por dos proteínas de la familia MTA-70, MTA, homóloga de METTL3 y MTB, homóloga de METTL14. Hasta ahora, los cofactores descritos son FKBP12 interacting protein 37 (FIP37), homóloga de WTAP, VIRILIZER, homóloga de VIRMA y la E3 ubiquitina ligasa HAKAI ; (Shen et al., 2016) Růžička et al., 2017) (Figura 1). En mamíferos, METTL5 y ZCCHC4 fueron identificadas como las enzimas responsables de la modificación m6A de los rRNA 18S y 28S, respectivamente (van Tran et al., 2019). Además, los rRNA estructurados que contienen la secuencia UAC(A)GAGAA son metilados por METTL16, que también parece unirse a los RNA nucleares pequeños (snRNA) U6, los RNA no codificantes, los RNA no codificantes largos y los pre-mRNA (Pendleton et al., 2017; ;Warda et al., 2017). FIONA1 es el homólogo en plantas de METLL16 (Kim et al., 2008), pero, mientras que el complejo MTA/MTB es sin duda el principal responsable de la metilación de m6A en Arabidopsis, no se ha comprobado la capacidad metiltransferasa de m6A de FIONA1 (Zhong et al., 2008; Shen et al., 2016; Růžička et al., 2017; Anderson et al., 2018). Por último, aún no se han encontrado en plantas ni ortólogos del ZC3H13 de mamíferos ni de METLL5 y ZCCHC4.

1.4.2 Proteínas lectoras o “readers”

Las proteínas lectoras de m6A mejor caracterizadas contienen el denominado dominio de homología YT521-B (YTH) (Ito et al., 1998). Los dominios YTH conforman dos grupos evolutivos denominados clados DC y DF. En plantas, la familia YTH es más extensa que mamíferos. En concreto, la familia YTH de Arabidopsis está compuesta por 11 proteínas YTHDF con la región c-terminal evolutivamente conservada (ECT1-11), dos proteínas YTHDC de función desconocida y el factor de especificidad de división y poliadenilación 30 (CPSF30), mientras que el genoma del arroz codifica doce proteínas YTH (OsYTH1-12). Los dominios YTH están altamente conservados entre las proteínas del arroz y Arabidopsis (Scutenaire et al., 2018).

Arabidopsis CPSF30 y OsYTH09 llevan un dominio de dedo de zinc (ZF) de tipo CCCH, mientras que ECT2 y ECT4-8 presentan una pequeña región enriquecida en residuos Tyr-Pro-Gln (YPQ) similar a los parches PQN encontrados en los YTHDF de humanos (Ries et al., 2019). Además, al igual que en las proteínas YTHDF de mamíferos, se predice que ECT2, ECT3 y ECT4 contienen IDR en sus extremos N-terminales (Arribas-Hernández et al., 2018).

Los análisis experimentales y el examen de datos públicos de micromatrices mostraron que la expresión de las proteínas que contienen dominios YTH en arroz y Arabidopsis depende específicamente del tejido y de la etapa de desarrollo (Ma et al., 2022). Además, se descubrió que varias proteínas ECT de Arabidopsis interactúan con el RNA (Reichel et al., 2016) y, más recientemente, ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron que ECT2 y ECT3 se unen a m6A a través de los residuos aromáticos situados en el bolsillo hidrofóbico de sus dominios YTH (Figura 1) (Arribas-Hernández et al., 2018; Scutenaire et al., 2018). Por otro lado, experimentos de localización subcelular mostraron que ECT1 tiene una localización predominantemente nuclear que podría estar regulada por el calcio (Ok et al., 2005), mientras que, en condiciones normales de crecimiento, ECT2, ECT3 y ECT4 se acumulan según un patrón citoplasmático difuso (Arribas-Hernández et al., 2018; Scutenaire et al., 2018). Curiosamente, tras el estrés osmótico, se observó que ECT2 y ECT4 se agregaban en gránulos citoplasmáticos que raramente colocalizaban con los cuerpos P (Arribas-Hernández et al., 2018), mientras que, en respuesta al estrés térmico, se observó que ECT2 formaba gránulos puntiformes citosólicos que se identificaron como gránulos de estrés (SG). Así, se propuso que el bloqueo de la iniciación de la traducción inducido por el estrés desencadenaría el reordenamiento de las ECT a los SG (Scutenaire et al., 2018). Los autores de este trabajo sugirieron que las regiones ricas en YPQ estarían implicadas en este proceso, ya que ECT2 y ECT4 presentan estos motivos, pero es una característica ausente en ECT3, que no formó estructuras granulares en la misma medida tras el estrés osmótico (Arribas Hernández et al., 2018).

1.4.3 Proteínas borradoras o “erasers”

Las m6A “erasers” son desmetilasas que transforman m6A en A mediante desmetilación activa (Zaccara et al., 2019; Shi et al., 2019). Aunque METTL3 fue descubierta como “writer” hace varias décadas, la existencia de las desmetilasas pasó desapercibida hasta la pasada década, cuando el grupo de la Dra. Jia demostró que FTO ejercía una actividad desmetilasa (Jia et al 2011), al igual que ALKBH5, que fue descubierta más tarde (Zheng et al., 2013). La demostración de esta actividad desmetilasa supuso la primera evidencia de una modificación post-transcripcional potencialmente reversible del RNA. Las proteínas que se encargan de la eliminación del grupo metilo de m6A pertenecen a la familia de las homólogas de la proteína de alquilación B (AlkB) de *Escherichia coli* (Reichel et al., 2019). Dada su relevancia para nuestro trabajo, profundizaremos en ellas en la siguiente sección.

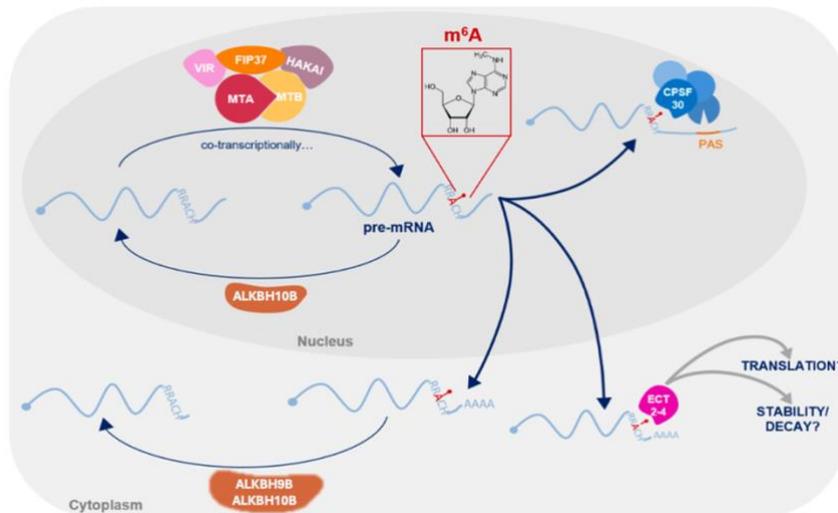


Figura 1: Representación esquemática de las rutas de regulación mediada por m⁶A en Arabidopsis. Se muestran los componentes conocidos del complejo “writer” de m⁶A, así como las proteínas “eraser” y “reader” descritas por el momento y sus posibles funciones moleculares. Aunque se cree que la metilación m⁶A ocurre de forma co-transcripcional, no hay evidencias sobre la localización subcelular donde tiene lugar el proceso de desmetilación. PAS, señal de poliadenilación.

1.5. La familia de proteínas AlkB: contexto, descubrimiento y estructura molecular

La familia de proteínas AlkB está conservada en todos los organismos excepto las arqueas y las levaduras, y forma parte de la superfamilia de las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato y Fe (II) (Aravind & Koonin, 2001). En general, estas proteínas revierten el daño por alquilación en ácidos nucleicos, pero pueden mostrar preferencia por diferentes sustratos como RNA, DNA o proteínas y eliminar varios grupos alquilo, como m⁶A o 5-metilcitosina (Fedeles et al., 2015). Cabe destacar que antes del descubrimiento de estas proteínas con actividad de desmetilación de m⁶A se pensaba que la modificación m⁶A era una marca estable en el mRNA. Sin embargo, este hallazgo sugirió un posible papel regulador de la metilación del RNA que podría variar en respuesta a diferentes estímulos celulares (Jia et al., 2011). Además, se ha demostrado que diversas enfermedades, como el cáncer, la obesidad y las enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con alteraciones en la actividad de las desmetilasas de m⁶A (Song and Yan, 2024; Azzam et al., 2022). Por tanto, el conocimiento sobre las desmetilasas de m⁶A ha generado un gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos que puedan modular su actividad para el tratamiento de enfermedades.

1.5.1 La familia AlkB en animales y plantas.

En los mamíferos, hay nueve proteínas homólogas de AlkB (ALKBH1-8 y FTO), pero sólo ALKBH5 (Alkylation Repair Homolog 5) y FTO se han caracterizado como borradores de m⁶A (Jia et al., 2011; Zheng et al., 2013). ALKBH5 se acumula en cuerpos nucleares, por lo que se cree que desmetila m⁶A de los RNA nucleares durante su síntesis (Zheng et al., 2013). FTO se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células Huh7 de hepatoma humano, lo que sugiere que esta proteína puede desmetilar mRNA nucleares y citoplasmáticos (Gokhale

et al., 2016). Más tarde se descubrió que FTO actúa preferentemente sobre los RNA que contienen m6A pero que además están metilados en la posición 2' de la ribosa, es decir influye en la estabilidad de los mRNA marcados con N6-dimetiladenosina (m6Am) (Mauer et al., 2017). Esta modificación se encuentra comúnmente en la estructura CAP presente en el extremo 5' de los mRNA, pero también en otros RNA como los snRNA (small nuclear RNA) y snoRNA (small nucleolar RNA), por lo que la principal función biológica propuesta para FTO, asignada recientemente, sería la modulación del procesamiento de pequeños RNA nucleares en el núcleo (Mauer et al., 2019).

En Arabidopsis, hay 13 proteínas homólogas de AlkB (AtALKBH1A-D, AtALKBH2, AtALKBH6, AtALKBH8A-B, AtALKBH9A-C, AtALKBH10A-B), que, en protoplastos, se encontró que se acumulan en seis posibles localizaciones subcelulares: nucleocitoplasmática, nucleocitoplasmática con predominio nuclear o citoplasmático, nucleocitoplasmática y cloroplasto, y exclusivamente nuclear o citoplasmática (Mielecki et al., 2012). De entre éstas, ALKBH9A, 9B, 9C, 10A y 10B son las que muestran una mayor similitud con su homólogo en mamíferos ALKBH5 (Marcinkowski et al., 2020). Sin embargo, solo se ha demostrado que ALKBH9B (Martínez-Pérez et al., 2017) y ALKBH10B (Duan et al 2017) y más recientemente ALKBH9C (Amara et al., 2022) tienen la capacidad de eliminar el grupo metilo de m6A. Mientras ALKBH9B se localiza en gránulos citoplasmáticos involucrados en la degradación de RNA (Martínez-Pérez et al., 2017), ALKBH10B afecta la estabilidad de los mRNA y tiene un impacto directo en procesos fisiológicos como la floración (Duan et al., 2017) y ALKBH9C regula la respuesta de Arabidopsis al estrés abiótico y al ABA (Amara et al., 2022).

1.5.2 Dominios de unión conservados

Aunque existe una baja conservación en la secuencia de aminoácidos entre los homólogos AlkB, los dominios clave de su estructura se encuentran muy conservados. Las regiones de *atALKBH9B* responsables de la unión al RNA y a la proteína de la cápside viral (CP), así como aquellas necesarias para su localización en los gránulos de estrés se observan en la Figura 2A. La unión a la CP y al RNA se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína, la primera superponiéndose parcialmente con el dominio similar a AlkB, mientras que el dominio de unión al RNA (RBD) está parcialmente incrustado en la región intrínsecamente desordenada (IDR) predicha en el C-terminal. El sitio activo de estas enzimas se ubica en el característico núcleo en remolino de las 2-OG oxigenasas, un plegamiento formado por 8 β -láminas emparejadas de dos en dos en forma helicoidal que da forma al núcleo catalítico donde se unen cofactor y cosustrato utilizando una serie de residuos conservados (Figura 2B). Algunos de ellos son el motivo HXD, conservado universalmente, y el aminoácido H, ambos responsables de la unión a Fe (II). El otro motivo conservado es RXXXXXR (donde X indica cualquier aminoácido), el cual se encarga de la unión con 2-OG (Moore and Meng, 2019) (Figura 2).

señal proviral o antiviral, mientras que, para otras, su presencia parece potenciar y/o inhibir la infectividad dependiendo del contexto de metilación (Figura 3) (Williams et al., 2019).

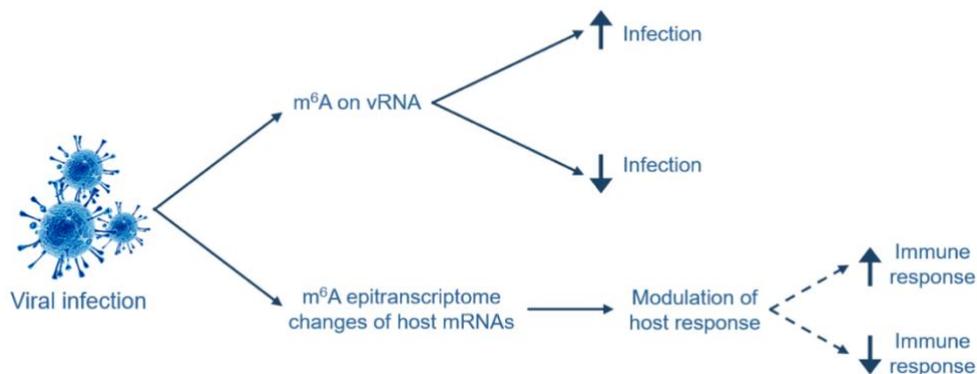


Figura 3: Regulación m6A de las infecciones víricas en animales. La maquinaria del huésped puede metilar los vRNA, favoreciendo o perjudicando el proceso de infección. La infección vírica también podría producir cambios en el epitranscriptoma m6A del hospedador, modulando la respuesta de éste y afectando, por ejemplo, a genes implicados en la respuesta inmunitaria.

Paralelamente, y con algo más de retraso, se están descubriendo las funciones de la modificación de m6A en la modulación de la infección viral también en virus de plantas (Shen et al., 2016). Mediante secuenciación del RNA metilado obtenido por inmunoprecipitación específica con anti-m6A (MeRIP-Seq), se ha demostrado que el genoma de dos miembros destacados de la familia *Bromoviridae*, el AMV y el CMV, presentan modificaciones m6A en sus RNA genómicos (Martínez-Pérez et al., 2017). Dos de estos sitios de metilación m6A en la 3'-UTR del RNA3 de AMV están implicadas en la replicación y/o acumulación la polaridad positiva del RNA3 (Alvarado-Marchena et al., 2022). A este descubrimiento le han seguido muchos otros ejemplos como el caso del virus del enanismo negro rayado del arroz (RBSDV), el virus de la raya del arroz (RSV), el virus de la viruela del ciruelo (PPV), el virus Y de la patata (PVY), el virus del mosaico amarillo del trigo (WYMV) y el virus del mosaico del pepino (PepMV) (ver revisión en He et al., 2023). Al igual que lo que se ha descrito en animales, las infecciones virales en plantas alteran la dinámica de la modificación m6A de los RNA del huésped. La frecuencia de la modificación m6A en tabaco (*Nicotiana tabacum*) mostró una reducción significativa tras la infección con el virus del mosaico del tabaco (TMV), acompañada de un aumento en la expresión de la correspondiente desmetilasa (Li et al., 2018) Un resultado similar se ha descrito en plantas de *N. benthamina* infectadas con PPV y PVY (Yue et al., 2022). Sin embargo, también se ha visto un efecto contrario en arroz infectado con RSV and RBSDV (Zhang et al., 2021) y en cultivares de sandía susceptibles al virus del mosaico verde jaspeado del pepino (CGMMV) (He et al., 2021). Este descubrimiento implica que las infecciones virales en plantas provocan una modificación de los niveles m6A que podría alterar la expresión génica y servir como un mecanismo regulador utilizado por las plantas para contrarrestar eficazmente las infecciones virales.

De manera significativa, se ha descubierto que los genomas de varios virus de RNA monocatenario de plantas contienen una secuencia conservada correspondiente al dominio de alquilación B (AlkB), que es un componente de las desmetilasas m6A, en sus replicasas (Martínez-Pérez et al., 2017; He et al., 2023). Entre estos virus se encuentran los miembros de la familia *Flexiviridae*, incluyendo el virus A de la vid (GVA), el virus de la quemadura del arándano (BIScV) y el virus Y de la zarzamora (BVY), así como un nuevo género sin nombre de la familia *Potyviridae*. Este dominio AlkB puede estar implicado en la reparación de daños en el RNA metilado y desempeña un papel importante en la eliminación de genomas virales de RNA dañados y en el mantenimiento de la estabilidad del RNA viral (Van Den Born et al., 2008). Aunque no existen pruebas de la función desempeñada por estos dominios in vivo, estos hallazgos confirman que algunos virus de plantas pueden haber desarrollado respuestas a este mecanismo de defensa del huésped basado en la modificación m6A que puede ser una técnica utilizada por las plantas para modular finamente sus respuestas a una infección viral. De hecho, el eje de las proteínas lectoras del tipo ECTs en plantas se ha demostrado constituir una barrera de defensa antiviral en el patosistema AMV-Arabidopsis y se especula que pudiera ser más general de lo observado (Martínez-Pérez et al., 2023). Sin embargo, aunque en algunos casos el marcaje del genoma viral con m6A tiene un efecto antiviral, en otros los virus pueden adquirir modificaciones m6A como un mecanismo para favorecer la estabilidad del RNA genómico y la infección, como veremos a continuación.

1.6.1 Modificaciones m6A que favorecen la infección viral: el virus del mosaico amarillo del trigo (WYMV)

La modificación m6A puede influir de forma positiva en la infección del virus, promoviéndola. Después de que el virus entre en la célula huésped y se desprenda de su cubierta para liberar su gRNA, este es utilizado como molde y traducido por la maquinaria traduccional del huésped. Las secuencias de codones almacenadas en el RNA vírico se convierten en secuencias de aminoácidos y se traducen, inicialmente, los productos relacionados con la replicación del genoma vírico. La acumulación y/o expresión de las proteínas de la planta huésped cambian en respuesta a la infección viral, y varias metiltransferasas pueden interactuar con proteínas virales y promover la infección viral. Durante la infección por el virus del mosaico amarillo del trigo (WYMV), las variedades de trigo resistentes y susceptibles muestran una variación significativa en sus patrones de modificación m6A. Los perfiles de m6A en todo el transcriptoma de variedades de trigo resistentes y susceptibles infectadas por el WYMV revelaron que las diferentes modificaciones de m6A pueden alterar las vías de interacción huésped-patógeno regulando la expresión de genes relacionados (Zhang et al., 2022). Esta conclusión se deduce del hecho que los genes diferencialmente metilados identificados en estos estudios están estrechamente relacionados con los mecanismos de defensa de las plantas y su resistencia frente a los patógenos. Aunque se requieren más investigaciones experimentales para validar el impacto regulador de las modificaciones m6A del RNA en la expresión de estos genes durante la defensa de la planta contra la infección viral, estos pueden considerarse candidatos potenciales para investigar las estrategias empleadas

por el trigo para resistir las infecciones víricas y para comprender los mecanismos a través de los cuales los virus invaden eficazmente las plantas de trigo.

Por otro lado, la translocación de la metiltransferasa B m6A del trigo (TaMTB) del núcleo a agregados citoplasmáticos, y probablemente a los complejos de replicación viral, se ve facilitada por su interacción con la replicasa Nib del WYMV. Esta interacción conduce a un aumento de los niveles de m6A del RNA 1 de WYMV y a su estabilización, facilitando así la infección. Pero a la vez, este secuestro de la TaMTB por parte de Nib disminuiría los niveles de metilación en el núcleo, especialmente sobre los mensajeros relacionados con resistencia favoreciendo así la infección. Existe un alelo mutante natural TaMTB-SNP176A que confiere una mayor resistencia a la infección por WYMV, ya que presenta una menor afinidad por Nib. Este alelo puede ser un candidato útil en la mejora molecular del trigo en el futuro (Zhang et al., 2022). Es hasta ahora el único caso descrito para el que la modificación m6A tiene un efecto proviral en un patosistema vegetal.

1.6.2 Modificaciones m6A que impiden la infección viral: el virus del mosaico de la alfalfa (AMV)

Como se ha comentado anteriormente, ALKBH9B posee la capacidad de eliminar el grupo metilo de m6A (Martínez-Pérez et al., 2017). Además, mostró esta actividad desmetilasa tanto *in vitro* como *in vivo*, causando efectos directos sobre la infectividad de AMV, indicando que posee un papel en la regulación de ciertas infecciones virales. Como se ha apuntado anteriormente, se ha demostrado que ALKBH9B se localiza en gránulos citoplasmáticos correspondientes a cuerpos de siRNA asociados con gránulos relacionados con degradación del mRNA mediada por genes sin sentido (NMD, de sus siglas en inglés), lo que sugiere que la actividad de ALKBH9B podría estar relacionada con los procesos de degradación del mRNA (Martínez-Pérez et al., 2017). Así, la disminución de la carga viral observada en protoplastos del mutante nulo de *Arabidopsis alkbh9b* podría estar causada por la menor estabilidad, disponibilidad, abundancia o vida media ocasionada(s) por una excesiva metilación m6A en los RNA virales. Curiosamente, los ensayos de hibridación *in situ* de las hojas inoculadas revelaron la presencia de pequeñas zonas individuales de hibridación que apuntan a posibles limitaciones en el movimiento de célula a célula (Martínez-Pérez et al., 2017) y el movimiento vascular (Martínez-Pérez et al., 2021). Es concebible que las interacciones entre las proteínas residentes en el plasmodesmo y los RNA del AMV y, en consecuencia, el movimiento célula a célula o el sistémico, puedan verse afectadas por el estado de metilación de los RNA virales. Reforzando esta hipótesis, Liu et al. (2017) encontraron que la abundancia de m6A aumenta el reconocimiento de los RNA por la ribonucleoproteína nuclear heterogénea G, lo que demuestra que la deposición de m6A en los RNA puede inducir cambios estructurales que alteran la accesibilidad del RNA a las proteínas de unión a RNA. Consistente con el resultado anterior, la disminución de los homólogos de AlkB de *N. benthamiana* del clado específico de plantas ALKBH9 causó una disminución significativa en la acumulación de PPV y PVY (Yue et al. 2022). Además, la sobreexpresión de homólogos de NbMETTL (NbMETTL1 y NbMETTL2) promovió la resistencia a PPV en *N. benthamiana* (Yue et al. 2023). Recientemente, Martínez-

Pérez et al. encontraron que la mutación del módulo ECT2/ECT3/ECT4/ECT5 en *Arabidopsis* disminuye la resistencia al AMV y que el aumento de la resistencia al AMV de los mutantes *alkbh9b* podría revertirse mediante deficiencias de ECT2/ECT3/ECT4/ECT5, indicando que el eje lector de m6A constituía una nueva capa de defensa antiviral basal en plantas (Martínez-Pérez et al. 2023). Así pues, la ruta de metilación m6A del hospedador puede representar un mecanismo regulador adicional para contrarrestar la infección por algunos virus de plantas. Sin embargo, AMV ha sido capaz de desarrollar un mecanismo de contradefensa mediante la interacción y secuestro de ALKBH9B por su proteína de cubierta (CP), subvirtiendo la función desmetilasa de ALKBH9B en su propio beneficio (Martínez-Pérez et al. 2023).

1.7 Familias de virus que contienen el dominio AlkB en sus replicasas

Llama la atención la presencia de un dominio AlkB en la replicasa de varios virus de RNA de cadena simple con polaridad positiva de plantas (Aravind & Koonin, 2001). La presencia de un dominio AlkB es notable, teniendo en cuenta la limitada capacidad de codificación de estos virus con genomas de hasta solo 7 kb. Las principales familias que presentan este dominio son *Closteroviridae*, *Betaflexiviridae* y *Alphaflexiviridae* (Moore and Meng, 2019). Es destacable además que la mayoría de los virus que presentan este dominio, son importantes patógenos de plantas perennes y leñosas, tales como los árboles frutales, ocasionando grandes pérdidas a nivel económico (Rubio-Costa, 2021). Como se ha mencionado anteriormente, la relevancia de este dominio durante una infección no se ha demostrado. Sin embargo, podría tratarse de un mecanismo de contradefensa viral, en *cis*, frente a la modificación m6A inducida por las metilasas del huésped, similar al observado, en *trans*, con la proteína de cubierta del AMV y ALKBH9B.

1.7.1 Familia Closteroviridae

La familia *Closteroviridae* está formada por una serie de especies virales que infectan a plantas, siendo estas principalmente dicotiledóneas. Estos virus poseen unas partículas largas, filamentosas y de estructura helicoidal (650-2200 nm en longitud y 12 nm en diámetro), así como un genoma de RNA de cadena simple que puede ser mono, di o tripartito. Se caracterizan por presentar uno de los genomas más largos dentro de los virus que infectan a plantas (13-19 kb). Dentro de esta familia se encuentran los géneros *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Crinivirus* y *Velarivirus*. Su transmisión se produce a través de insectos, especialmente áfidos, moscas blancas, cochinillas y cocoideos (Fuchs et al., 2020). De esta familia, los homólogos de Alkb se han identificado únicamente en el género *Ampelovirus*. En su genoma, las pautas de lectura (ORF) 1A y 1B codifican la replicasa que contiene tres dominios necesarios para la replicación viral: metiltransferasa (MTR), helicasa (HEL) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). El dominio AlkB se encuentra insertado dentro de esta proteína, entre los dominios MTR y HEL, característica que es compartida con el resto de las AlkB virales (Moore and Meng, 2019). La mayoría de los miembros del género *Ampelovirus* infectan huéspedes leñosos, en los que, según su hospedador, provocan distintos efectos, tales como el moteado, el amarilleo y enrojecimiento de hojas, picado del tallo,

marchitamiento o infecciones asintomáticas (Fuchs et al., 2020).

1.7.2 Familia *Alphaflexiviridae*

La familia *Alphaflexiviridae* incluye especies virales que infectan a plantas y a hongos fitófagos. Los viriones son flexibles y filamentosos, dando nombre a la familia, normalmente con 12-13 nm de diámetro (en un rango de 10-15 nm) y con una longitud de entre 470-800 nm dependiendo del género. En la actualidad, esta familia forma parte del orden de los *Tymovirales*, y está constituida por los géneros *Allexivirus*, *Botrexvirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus*, *Platypuvirus*, *Potexvirus* and *Sclerodarnavirus*, incluyendo más de 50 especies. Presentan un genoma de RNA de cadena simple con polaridad positiva de entre 5,5-9 kb, lo cual supone entre un 5-6 % del peso del virion. Dependiendo del género presentan de 5 a 7 genes, exceptuando el género *Sclerodarnavirus*, que sólo presenta uno (Kreuze et al., 2020). En cuanto a la replicación, la proteína codificada en el ORF1 (ORF2 en miembros del género *Platypuvirus*) tiene homología con las proteínas asociadas con la replicación del supergrupo de virus de RNA "Alphavirus-like". Esta proteína (150-190 kDa) presenta los motivos conservados MTR, HEL y RdRp (Batten et al., 2003), incluyendo además, entre estos dos últimos motivos, el dominio AlkB (Van Den Born et al., 2008). En todos los miembros de la familia que infectan plantas, a excepción de los miembros del género *Platypuvirus*, los ORF 2-4 codifican las proteínas del bloque de tres genes (TGB), implicadas en el movimiento de célula a célula (Verchot-Lubicz et al., 2010) , y el ORF5 codifica la proteína de la cápside viral, siendo toda esta replicación citoplasmática.

1.7.3 Familia *Betaflexiviridae*

Esta familia está compuesta por un elevado número de miembros que contienen el dominio AlkB en su genoma (Moore and Meng, 2019). De forma similar a la familia *Alphaflexiviridae* (anteriormente ambas familias, junto con *Gammaflexiviridae*, eran una única con el nombre de *Flexiviridae*), presentan viriones flexibles y filamentosos con una longitud de entre 600-1000 nm y un diámetro de entre 10-15 nm, dependiendo del género. Esta familia es la más amplia dentro del orden de los *Tymovirales*, comprendiendo los géneros *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Chordovirus*, *Divavirus*, *Prunevirus*, *Ravavirus*, *Tepovirus*, *Wamavirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus*, *Robigovirus* y *Vitivirus*, siendo, a excepción del género *Carlavirus*, patógenos naturales de especies leñosas (Lefkowitz et al., 2018). Presentan un genoma de RNA de cadena simple con polaridad positiva de entre 5,9-9 kb. El número de genes es de 3 a 6 dependiendo del género, pero en todas las especies el producto codificado en el ORF1, que sigue una secuencia 5'-UTR corta, tiene homología con las polimerasas del supergrupo de virus de RNA "alphavirus-like". Esta proteína, al igual que ocurre en la familia *Alphaflexiviridae*, presenta de forma conservada los dominios MTR, HEL y RdRp, siendo la replicación citoplasmática (Adams et al., 2004). La mayoría de los miembros de la familia presentan, entre los motivos MTR y HEL, los dominios AlkB y P-Pro (papain-like protease). Los ORF de menor tamaño codifican proteínas que intervienen en el movimiento célula-célula, ya sea una única MP de la superfamilia "30K" o el "TGB" (Adams et al., 2004). Estos suelen encontrarse a

continuación de la polimerasa. Sin embargo, en genomas de capillovirus, el ORF2 se encuentra dentro del ORF1 y en vitivirus hay un ORF adicional entre los genes de la polimerasa y la proteína de movimiento (MP). El gen de la CP siempre sigue al de la MP y, en algunos géneros (*Carlavirus*, *Vitivirus* y algunos trichovirus), un ORF final codifica una proteína con un motivo de dedos de unión a zinc que les permite interactuar con ácidos nucleicos. En vitivirus se ha visto que esta proteína tiene un papel de supresión de la maquinaria de silenciamiento del RNA del huésped (Zhou et al., 2006). Dado que en el trabajo que se presenta en esta memoria se utilizaron dos vitivirus como sistema modelo, GVA y GVB, se les dedicará una sección exclusiva posteriormente.

1.7.4 Otras familias

El dominio AlkB también se ha encontrado en las familias *Secoviridae* y *Potyviridae*, aunque hasta la fecha, sólo un virus de cada familia ha sido identificado como portador de este dominio (Moore and Meng, 2019). Ambas familias presentan un genoma de RNA de cadena simple con polaridad positiva, que puede ser mono o bipartito. Algunos de sus miembros son importantes patógenos de plantas (Wylie et al., 2017).

1.8 Grapevine virus A y B

El cultivo de la vid, su recolecta y propagación vegetativa en la cuenca del mediterráneo y oriente próximo, tiene una historia que abarca cientos de años (This et al., 2006). Las enfermedades ocasionadas por virus, que suponen una alteración de la madera en la vid, denominadas colectivamente complejo de la madera rugosa (RW) (Martelli 2007) incluyen diferentes síndromes que afectan al cilindro leñoso, a los tejidos del cambium y a la corteza. Síntomas como la hinchazón de los tejidos en la unión del injerto y una proliferación más o menos intensa y el agrietamiento de la corteza se manifiestan principalmente en el momento del injerto por lo que no es raro observar estos síntomas en viñedos comerciales. La RW está latente en las especies e híbridos de *Vitis*, ya que la mayoría de los síntomas de esta enfermedad sólo son visibles cuando el material infectado se injerta en el presuntamente sano.

La microscopía electrónica reveló partículas víricas alargadas por el floema en secciones finas de tejidos de vid afectados por el RW o el enrollamiento de la hoja (LR) (Martelli et al., 2002), virus que más tarde fueron caracterizados y nombrados como virus de la vid A (GVA), virus de la vid B (GVB) (Boscia et al., 1993) y virus de la vid D (GVD) (Meng et al., 2017). Estos viriones fueron definidos como “closterovirus like” (Boscia et al., 1993), lo cual sirvió para una asignación inicial de GVA y GVB dentro del género *Trichovirus* (Martelli et al., 1994). Sin embargo, la información procedente de las secuencias de la región 3' (Minafra et al., 1994) confirmaron que estos virus presentan una organización genómica distinta a la del resto de virus que ocasionan el enrollamiento de la hoja y que por tanto, necesitaban una clasificación aparte. Fue entonces cuando, tras avanzar en los análisis de las secuencias se decidió agrupar a estos virus junto con virus latente del heracleum (HLV) (Bem & Murant, 1979) en el género *Vitivirus* (Martelli et al., 1997).

Una característica importante del género es la organización genómica que consiste en una cadena de RNA simple con polaridad positiva y cinco ORF, donde el extremo 5´terminal presenta una caperuza de metil-7-guanosina y en el 3´ una cola de poliA (Figura 4). El gen de mayor longitud, ORF1 (5124 nt), codifica una proteína de 195,5 kDa, la cual presenta los dominios MTR, HEL y RdRp. Dado que no se dispone de evidencias experimentales sobre el procesamiento del producto de traducción de ORF1, ya que se desconoce la presencia de ninguna proteasa, cabría esperar que la poliproteína no fragmentada actuara mediante la activación de sus dominios funcionales (Martelli et al., 2007).

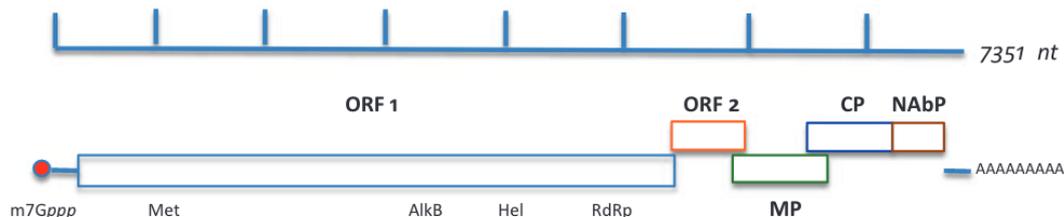


Figura 4: Representación esquemática del genoma de GVA. Los marcos abiertos de lectura (ORF 1-5) están etiquetados o nombrados según su función. Un punto rojo representa la caperuza de metil-7-guanosina en el extremo 5´. La cola poli-A se indica en el extremo 3´. *Met* metiltransferasa, *AlkB* dominio AlkB, *Hel* Helicasa, *RdRp* RNA polimerasa dependiente de RNA, *MP* proteína de movimiento, *CP* proteína de cubierta, *NabP* proteína de unión a ácidos nucleicos (Meng et al., 2017).

Una segunda característica de la proteína codificada por ORF1 es la presencia de un dominio AlkB aguas arriba de HEL. Este dominio activa la reparación de DNA alquilado en numerosos sistemas celulares a lo largo de los diferentes reinos (Bratlie & Drabløs, 2005). Se ha hipotetizado que esta reparación enzimática (como la desmetilación de virus de RNA en la savia del floema) puede favorecer la supervivencia del virus. La mayor aptitud obtenida a través de esta función por los virus que colonizan huéspedes leñosos ricos en polifenoles se habría fijado tras la adquisición por recombinación a partir de bacterias o plantas (Van Den Born et al., 2008).

El ORF2, único de los vitivirus, codifica un polipéptido de 19.8 kDa sin homología conocida. Su análisis sugiere que no es crucial para la replicación en *Nicotiana*, aunque podría desempeñar un papel en la transmisión por insectos o en la infección de la vid (Galiakparov et al., 2003).

Los ORF3 y ORF4 codifican una MP de 30 kDa y una CP, respectivamente. Para ver la relevancia de estas proteínas, utilizaron el marcaje con proteínas fluorescentes y demostraron la estrecha asociación de las MP de GVA y GVB sintetizadas *in vivo* con los plasmodesmos y la acumulación de estas proteínas en puntos determinados como en estructuras similares a túbulos en la periferia de las células de tabaco o vid infectadas. Cabe destacar que, en ausencia de la CP, el movimiento del virus está restringido, lo que indica que la MP no es el único factor determinante para la propagación del virus dentro del hospedador.

Por último, la ORF 5 codifica una pequeña proteína de unión a RNA de 10 kDa (p10), la cual se la ha relacionado con la supresión del silenciamiento del RNA, entre otras funciones (Zhou et al., 2006).

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Tal y como se ha descrito en la Introducción, ciertos virus de RNA monocatenario presentan en su replicasa dominios AlkB conservados, incluidos los motivos de unión a hierro (HXDXnH) y 2-OG (RXXXXXR). Sin embargo, la función específica de estos dominios AlkB en el ciclo de infección de estos virus en planta no se ha estudiado. Por este motivo, el objetivo principal en este trabajo fin de máster será analizar la funcionalidad de los dominios AlkB conservados en las replicasas de los virus A y B de la vid (GVA y GVB) durante la infección, así como la posible implicación de las desmetilasas de tipo ALKBH9B endógenas. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos parciales:

- 1) Establecer un sistema eficiente de silenciamiento de las desmetilasas *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* en *N. benthamiana* mediante el silenciamiento inducido por virus (VIGS)
- 2) Obtener un clon infectivo de GVB en un vector que facilite la posterior obtención de una colección de mutantes con los dominios de unión a hierro y a 2-OG alterados.
- 3) Estudiar la funcionalidad de los dominios AlkB conservados en las replicasas de los virus A y B de la vid (GVA y GVB) durante la infección y determinar el papel de las desmetilasas endógenas en la infección viral mediante bioensayos en *Nicotiana sp.* y el uso de la colección de mutantes de GVA, disponible en el laboratorio, y de GVB, obtenida en el objetivo 2.

Material y métodos

2.1 Material vegetal y cepas de virus utilizados

El material vegetal usado corresponde a plantas de *Nicotiana benthamiana* y *N. occidentalis*, las cuales fueron inicialmente sembradas en semilleros, para dos semanas después de la germinación, ser trasplantadas individualmente a macetas. Las plantas se dejaron crecer en invernadero en condiciones de luz natural suplementada con luz de lámparas halógenas durante 14 horas/día y temperatura controlada a 25 °C/día. Para testar el papel de los dominios AlkB virales, se utilizaron los aislados de 2 especies del género *Vitivirus* que presentan este dominio en su ORF1, los virus de la vid A y B, aislados GVB-935 (GCF_000857765.1) y GVA-P163-M5 (GCF_000855125.1), respectivamente.

2.2 Obtención de los mutantes del dominio AlkB de GVB y clones de GVA utilizados

Para la obtención de los clones de los mutantes de GVB, se partió de un clon infeccioso del aislado GVB-935 cedido por el Dr. DE Goszczynski (Plant Health and Protection, Virology Agricultural Research Council, Pretoria, South Africa). La longitud del vector de clonación original resultó excesiva para la aplicación de las técnicas de mutagénesis de PCR inversa (PCRi) que se detallarán a continuación. Por este motivo se procedió a transferir el cDNA viral al mini vector binario pLX-B2 (3287 bp) (Pasín et al., 2017). Este vector fue modificado en nuestro laboratorio para contener el promotor constitutivo y duplicado del virus del mosaico de la coliflor (35Sx2), así como el terminador del gen del inhibidor I de las proteinasas de patata (PoPit), generando pLX-35S-PoPit. Además, pLX-35S-PoPit está preparado para recibir insertos de DNA mediante la utilización de endonucleasas de tipo IIs. A diferencia de otros tipos de endonucleasas, estas no cortan dentro de la secuencia que reconocen, sino a una distancia fija de ella. Esta característica las hace herramientas muy útiles en la ingeniería genética al poder introducir la secuencia de restricción deseada en cada momento y sin añadir costuras.

A partir del vector original, con el uso de cebadores específicos (Tabla 1), se amplificó el GVB en longitud completa (7,6 kb) por PCR utilizando la DNA polimerasa Fushion (ThermoFisher Scientific). El producto de PCR fue analizado y extraído a partir de un gel de agarosa al 1 % con el uso del kit GeneJET (ThermoFisher Scientific), para después ser digerido con la enzima de restricción BsaI y ligado al vector pLX-35S-PoPit, con el uso de una T4 DNA ligasa (Promega). Transcurridas 16-24 horas a 25 °C, se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α . Con el fin de seleccionar aquellas bacterias portadoras de pLX, el cultivo transformado se sembró en placas de medio Luria Bertani (LB) con kanamicina. Una vez crecidas, la presencia de colonias portadoras del plásmido recombinante pLX(GVB-WT) se comprobó mediante PCR de colonia. En esta técnica se utiliza directamente como molde la propia colonia bacteriana, un oligonucleótido específico del vector, otro del inserto y la DNA polimera GoTaq® G2 Flexi (Promega).

Posteriormente, se procedió a crecer las colonias bacterianas positivas en medio LB líquido para, 12 horas después, realizar la extracción del plásmido recombinante con el kit E.Z.N.A. (Omega Biotek Inc). Una vez extraído el plásmido se secuenció para comprobar que se había insertado la totalidad del virus con la secuencia y orientación correcta. Una vez confirmado esto, se transformaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (resistentes a kanamicina y rifampicina), y tras confirmar de nuevo la presencia de pLX(GVB-WT) por PCR de colonia, las colonias positivas se criopreservaron a -80 °C con glicerol al 10 % para su uso posterior como fuente de inóculo constante. La capacidad de infección de todos los clones obtenidos fue confirmada en plantas de *N. benthamiana* y *N. occidentalis*.

Una vez obtenido el clon infeccioso, se procedió a generar una colección de mutantes con los aminoácidos más conservados de los motivos de unión a Fe II y a 2-OG del dominio AlkB alterados. Mediante el uso de PCRI, con cebadores específicos adyacentes y de polaridad opuesta para cada mutación, se introdujeron distintas sustituciones por alanina (Tabla 1). Los distintos mutantes fueron denominados M1, M2, M3, M4 y MA. Todas las mutaciones fueron realizadas sobre el molde GVB-WT, excepto en el caso del mutante M4, que se realizó sobre el mutante M3. Una vez realizada la amplificación por PCRI, los productos de PCR, que incluyen el cDNA viral pero también el vector de clonación, fueron analizados y extraídos de geles de agarosa al 1 %, con el uso del kit GeneJET (ThermoFisher Scientific). Una vez extraídos, los productos de PCR fueron digeridos con BsaI y DpnI. Esta segunda enzima de restricción corta únicamente en sitios metilados, como los presentes en un plásmido replicado en un entorno procarionta, pero no corta los productos sintetizados de nuevo, evitando así obtener un fondo del molde pLX(GVB-WT). Una vez confirmada la digestión completa del producto de PCR se procedió a ligar los fragmentos obtenidos con el uso de la T4 DNA ligasa (Promega). Transcurridas 16-24 horas, se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5α. La selección de colonias positivas y el aislamiento de los plásmidos recombinantes se realizó tal y como se ha detallado anteriormente. Una vez extraído el plásmido se secuenció para comprobar que la mutación había sido incorporada en el lugar adecuado. La transformación, selección y criopreservación de los cultivos de *A. tumefaciens* transformados con cada plásmido recombinante con las mutaciones descritas, se realizó como se ha detallado anteriormente. Por último, la infectividad de los mutantes fue testada en plantas de *N. benthamiana*.

En el caso de los mutantes de GVA, se partió de un clon infeccioso de GVA cedido de nuevo por el Dr. DE Goszczynski (Plant Health and Protection, Virology Agricultural Research Council, Pretoria, South Africa). Esta colección de mutantes de GVA fue construida previamente en el laboratorio por un investigador predoctoral (David Villar Álvarez), los cuales fueron denominados M1, M3, M4 y MA, siguiendo estos la misma estructura que los mutantes de GVA.

Genotipo	Cebadores	Dominio afectado
WT	(S) 5' ATGGTCTCGGAGGCCAATAAAGTTCGCTTTTTC 3'	
	(A) 5' ATGGTCTCGGACCGTCGTGTTTATTACAGCTTC 3'	
M1	(S) 5' ATGGTCTCATGATGAGTCGTGCTACAC 3'	Dominio de unión a hierro H → A
	(A) 5' ATGGTCTCCATCATCAGCAGCGAAGTTTATC 3'	
M2	M1 (S)	Dominio de unión a hierro H → A 1ªD → A
	(A) 5' ATGGTCTCCATCATCAGCAGCGAAGTTTATCCC 3'	
M3	(S) 5' ATGGTCTCGCTATCAGTCTGACATTTCGCGAATGGGGTGATG 3'	Dominio de unión a 2-OG 1ª y 2ª R → A
	(A) 5' ATGGTCTCGATAGCCCCAGCACTTGATC 3'	
M4	M1 (S)	Mutante 2 + Mutante 3
	M2 (A)	
MA	(S) 5' ATGGTCTCTCATACAAGCAAAGGTTGGC 3'	Mutación aleatoria G → A
	(A) 5' ATGGTCTCGTATGATTAGCGCAACATAG 3'	

Tabla 1: Cebadores específicos utilizados para la obtención de los distintos mutantes del dominio AlkB de GVB, así como para la clonación de GVB-WT en pLX-35S-Popit. H (histidina), A (alanina), R (arginina), D (aspártico) y G (glicina).

2.3 Silenciamiento de las ALKBH9B de *N. benthamiana*

Con el fin de silenciar las desmetilasas homologas de AtALKBH9B en *N. benthamiana*, se utilizó la técnica del silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, virus-induced gene silencing). En nuestro caso se utilizó el virus del cascabeleo del tabaco (tobacco rattle virus, TRV). Primero se buscó en la base de datos NCBI (The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas NbALKBH9B1 (QYU76043) y NbALKBH9B2 (QPC97718) que habían sido previamente descritas (Yue et al., 2022). Estas se utilizaron para hacer una búsqueda BLAST en una base de datos específica de *N. benthamiana* (The Sol Genomics Network, <https://solgenomics.net/>). Cada proteína dio como resultado un par de genes. Para el acceso de NCBI QYU76043 se encontraron las secuencias Niben101Scf02122g00010.1 y Niben101Scf03468g02013.1 con un 95,62 % y 80,75 % de identidad de secuencia, respectivamente. Por otro lado, las secuencias Niben101Scf03735g02006.1 y Niben101Scf06267g03010.1 presentaron un 99,44 % y 94,07 % de identidad de secuencia, respectivamente, con el acceso de NCBI QPC97718.

Tras realizar un alineamiento de ambas secuencias, se determinó, mediante la herramienta VIGS tool disponible en The Sol Genomics Network, (<https://solgenomics.net/>), una región o “secuencia VIGS” de 300 nucleótidos de longitud que tuviese como diana los dos genes de cada NbALKBH9B. Estas secuencias VIGS fueron amplificadas por RT-PCR a partir de RNA de

N. benthamiana, extraído tal y como se indicará posteriormente, con el uso de oligonucleótidos específicos conteniendo las secuencias de recombinación attB1 y attB2 del sistema de clonación Gateway (Tabla 2) y el kit Superscript III one step RT-PCR (Invitrogen). Alternativamente, se realizó su clonación en tándem (NbALKB1-NbALKB2). Para ello, la región VIGS de cada isoforma se amplificó también utilizando oligonucleótidos diseñados para generar extremos solapantes en el 3' de la región VIGS de NbALKB1 y en el 5' de la región VIGS de NbALKB2. Posteriormente, los dos productos de PCR se unieron utilizando técnicas de ensamblaje por solapamiento (Cha-aim et al., 2012) y la DNA polimerasa PrimeSTAR® HS (TaKaRa).

Una vez obtenidos los tres insertos se realizó su clonación en el vector binario pTRV2 (Liu et al., 2002) mediante el sistema clonación Gateway (Invitrogen). En primer lugar, se insertó cada uno de los fragmentos en pDONR207, a través de la reacción de recombinación con la clonasa BP II (Invitrogen). Una vez confirmado mediante PCR de colonia, extracción del plásmido recombinante y secuenciación que el inserto era correcto, se procedió a realizar la reacción de recombinación con la clonasa LR II (Invitrogen) para transferir el inserto al vector pTRV2. Estos clones se criopreservaron en cultivos de *A. tumefaciens* denominándose pTRV2(ALKBH9B1), pTRV2(ALKBH9B2) y pTRV2(ALKBH9B1-2).

Técnica	ALKBH9B1	ALKBH9B2
RT-PCR	(S) 5' TACCGGCTCTAAAAACGGCG 3'	(S) 5' TACAGGCTCAGGCTGGTCGT 3'
	(A) 5' TTATCTCTGACTTCTACGGTTG 3'	(A) 5' TCAATTTTCTGTATTCACGC 3'
qRT-PCR	(S) 5' GGTCGGTGCTCATTCTCAAC 3'	(S) 5' CCAGCAGCGAACTCAGAAG 3'
	(A) 5' GCTCAGTGCAGGAGTATATG 3'	(A) 5' AGAGGTCACGGGAGAGAAAAG 3'
Clonación en tándem	(S) 5' CTCTGGTCCTTTCTCCTTACGCATATTGACAATCATGATTTTG 3' + ALKBH9B1 RT-PCR (S)	
	(A) 5' GTAAGGAGAAAGGACCAGAG 3' + ALKBH9B2 RT-PCR (A)	

Tabla 2: Cebadores específicos utilizados para la obtención de los insertos de ALKBH9B1, ALKBH9B2 y ALKBH9B1-2, así como los utilizados para cuantificar su expresión.

2.4 Inoculación de los virus utilizados mediante agroinfiltración

Para realizar la agroinfiltración con *A. tumefaciens*, los cultivos bacterianos portadores de los distintos plásmidos recombinantes se crecieron, a partir de los distintos cultivos criopreservados, en medio LB líquido con los correspondientes antibióticos durante 24 horas a 28 °C y con agitación. Tras centrifugar el cultivo, el sedimento de bacterias fue resuspendido en tampón de agroinfiltración (MES 10 mM y MgCl₂ 10 mM pH 5,6) hasta obtener una densidad óptica (DO) de 0,3. Las plantas de *N. benthamiana* fueron infiltradas (dos hojas por planta) con cada una de las construcciones pTRV2(ALKBH9B1), pTRV2(ALKBH9B2) o pTRV2(ALKBH9B1-2) junto con pTRV1 (Liu et al., 2002), a 14 días desde la germinación con el uso de una jeringuilla. La agroinfiltración con pLX(GVB-WT) o pLX(GVA-WT) y sus respectivos mutantes se realizó 10 días después de la infiltración de TRV dejando, por tanto, el tiempo

suficiente para que el silenciamiento de las desmetilasas del huésped fuese el máximo posible. El silenciamiento de los genes *ALKBH9B1* y *ALKBH9B2* se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real como se detallará posteriormente, con el uso de cebadores específicos (Tabla 2).

2.5 Bioensayos, recogida de muestra y extracción de RNA total

Todos los bioensayos se realizaron como mínimo tres veces con triplicados para cada construcción analizada. Las muestras recogidas consistieron en tejido foliar no agroinfiltrado próximo a la zona apical procedente de 2 hojas de tamaño similar obtenidas a partir de cada una de las plantas inoculadas con el virus y los diferentes mutantes. La toma de muestras se realizó a 7 días después de la inoculación con GVB o GVA. Las muestras se trituraron mediante el uso de un mortero y nitrógeno líquido con el fin de preservar la cadena de frío y evitar la degradación del RNA. Una vez triturado, se utilizó el protocolo de extracción con TRIzol™ (Invitrogen), una solución monofásica de isotiocianato de fenol y guanidina diseñada para aislar fracciones separadas de RNA, DNA y proteínas, siguiendo las indicaciones del fabricante. De forma adicional, se realizó una precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M durante 30' a -80 °C, para después realizar un último lavado con etanol al 70 % y resuspender el sedimento de RNA resultante en 50 µl de agua estéril. Tras cuantificar la concentración de RNA en cada una de las muestras con un espectrofotómetro NanoDrop One (ThermoFisher Scientific), ésta se ajustó a 500 ng/µl con el fin de reducir el error de pipeteo en posteriores análisis.

2.6 Análisis Northern blot e hibridación molecular

Para obtener una estimación del título viral presente en cada una de las muestras extraídas se realizaron análisis de RNA tipo Northern blot. Este tipo de análisis permite conocer la acumulación de moléculas de RNA de diferentes tamaños en una muestra gracias al uso de una sonda específica que hibrida con secuencias determinadas del virus. Una vez obtenidas las muestras de RNA a analizar y las diferentes sondas, se procedió a realizar un gel de agarosa de 100 ml (1,5 gramos de agarosa, 85 ml de agua estéril, 10 ml de MOPS 10X y 5 ml de formaldehído al 37 %) que se introdujo en una cubeta electroforética de tamaño adecuado junto a 0,5 litros de tampón de electroforesis MOPS 1X. Para la preparación de las muestras, se añadieron 2 µg de RNA, en un volumen total de 10 µl. Antes de la carga en el gel, se añadieron 10 µl de tampón de carga de RNA (formamida 50 %, formaldehído 6,5 %, MOPS 1X, azul de bromofenol 0.05 %, xileno cianol 0.05% y bromuro de etidio 10 µg/ml). Tras la preparación de cada muestra, se incubaron 10 minutos a 65 °C para desnaturalizar posibles estructuras secundarias y terciarias del RNA. Las condiciones de electroforesis fueron de 1 hora y 30 minutos a un voltaje de 60 V. Entonces se procedió a realizar la transferencia capilar de los ácidos nucleicos a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche), mediante el uso de SSC 10X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M, pH 7), durante un mínimo de 16 horas. Una vez realizada la transferencia, se realizó la fijación de los RNA mediante el uso de luz ultravioleta (Stratalinker 1800 UV, Stratagene). Una vez fijados los RNA a la membrana, se realizó una prehibridación/incubación con al menos 0,2 ml por cm² de membrana de tampón

de hibridación (formamida 50 %, SSC 5X, agente bloqueante de Roche 2 %, N-lauroilsarcosina 0.1 %, SDS 0.02 %), a 65 °C con rotación. Transcurridas 2 horas se añadió la sonda de RNA correspondiente. Estas sondas de RNA consisten en una región de 500 nucleótidos, complementaria al gen de la proteína de cubierta de GVA o GVB, marcada con digoxigenina. Las sondas se obtuvieron por transcripción in vitro con la T7 RNA polimerasa (Roche) en presencia de UTP marcado con digoxigenina utilizando como molde clones ya disponibles en el laboratorio. Tras la hibridación de entre 16 y 24 horas, se procedió a retirar de la membrana los restos de solución de hibridación, mediante distintos lavados, dos de ellos con SSC 2X + 0,1 % SDS durante 5 minutos a temperatura ambiente y otros dos con SSC 0,1X + 0,1 % SDS durante 15 minutos cada uno a 65 °C. Tras esto se realizó la detección inmunológica de la digoxigenina. Primero se lavó la membrana de nailon con tampón de lavado o tampón 1 (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0,15 M y Tween-20 0,3 % pH 7,5) para seguidamente llevar a cabo un paso de bloqueo de uniones inespecíficas con 1 ml de la solución de bloqueo (solución de bloqueo comercial 1 %, Roche) y 9 ml del tampón de lavado sin Tween-20 (tampón 2). La incubación tuvo una duración de 30 minutos con rotación. A continuación, se procedió a añadir el anticuerpo contra la digoxigenina (DIG, Roche) conjugado a la fosfatasa alcalina (dilución 1:10000), dejando la incubación 30 minutos más. Finalmente, se realizaron 2 lavados adicionales de 15 minutos con tampón de lavado, antes de un último lavado con tampón 3 (TrisHCl 100 mM, NaCl 100 mM, pH 9,5) durante 5 minutos. La detección de la señal de hibridación se realizó mediante quimioluminiscencia. Para ello se utilizó una dilución 1:100 del reactivo CSPD (Roche) en tampón 3. El CSPD es un sustrato de la fosfatasa alcalina, su desfosforilación genera un anión metaestable que se descompone. Esta reacción emite luz que, en nuestro caso, fue registrada en un analizador de imágenes ImageQuant 8000 (Amersham/FujiFilm).

2.7 Cuantificación del título viral y los niveles de silenciamiento génico por RT-PCR en tiempo real

La acumulación de RNA viral presente en las diferentes muestras, así como el nivel de silenciamiento de las desmetilasas ALKBH9B1 y 2 de *N. benthamiana*, se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR). Para ello, las muestras se sometieron a un tratamiento previo con DNasa I para eliminar los posibles restos de DNA genómico contaminante, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ThermoFisher Scientific). Después, se sintetizó el cDNA a partir del RNA de cada muestra con el uso de la retrotranscriptasa (RT) RevertAid H Minus M-MuLV y oligodT, en el caso de los mRNA, o un oligo específico, en el caso de los virus, (Tabla 2) siguiendo las instrucciones del fabricante ((ThermoFisher Scientific). La reacción se realizó a 42 °C durante una hora. La qPCR para la detección del virus se realizó utilizando cebadores que amplifican una región de aproximadamente 200 nt situada dentro del ORF5 (CP) de GVA y GVB y del ORF1 de GVA (Tabla 3), diseñados con el uso del software Primer3 (<https://primer3.ut.ee>) y el sistema Quantstudio 3 de AppliedBiosystem. Previamente se midió la eficiencia de cada par de oligonucleótidos con diluciones seriadas y comprobando la aparición de un único amplicón en las curvas de fusión. Para medir la expresión de las

desmetilasas se utilizaron cebadores específicos situados fuera de la región VIGS. La cuantificación relativa de los productos de PCR se calculó mediante el método comparativo $\Delta\Delta Ct$ (*cycle threshold*) utilizando las aplicaciones disponibles en línea en Thermo Fisher Connect™. Se eligió el gen L23 del rRNA 23S para la normalización de los datos debido a que se trata de un gen endógeno en *N. benthamiana* que se expresa de forma constitutiva. Las temperaturas de anillamiento y elongación fueron de 62 y 72 °C, respectivamente. Tras la obtención de los resultados, se procedió a verificar diferencias significativas entre muestras.

Región genómica	GVB	GVA
CP	(S) 5' CTTTGACCGCCCATGTACT 3'	(S) 5' TCGTGGGAACTGGTTGTGT 3'
	(A) 5' AGACGGCACAGCTCTTGAAT 3'	(A) 5' ACCTGGTCATTTGGTCGCT 3'
ORF1	No se utilizó	(S) 5' GCGCAGAGTGTGACAAAAGG 3'
		(A) 5' TCGTCCTCCTCTTTCCCA 3'

Tabla 3: Cebadores específicos utilizados para la cuantificación por qRT-PCR de GVA (CP y ORF1) y de GVB (CP).

2.8 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron realizados haciendo uso del software analítico GraphPad. Para cada bioensayo se realizó una prueba t para muestras independientes, permitiendo así observar diferencias significativas entre dos grupos no relacionados. La prueba se realizó aplicando la corrección de Welch's, la cual no asume que ambos grupos tengan la misma desviación estándar. Para el análisis de densitometría, se utilizó el programa de edición de imagen Fiji, seguido de una prueba anova, para observar diferencias entre los distintos grupos, una vez confirmado que estos siguen una distribución normal mediante la prueba Shapiro-Wilk. Los gráficos de barras que representan las medias y la desviación estándar fueron realizados con el software de hojas de cálculo Excel.

Resultados

3.1 Análisis de la capacidad infectiva de la construcción pLX(GVB-WT) en *Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana occidentalis*

Para facilitar la aplicación de técnicas de biología molecular en la obtención de una colección de mutantes del aislado GVB-935 del virus B de la vid, el cDNA de este aislado viral fue subclonado desde la construcción proporcionada por el Dr. D. E. Goszczynski (Plant Health and Protection, Virology Agricultural Research Council, Pretoria, South Africa) al minivector de expresión binario pLX-B2, tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. En esta nueva construcción, el genoma viral quedó bajo el control del promotor constitutivo 35S en su versión duplicada (35Sx2) y del terminador Popit. A partir de este proceso de subclonación, se obtuvieron dos construcciones recombinantes, denominadas pLX(GVB-WT1) y pLX(GVB-WT4), respectivamente. La infectividad de los dos clones de GVB obtenidos fue analizada a través de su agroinfiltración en plantas tanto de *N. benthamiana* como de *N. occidentalis*, de dos semanas de edad. Diez días después de la inoculación, se evaluaron los síntomas desarrollados pudiendo verse diferencias en la sintomatología producida por ambos clones. Mientras pLX(GVB-WT4) no generó clorosis ni otro tipo de sintomatología en ninguna de las dos especies vegetales ensayadas, pLX(GVB-WT1) produjo síntomas visibles en ambas (Figura 1A y 1B). Destaca la clorosis que se apreció de forma mayoritaria alrededor de las venas de cuarto orden o superior en *N. occidentalis* (paneles inferiores en Figura 1A y 1B), el arrugamiento de la hoja en *N. benthamiana* (paneles superiores en Figura 1A y 1B), así como una reducción en el tamaño de las plantas.

Para comprobar de una forma más precisa la capacidad de infección de ambos clones, se realizó un análisis del RNA tipo Northern blot, el cual permite determinar la presencia/ausencia del virus, así como el título del RNA viral en cada muestra. Para ello, el RNA total se extrajo a partir de muestras de tejido vegetal consistentes en tejido foliar no agroinfiltrado próximo a la zona apical a 7 dpi desde su inoculación con GVB. Se tomaron muestras procedentes de dos plantas, en el caso de *N. occidentalis*, y de tres, en el caso de *N. benthamiana*. Además, como control negativo, se extrajeron los RNA de muestras de tejido sano de cada una de las especies. La utilización de una sonda específica para el gen de la proteína de cubierta (CP) de GVB en el Northern blot nos permitió detectar tanto el RNA genómico (gRNA) como los dos subgenómicos (sgRNA1 y 2) del virus. Aunque la CP se traduce únicamente a partir del sgRNA2, su secuencia génica está presente en los tres tipos de RNA viral (Figura 1C). Como se esperaba de los resultados fenotípicos, los resultados del Northern blot confirmaron la presencia de todos los componentes del genoma viral en todas las muestras, de ambas especies, inoculadas con pLX(GVB-WT1), validando así la construcción del vector y la eficiencia de la infección viral. Sin embargo, pLX(GVB-WT4) sólo pudo infectar a un único individuo de *N. benthamiana* (Figura 1C). Estos resultados sugieren que pLX(GVB-WT1) presenta una mayor capacidad de infectar y causar enfermedad comparado con pLX(GVB-

WT4). Por ello, se decidió continuar los siguientes experimentos con pLX(GVB-WT1), al que se denominará a partir de ahora como pLX(GVB-WT).

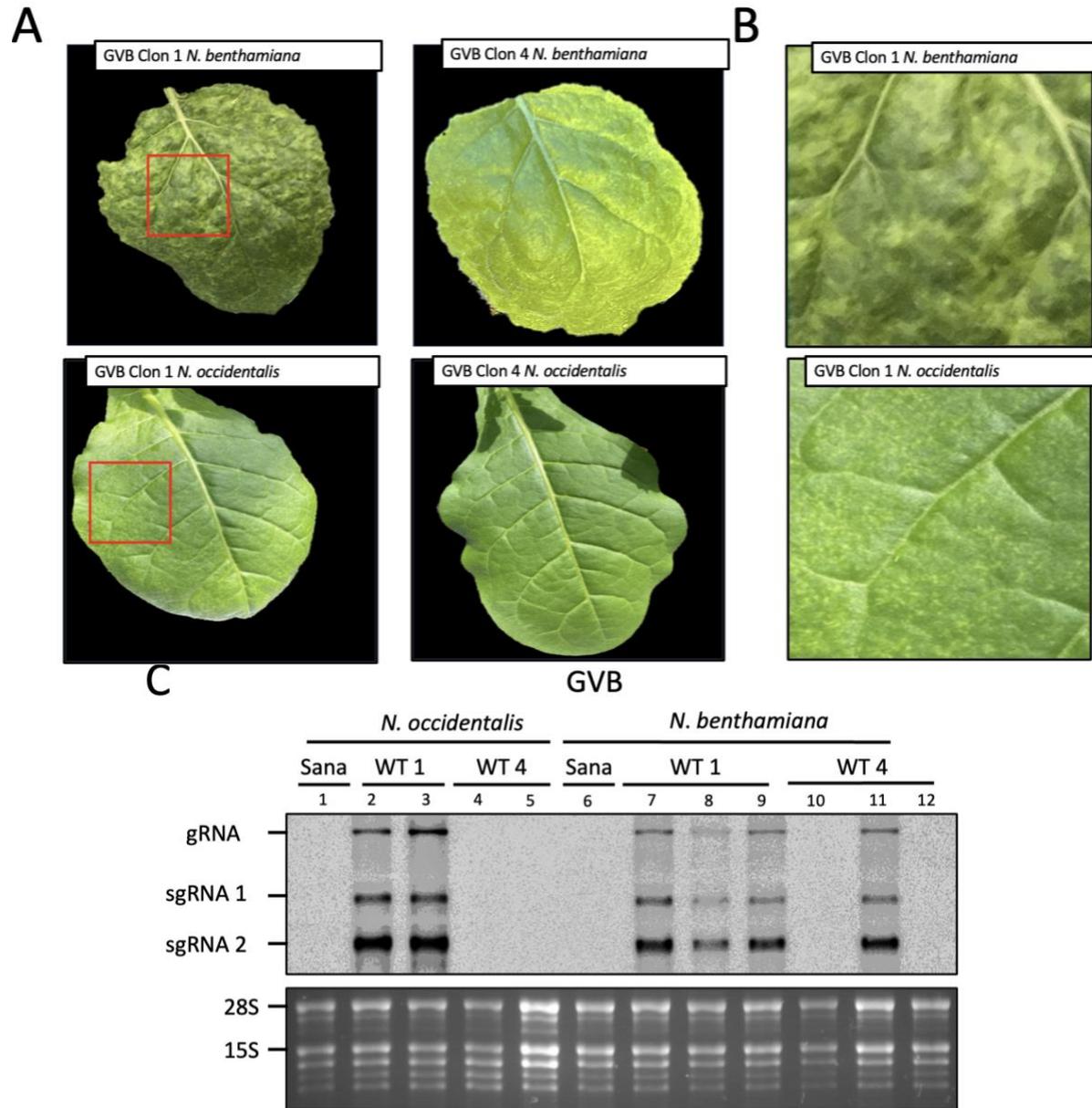


Figura 1: (A) Sintomatología desarrollada en plantas de *N. benthamiana* (panel superior) y *N. occidentalis* (panel inferior) tras la infección con los clones pLX(GVB-WT1) o pLX(GVB-WT4) de GVB-935 a 10 dpi. (B) Detalle de la sintomatología de GVB en *N. benthamiana* (panel superior) y *N. occidentalis* (panel inferior). (C) Análisis Northern blot de los RNA obtenidos de plantas inoculadas con pLX(GVB-WT1) o pLX(GVB-WT4), indicados como WT1 y WT4 respectivamente, a partir de tejido sistémico. Los controles negativos (sana) están constituidos por plantas sanas sin inocular. Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVB. En la parte inferior se muestra la tinción con bromuro de etidio del gel de agarosa correspondiente mostrando los RNA ribosómicos como control de carga.

3.2 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de las dos isoformas de la desmetilasa ALKBH9B presentes en *N. benthamiana*

En estudios recientes se ha demostrado que la desmetilasa AtALKBH9B desempeña un papel fundamental en la infección por el virus del mosaico de la alfalfa (AMV) en *Arabidopsis* (Martínez-Pérez et al., 2017). La interacción directa entre ALKBH9B y la proteína de cubierta del AMV permite al virus manipular la actividad de esta enzima dirigiéndola a eliminar los grupos metilo de la 6-metiladenosina (m6A) del RNA viral. Por tanto, ALKBH9B modularía la abundancia de esta modificación epigenética en el genoma viral, protegiéndolo de la degradación, favoreciendo la replicación y diseminación del virus en la planta. Sin embargo, tanto GVA como GVB son virus que de forma natural se encuentran confinados en el floema de la vid, una planta leñosa perenne que puede vivir muchas décadas y que sufre un periodo de letargo en invierno durante el cual el virus debe persistir. En estas etapas, el metabolismo de la planta se ralentiza y la actividad enzimática decae, lo cual no ocurre al utilizar *N. benthamiana* como modelo experimental. Por esta razón, pero también para analizar la influencia de las desmetilasas del huésped sobre la infección de estos virus, decidimos analizar el efecto que las mutaciones de los dominios AlkB de las replicasas virales tienen sobre la infección en dos escenarios diferentes. En uno de ellos, los distintos mutantes, obtenidos como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se evaluaron en plantas de *N. benthamiana* silvestres, pero en el otro, estos mismos mutantes se inocularon en plantas de *N. benthamiana* en las que se silenciaron las dos isoformas de ALKBH9B, NbALKBH9B1 y NbALKBH9B2 (ver Materiales y Métodos).

Para abordar esta cuestión, comenzamos buscando la mejor estrategia para lograr una reducción máxima y simultánea en la expresión de estos dos genes. Una técnica muy utilizada para reducir la expresión de genes específicos en *N. benthamiana*, aprovechando el mecanismo de defensa antiviral mediado por los RNA interferentes (RNAi), son los ensayos de silenciamiento inducido por virus (VIGS), en nuestro caso con el uso de TRV. Este virus, que posee un genoma bipartito con dos RNA (RNA 1 y RNA 2), ofrece la ventaja de que su RNA 2 permite la sustitución de determinadas secuencias virales por secuencias heterólogas sin afectar a la infección dentro de la planta. Por tanto, el método consiste en la clonación de un fragmento del gen que se desea silenciar en un vector que contiene el RNA 2 modificado (Liu et al., 2002). A medida que el virus se propague por la planta, las células reconocerán el RNA viral como algo extraño y activarán el mecanismo antiviral de interferencia de RNA. Sin embargo, debido a la similitud en secuencia, el sistema de RNAi degradará no solo el RNA del virus, sino también el mRNA del gen endógeno en diferentes partes de la planta.

Para obtener una reducción simultánea en la expresión de las dos isoformas de ALKBH9B nos planteamos dos opciones. En la primera, la infección con TRV se realizó mezclando dos construcciones de TRV2, portadoras de un fragmento de cada isoforma de ALKBH9B. En la segunda, se utilizó una sola construcción de TRV2 que contenía los dos fragmentos clonados en tándem. Cada aproximación tiene sus ventajas e inconvenientes. En la primera, debido a

que el tamaño de cada RNA 2 es menor, este presentará una mayor estabilidad y el silenciamiento transitorio tendrá un efecto más duradero. Sin embargo, esta estrategia es más propensa a que los dos tipos de RNA 2 se autoexcluyan y se generen parches de tejido donde solo la expresión de una de las dos isoformas esté silenciada. Esta situación no ocurre con la clonación en tándem, aunque el mayor tamaño del RNA 2 puede generar una mayor inestabilidad molecular haciendo que el inserto con las secuencias heterólogas puedan perderse total o parcialmente.

Por circunstancias experimentales, los estudios se realizaron en dos ensayos diferentes. Primero, plantas de 2 semanas de edad fueron inoculadas con el RNA 1 del TRV y los diferentes RNA 2 modificados conteniendo un fragmento de 300 nt del gen *NbALKBH9B1* (pTRV2(ALKBH9B1)) o *NbALKBH9B2* (pTRV2(ALKBH9B2)). El control consistió en plantas sanas (Figura 2A, izquierda). En un segundo ensayo las plantas se inocularon con el RNA 1 del TRV y con la construcción pTRV2(ALKBH9B1-2) portadora de los dos fragmentos clonados en tándem, así como con una mezcla de pTRV2(ALKBH9B1) y pTRV2(ALKBH9B2) (Figura 2B, izquierda). El control en esta ocasión consistió en plantas infectadas con TRV mediante la agroinfiltración de pTRV1 y pTRV2(\emptyset), el plásmido vacío. La recogida de muestras y extracción de RNA se realizó a 10 dpi a partir de tejido foliar no agroinfiltrado.

Para determinar si las diferentes construcciones de TRV 2 ensayadas estaban funcionando adecuadamente e infectando las plantas de *N. benthamiana* se realizaron análisis tipo Northern blot con una mezcla de dos sondas capaces de detectar tanto el RNA 1 como el RNA 2 modificado del virus, así como sus respectivos sgRNA (sgRNA1 y sgRNA2). Las señales de hibridación confirmaron la infección y la presencia de todos los RNA virales en todas las muestras excepto en el caso del control del segundo bioensayo. En estas muestras no se detectó ni el RNA 2 ni su correspondiente RNA subgenómico indicando que, por algún motivo, la construcción pTRV2(\emptyset) no había funcionado. Como el RNA 1 codifica la replicasa viral y la proteína de movimiento, este RNA puede replicarse y moverse en ausencia del RNA 2, por eso somos capaces de detectarlo junto con su correspondiente subgenómico (Figura 2B, izquierda). Respecto al título viral, todas las muestras inoculadas con pTRV2(ALKBH9B1), pTRV2(ALKBH9B2) o con la mezcla de ambos mostraron una abundancia viral más o menos homogénea entre ellas. Sin embargo, el título viral en las tres muestras inoculadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) sufrió una variación considerable, quizás resultado de la mayor inestabilidad predicha con anterioridad.

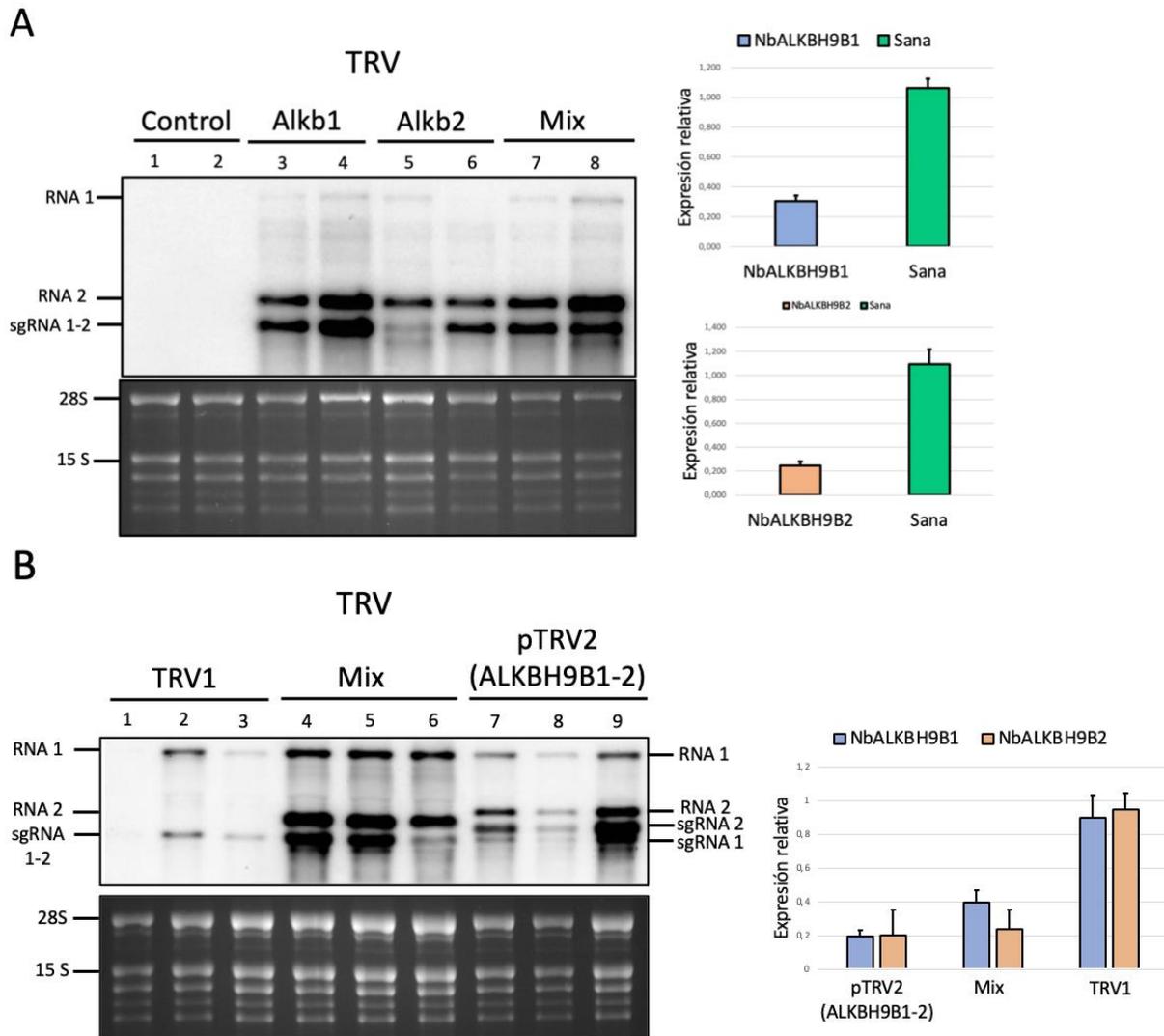


Figura 2: (A) (Panel izquierdo) Northern blot para la detección de TRV en muestras control sanas, inoculadas con pTRV1 y pTRV2(ALKBH9B1), pTRV2(ALKBH9B2), o la mezcla de las dos construcciones (Mix). (Panel derecho) Análisis de la expresión relativa de *NbALKBH9B1* o *NbALKBH9B2* analizada por RT-qPCR utilizando el gen L23 como control endógeno. **(B)** (Panel izquierdo) Northern blot para la detección de TRV en muestras control inoculadas con pTRV1 y pTRV2(\emptyset), la mezcla de pTRV2(ALKBH9B1) y pTRV2(ALKBH9B2) (Mix) o con pTRV2(ALKBH9B1-2). (Panel derecho) Análisis de la expresión relativa de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* mediante RT-qPCR en las muestras pTRV2(ALKBH9B1-2) y "Mix". Los diagramas de barras representan la media de la expresión relativa de los genes analizados en cada una de las muestras.

Posteriormente, se procedió a cuantificar los niveles de acumulación de los mRNA de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* (Figura 2A y B, derecha). En primer lugar, se analizó el silenciamiento producido por pTRV2(ALKBH9B1) o pTRV2(ALKBH9B2), observando que *NbALKBH9B1* estaba silenciado en un 70 %, mientras que en el caso de *NbALKBH9B2* el silenciamiento fue del 80 %. En el caso de las plantas agroinfiltradas con la mezcla de pTRV2(ALKBH9B1) y pTRV2(ALKBH9B2), el silenciamiento fue de entorno al 60 % y 80 % para *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2*, respectivamente. Aunque las plantas infiltradas con pTRV2(ALKBH9B1-2) mostraron una variabilidad en la infección, el silenciamiento de ambas isoformas fue del 80 %. Por ello, se decidió continuar el estudio empleando esta estrategia.

3.3 Análisis de la expresión relativa de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* en plantas de *N. benthamiana* infectadas con TRV

En los dos bioensayos anteriores no dispusimos de un control no silenciado adecuado en el que los RNA 1 y 2 del TRV estuvieran presentes, por lo que no estábamos seguros de si la propia infección con TRV modificaba la expresión de las desmetilasas del huésped. Para validar los resultados anteriores, se realizó un nuevo bioensayo utilizando un triplicado de plantas de *N. benthamiana* inoculadas con pTRV1 y pTRV2(GFP), que contiene el gen de la proteína de fluorescencia verde (GFP) y un triplicado de plantas sanas sin inocular. La recogida de muestra se realizó a 10 dpi. Una vez extraídas, se realizó un análisis mediante northern blot para verificar la infección por TRV (Figura 3A). Una vez confirmado esto, se realizó una RT-qPCR para comparar los valores de la expresión de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* en ambos grupos (Figura 3B). Como era de esperar, la infección de TRV portando secuencias heterólogas, pero no de *N. benthamiana*, no disminuyó la expresión de las desmetilasas, sino que además está se duplicó. Esta situación puede ser consecuencia de una respuesta de defensa a la infección producida por TRV, que alteraría la ruta de modificación m6A. Esto permitió asumir que, si en el apartado anterior las muestras de referencia poseen valores de expresión mayores, el silenciamiento evaluado pudo ser incluso mayor. Además, este resultado nos asegura que los grupos control, inoculados con pTRV1 y pTRV2(GFP), de los siguientes bioensayos realizados sobre plantas infectadas con TRV presentan niveles de expresión normales o superiores de estas desmetilasas.

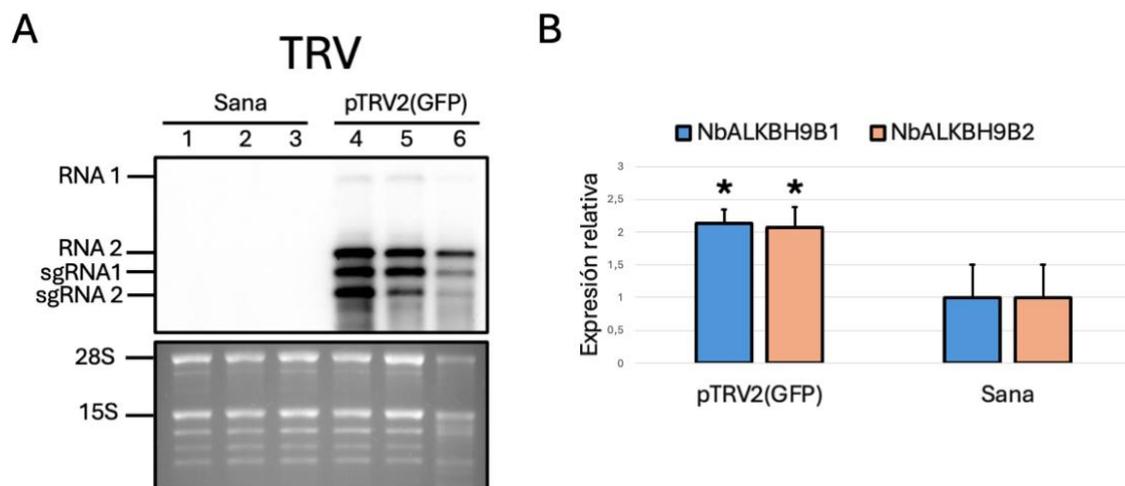


Figura 3: (A) Análisis Northern blot de muestras sanas e infectadas con pTRV2(GFP) de *N. benthamiana*. Las muestras fueron hibridadas con una mezcla de dos sondas complementarias a un fragmento de los RNA 1 y 2 de TRV. (B) Análisis de la expresión relativa de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* mediante RT-qPCR en muestras sanas e inoculadas con pTRV1 y pTRV2(GFP) de *N. benthamiana*.

3.4 Efecto sobre la infección de GVB en *Nicotiana sp.* de las mutaciones puntuales en residuos conservados del dominio AlkB presente en la replicasa viral

Para determinar el impacto del dominio AlkB en la replicación de GVB, introdujimos mutaciones puntuales en residuos conservados de esta región de la replicasa viral. Estos residuos fueron seleccionados por su localización en el posible sitio activo de la enzima y su alta conservación entre diferentes especies virales. Los virus mutantes resultantes fueron utilizados para infectar plantas de *N. occidentalis* y *N. benthamiana*, y la infección se cuantificó mediante Northern-blot y RT-qPCR. Una vez obtenidos los mutantes de GVB a partir del molde pLX(GVB-WT), se realizó la secuenciación de los dominios AlkB con el fin de confirmar la presencia de la mutación en el sitio diana (Figura 4). Para el mutante 1 (M1), se realizó la sustitución de la histidina (posición 666) del dominio de unión a hierro (HXDD) por alanina. Para el mutante 2 (M2), la mutación consistió en la sustitución de la histidina anterior (M1) más el primer ácido aspártico (posición 668) del dominio de unión a hierro por alanina. El mutante 3 (M3) se realizó por sustitución de las dos argininas (posiciones 728 y 734) del dominio de unión a 2-OG (RXXXXXR) por alaninas. El mutante 4 (M4) se realizó aplicando la misma estrategia que en M2, pero usando de molde M3, por lo que este mutante presenta las mutaciones M2 y M3. Por último, como control, el mutante 5 (MA) se realizó sustituyendo una glicina aleatoria (posición 624), fuera del dominio Alkb, por alanina.

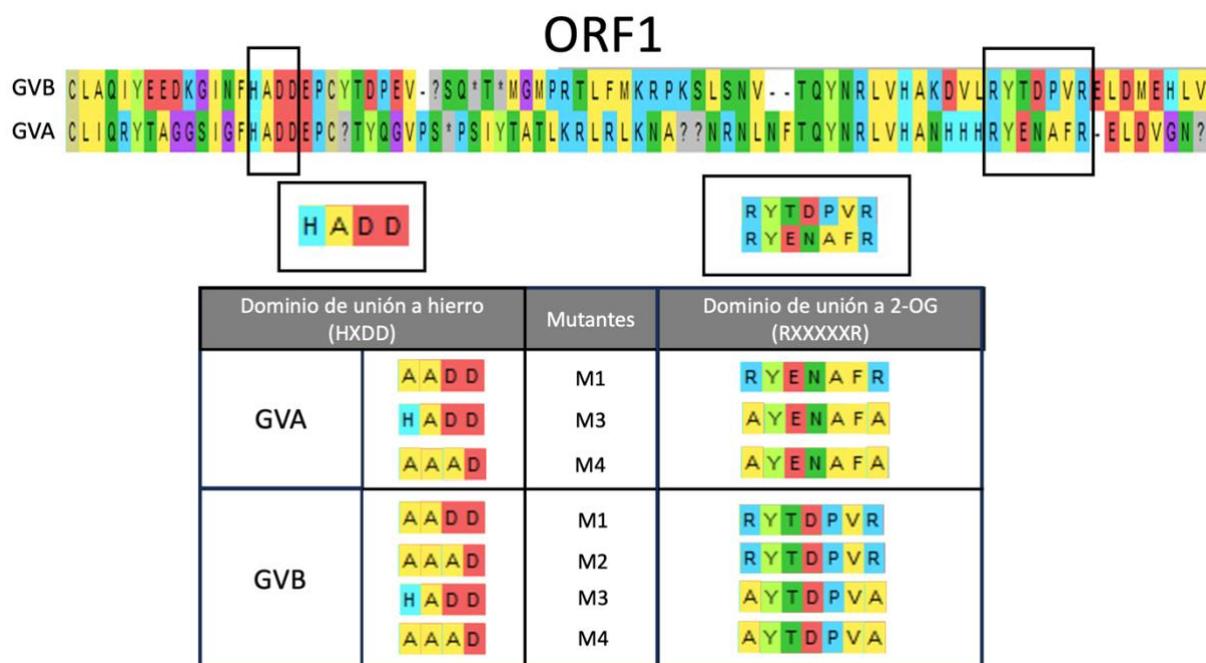


Figura 4: Esquema de los dominios de unión a hierro (HXDD) y a 2-oxoglutarato (RXXXXXR) en GVB y GVA, así como de los mutantes que presentan alterados estos dominios.

3.4.1 Análisis de las infecciones de GVB-WT y los mutantes del domino AlkB en *N. occidentalis*

A diferencia de GVA, GVB es capaz de infectar plantas de *N. occidentalis*, tal y como se ha comprobado al inicio de este trabajo. Por tanto, este huésped se utilizó, junto con *N.*

benthamiana, para observar el comportamiento de los mutantes de GVB respecto a GVB-WT. Para ello, se realizaron un total de 3 bioensayos en plantas de *N. occidentalis* silvestres, que 7 días después del trasplante, fueron inoculadas con GVB-WT y sus respectivos mutantes. Las muestras recogidas consistieron en tejido foliar no agroinfiltrado próximo a la zona apical. El RNA extraído de las muestras se analizó mediante Northern blot con el uso de una sonda complementaria de la CP, permitiendo detectar la acumulación de los RNA genómico y subgenómicos del virus (Figura 5, paneles a la izquierda). De forma complementaria, se realizaron análisis de densitometría para cada uno de los bioensayos con el fin de determinar si existían diferencias significativas en el título viral entre mutantes a partir de los valores de densidad integrada. A la luz de los resultados, excepto en el bioensayo 1, se observó una tendencia a que los mutantes se acumularan en menor medida que GVB-WT. Sin embargo, las diferencias no fueron significativas (p valor = 0,132; 0,075; 0,098 para B1, B2 y B3, respectivamente) probablemente debido a la variabilidad en el título viral sobre todo en las muestras de GVB-WT y GVB-MA (Figura 5, paneles a la derecha).

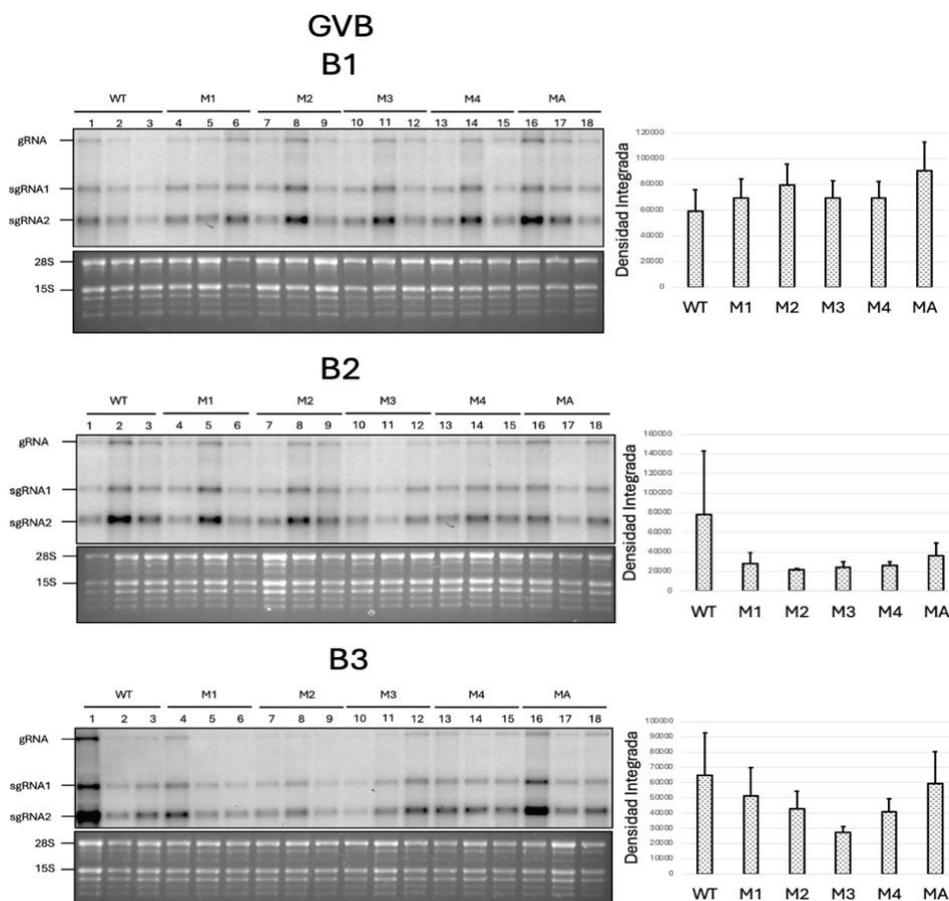


Figura 5: (Panel izquierdo) Análisis Northern blot de las muestras procedentes de los bioensayos 1, 2 y 3 (B1, B2, B3, respectivamente) infectadas con GVB-WT y sus respectivos mutantes. Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVB. **(Panel derecho)** Análisis de densitometría de las señales de hibridación de las muestras procedentes de los bioensayos 1, 2 y 3 (B1, B2, B3, respectivamente) infectadas con GVB-WT y sus respectivos mutantes. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas one-way ANOVA con un valor de significancia $p < 0,05$.

3.4.2 Análisis de las infecciones de GVB y los mutantes del dominio AlkB en *N. benthamiana*

Vistos los resultados en *N. occidentalis*, se decidió realizar 3 bioensayos más, pero esta vez utilizando plantas de *N. benthamiana* en los que se silenciaron los genes *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2*, como se ha explicado anteriormente. Los bioensayos constaron de grupos control de plantas sin silenciar inoculadas con pTRV2(GFP) y de plantas silenciadas inoculadas con pTRV2(ALKBH9B1-2). Para ello, plantas crecidas en semilleros de 2 semanas de edad fueron trasplantadas a macetas individuales, donde 7 días más tarde fueron inoculadas con pTRV1 y las construcciones pTRV2 mencionadas anteriormente. Trascurridos 10 días, las plantas fueron inoculadas de nuevo con GVB-WT y sus respectivos mutantes. Antes de la recogida de muestra, se tomaron fotos desde el plano cenital de una planta de cada grupo de mutantes con el fin de observar si existían diferencias a nivel fenotípico (Figura 6). Tanto en plantas infectadas con pTRV2(GFP) como con pTRV2(ALKBH9B1-2), pudieron observarse diferencias a nivel fenotípico. En concreto, el tamaño de las hojas de las plantas infectadas con los mutantes GVB-M2, M3 y M4 fue mayor con respecto a las infectadas con GVB-WT, siendo esta diferencia consistente en ambos tratamientos en el caso de las plantas infectadas con GVB-M4. Aunque esta sintomatología más suave podría responder a una menor infección viral, no se pudieron determinar diferencias significativas en el título viral, como veremos a continuación. La recogida de muestra se realizó a 7 dpi. Las muestras fueron analizadas mediante Northern blot, con el uso de una sonda complementaria a la CP de GVB y mediante análisis de densitometría de las señales de hibridación. De forma similar a lo observado en experimentos anteriores con el propio GVB en plantas de *N. occidentalis*, en ninguno de los 3 bioensayos pertenecientes a los grupos control no silenciados se observaron diferencias significativas (p valor = 0,165; 0,205; 0,098 para B1, B2 y B3, respectivamente) en la acumulación del título viral entre GVB-WT y sus mutantes (Figura 7). Sin embargo, en las plantas silenciadas del bioensayo 1 (B1) (Figura 8) se puede apreciar una disminución en la acumulación viral en los mutantes respecto de GVB-WT.

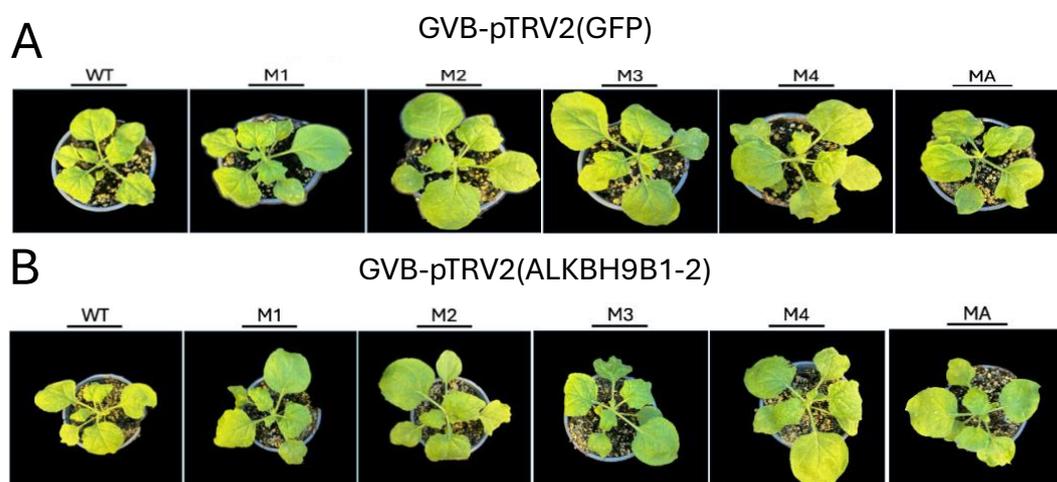


Figura 6: (A) Fotografías realizadas a 7dpi en plano cenital de plantas de *N. benthamiana* infectadas con pTRV2(GFP) y con GVB y sus respectivos mutantes. (B) Fotografías realizadas a 7dpi en plano cenital de plantas de *N. benthamiana* infectadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) y con GVB y sus respectivos mutantes.

Este resultado podría deberse a que los mutantes de GVB al presentar su dominio AlkB alterado y estar infectando a plantas con ambas desmetilasas silenciadas, los mutantes no podrían hacer uso de la actividad desmetilasa propia ni subvertir la del huésped, como lo hace AMV, para evitar los mecanismos de defensa de la planta. No obstante, en los siguientes bioensayos (B2 y B3), el grupo de plantas silenciadas no presentó la misma tendencia observada en B1, sino que el título viral fue más homogéneo entre mutantes sin mostrar tampoco diferencias significativas (p valor = 0,072; 0,174; 0,084 para B1, B2 y B3, respectivamente) con GVB-WT.

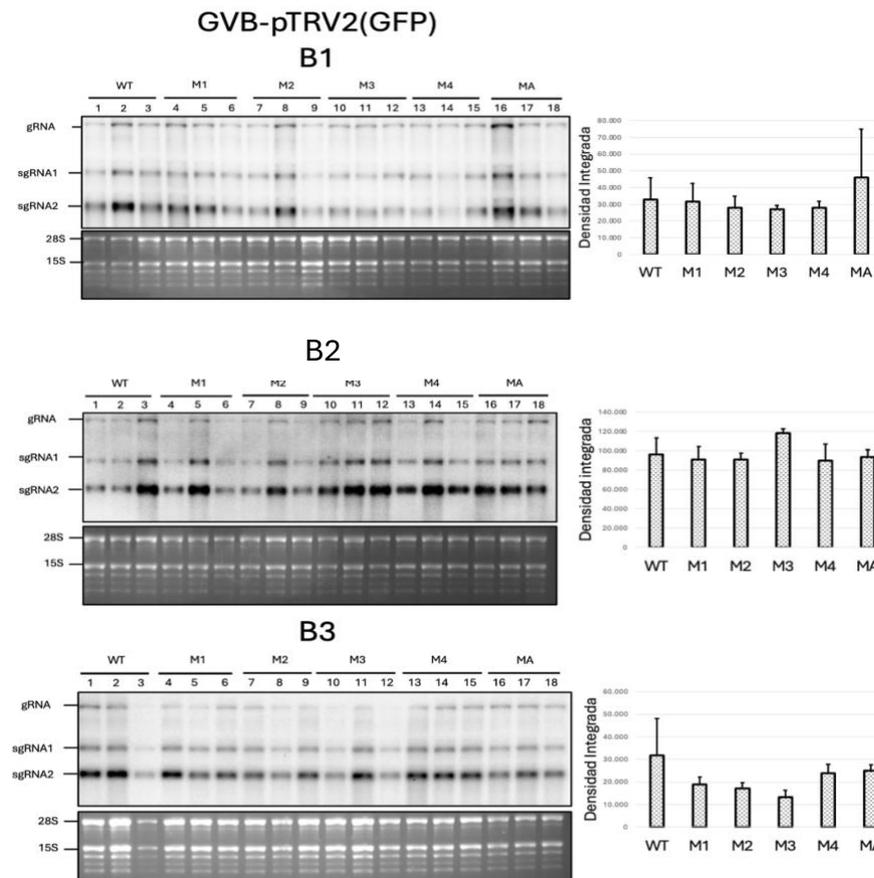


Figura 7: Análisis northern blot (Panel izquierdo) y de densitometría de las señales de hibridación (Panel derecho) de las muestras procedentes de 3 bioensayos (B1, B2 y B3) infectadas con pTRV2(GFP) y GVB-WT y sus mutantes correspondientes en plantas de *N. benthamiana*). Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVB. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas one-way ANOVA con un valor de significancia $p < 0,05$.

Esta variabilidad entre bioensayos podría deberse a cambios en las condiciones de luz y temperatura en el invernadero o a la propia variación generada por la propia planta durante su desarrollo, pudiendo afectar también a los niveles de silenciamiento entre bioensayos. Aunque la cuantificación de las intensidades de señales de hibridación es una técnica válida y extendida en biología molecular, puede estar sujeta a sesgos debido a revelados diferenciales. Con el fin de tener una visión más detallada del experimento, y una cuantificación más fiable, se estimó mediante RT-qPCR tanto el nivel de silenciamiento de las desmetilasas como la acumulación viral, con el uso de los cebadores descritos en las Tablas 2 y 3 de Materiales y

Métodos. Para realizar esta cuantificación las muestras procedentes de los triplicados dentro de cada bioensayo se mezclaron.

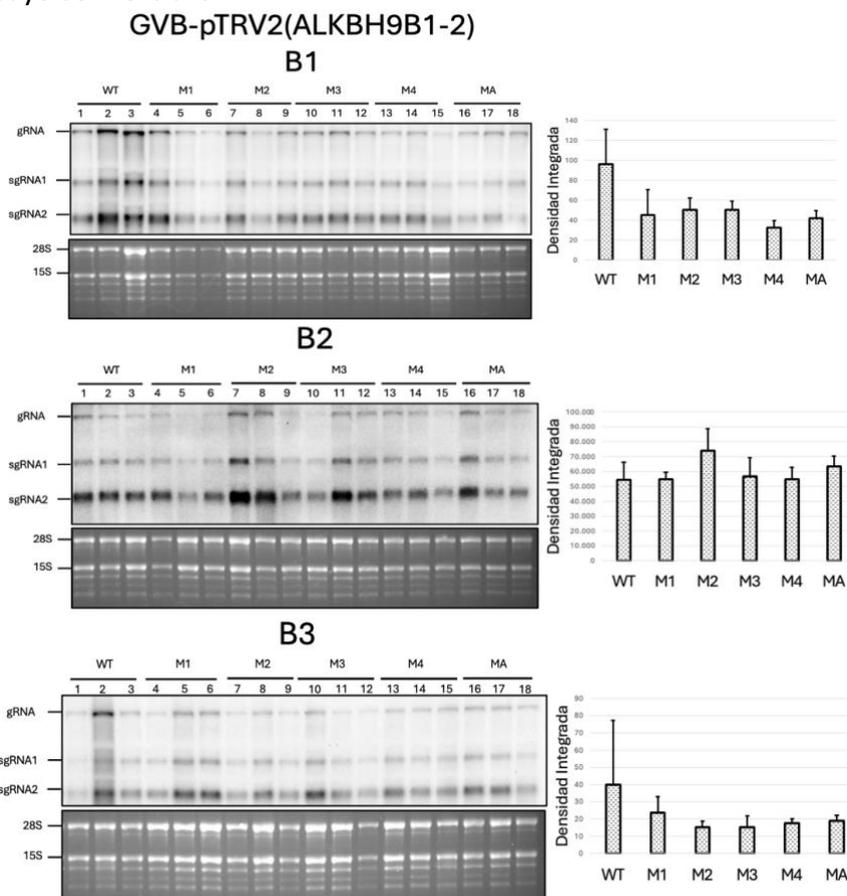


Figura 8: Análisis northern blot (Panel izquierdo) y de densitometría de las señales de hibridación (Panel derecho) de las muestras procedentes de 3 bioensayos (B1, B2 y B3) infectadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) y GVB-WT y sus mutantes correspondientes en plantas de *N. benthamiana*). Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVB. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas one-way ANOVA con un valor de significancia $p < 0,05$.

En primer lugar, para simplificar la visualización de los bioensayos y confirmar la integridad de las muestras de RNA tras la mezcla equimolecular de las tres replicas, se realizaron de nuevo análisis Northern blot de estas muestras mezcladas, mostrando los grupos de plantas silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)) y no silenciadas (pTRV2(GFP)) de cada bioensayo (Figura 9A). Los resultados obtenidos están en consonancia con lo visto anteriormente en los análisis de las muestras por separado, donde la variación en la acumulación viral no siguió una tendencia coherente en los tres bioensayos. Por otro lado, la cuantificación del título viral se realizó con cebadores específicos para la CP de GVB. La localización en el extremo 3' de la región amplificada permitió la cuantificación conjunta tanto del RNA genómico como de los dos subgenómicos, al compartir estos tres RNA la región amplificada. El uso de estos cebadores se decidió tras compararlos con otro par situado dentro de la ORF1, solo presente en el RNA genómico. Como era razonable, la amplificación de la región de la CP detectó una mayor cantidad del virus, más ajustada a la observada en los Northern blots (datos no mostrados). Como muestra de referencia para medir el silenciamiento de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* utilizamos las plantas control no silenciadas infectadas con GVB-WT y las

comparamos inicialmente con las muestras silenciadas infectadas con GVB-WT (Figura 9B). Una vez realizada la cuantificación, se confirmó que, en efecto, el mecanismo de silenciamiento estaba actuando correctamente con aproximadamente un 60 % de silenciamiento de media en el caso de *NbALKBH9B1* y un 40 % en el caso de *NbALKBH9B2*, siendo estos niveles de silenciamiento menores a los esperados según los experimentos iniciales. Esta diferencia en el nivel de expresión de las desmetilasas no se reflejó en la acumulación del título de GVB-WT, donde no se observaron diferencias significativas (p valor = 0,092) entre los grupos de plantas control no silenciadas y silenciadas (Figura 9B). Una vez visto esto, se comparó la acumulación viral de los distintos mutantes con respecto a GVB-WT en plantas silenciadas y no silenciadas, donde se esperaba ver una menor acumulación en plantas con ambas desmetilasas silenciadas. Sin embargo, las diferencias de acumulación viral en todos los mutantes no fue significativa (p valor = 0,494; 0,609; 0,326; 0,95; 0,777 para M1, M2, M3, M4 y MA, respectivamente) (Figura 9C). Cuando se compararon los resultados obtenidos para los distintos mutantes con GVB-WT dentro de los bioensayos de plantas silenciadas, se observó una variación considerable en los niveles de silenciamiento. Las plantas que habían sido inoculadas con los mutantes M1 o MA apenas mostraron un nivel de silenciamiento apreciable de las desmetilasas. Sin embargo, las plantas inoculadas con los mutantes M2, M3 y M4 mostraron niveles de silenciamiento aproximadamente entre el 60-85 %. A pesar de ello, como se ha mencionado con anterioridad, el título viral no se vio significativamente afectado en ningún caso (Figura 9D).

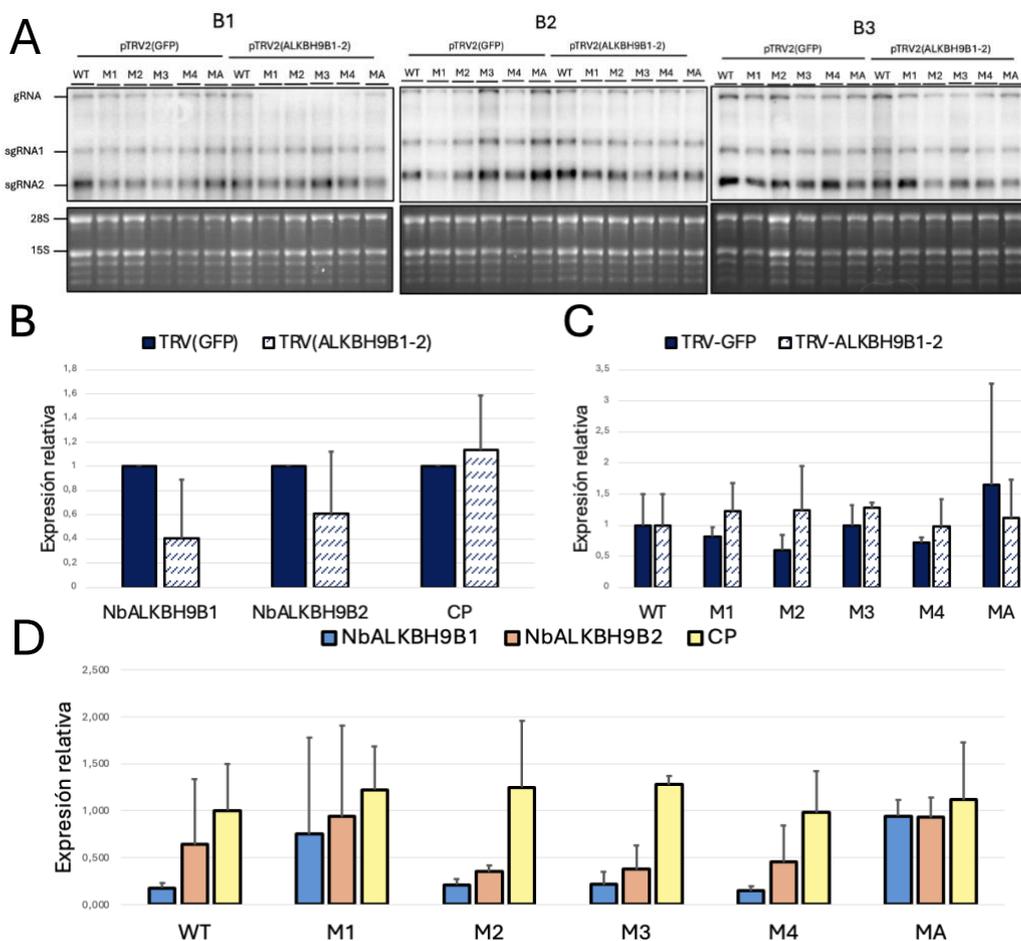


Figura 9: (A) Análisis Northern blot para los bioensayos 1, 2 y 3 (B1, B2 y B3, respectivamente) de plantas infectadas con GVB y sus respectivos mutantes y silenciadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) y no silenciadas control con pTRV2(GFP) de *N. benthamiana*. Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVB (B) Cuantificación relativa de los niveles de los RNA mensajeros de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* y de GVB-WT mediante RT-qPCR de grupos de plantas de *N. benthamiana* control (pTRV2(GFP)) y silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)).(C) Cuantificación relativa de los niveles de GVB-WT y de los mutantes correspondientes mediante RT-qPCR de grupos de plantas de *N. benthamiana* control (pTRV2(GFP)) y silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2) (D) Cuantificación relativa de los niveles de los RNA mensajeros de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* y de GVB-WT y sus respectivos mutantes mediante RT-qPCR. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t para muestras no dependientes aplicando la corrección de Welch's y un valor de significancia $p < 0,05$.

3.5 Efecto sobre la infección de GVA en *N. benthamiana* de las mutaciones puntuales en residuos conservados del dominio AlkB presente en la replicasa viral

Tras analizar el comportamiento de GVB, se realizaron tres nuevos bioensayos siguiendo el mismo procedimiento, pero en este caso usando GVA y sus mutantes correspondientes. Antes de coger muestra, se volvió a analizar el fenotipo de las plantas infectadas, tanto de las silenciadas como de las no silenciadas. A diferencia de GVB, las plantas control no silenciadas e infectadas con los mutantes de GVA no mostraron diferencias aparentes en el tamaño respecto de las infectadas con GVA-WT (Figura 10A). Sin embargo, las plantas silenciadas e infectadas con GVA-M3, GVA-M4 y GVA-MA si mostraron un mayor tamaño respecto de las infectadas con GVA-WT, síntoma de una menor infección viral a causa de la mutación (Figura 10B).

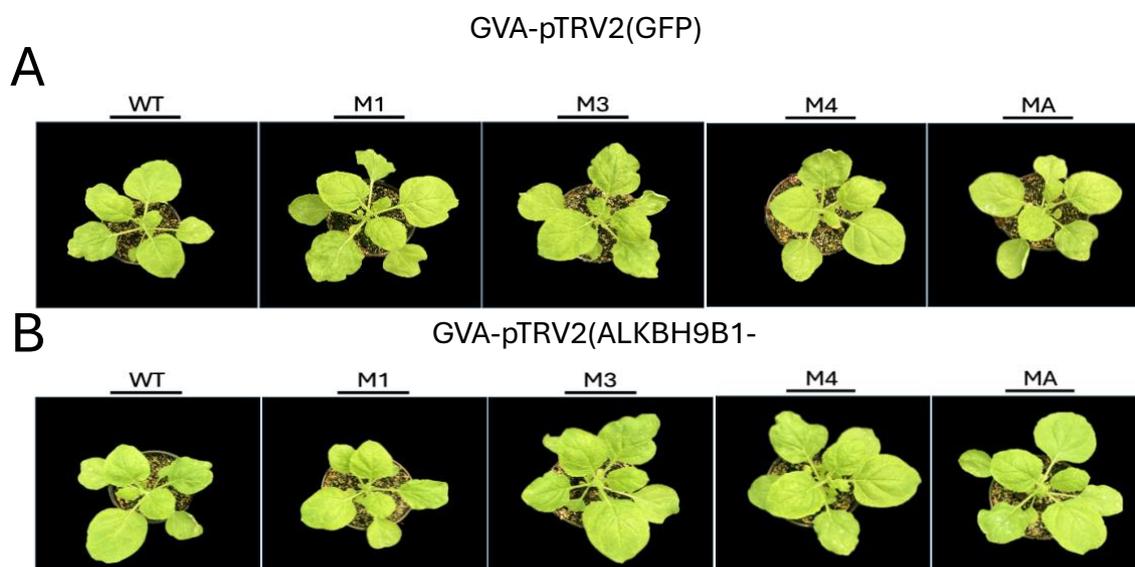


Figura 10: (A) Fotografías realizadas a 7dpi en plano cenital de plantas de *N. benthamiana* infectadas con pTRV2(GFP) y con GVA y sus respectivos mutantes. (B) Fotografías realizadas a 7dpi en plano cenital de plantas de *N. benthamiana* infectadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) y con GVA y sus respectivos mutantes

Posteriormente, las muestras fueron analizadas mediante Northern blot, usando una sonda viral complementaria a la CP de GVA y mediante densitometría de las señales de hibridación. En los análisis northern blot, las muestras WT A corresponden a controles de GVA-WT procedentes de plantas silenciadas. En los bioensayos realizados con plantas control no silenciadas, la acumulación en los mutantes de GVA-M1, GVA-M3 y GVA-M4 presentaron una

tendencia negativa consistente especialmente en dos de los tres bioensayos (B1 y B3). Además, en el B2, aunque no se observa una disminución clara en la acumulación de GVA-M1, M3 y M4, si se observa una reducción significativa (p valor = 0,042) en el caso de GVA-M3 (Figura 11). Sin embargo, en los bioensayos realizados con plantas silenciadas, se detectó una reducción significativa en el título viral en los mutantes GVA-M1, M3 y M4 (p valor = 0,027; 0,043; 0,032 para B1, B2 y B3, respectivamente). Dicho comportamiento se observó de forma consistente en los tres bioensayos para GVA-M3 y M4 (Figura 12), exceptuando GVA-M3 en el bioensayo B3, posiblemente debido al sesgo producido por una de las réplicas.

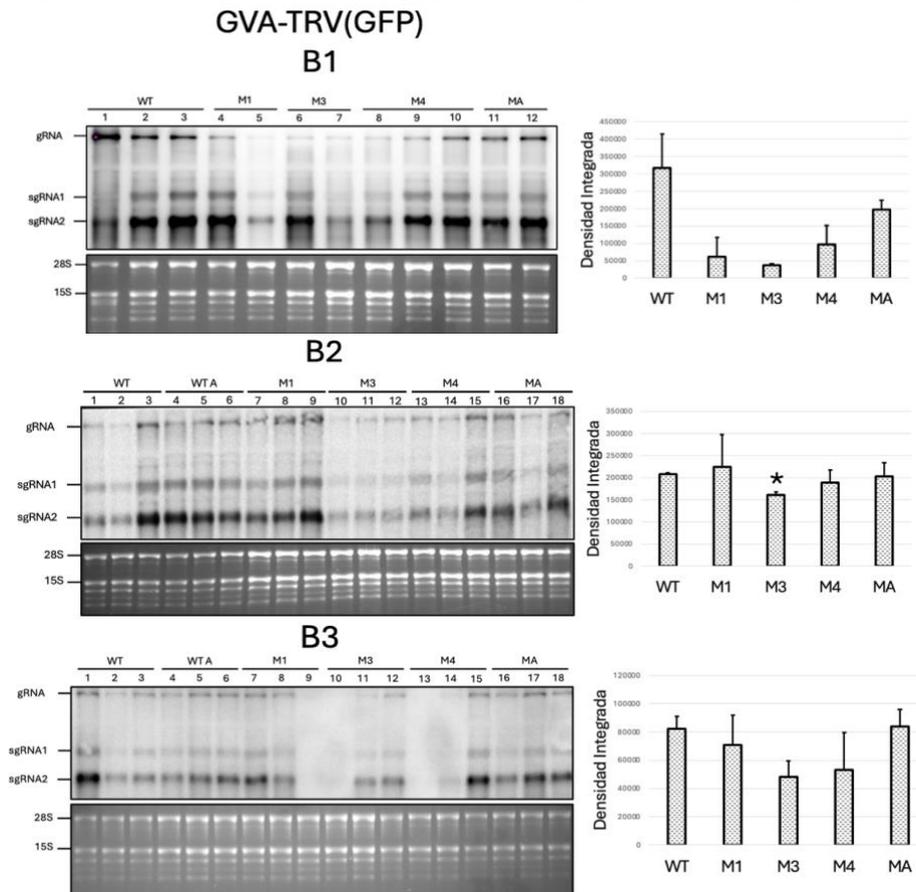


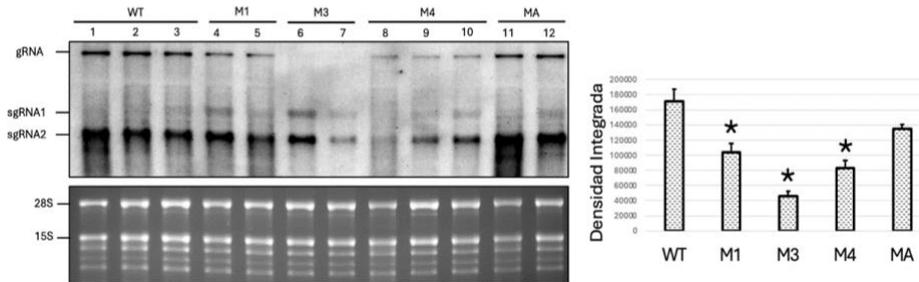
Figura 11: Análisis northern blot de las muestras procedentes de los 3 bioensayos (B1, B2 y B3) de GVA-WT y sus mutantes correspondientes en plantas de *N. benthamiana* no silenciadas control (pTRV2(GFP)). Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVA. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas one-way ANOVA con un valor de significancia $p < 0,05$.

De nuevo, para facilitar la visualización y la interpretación de los resultados, se realizaron análisis por Northern blot juntando las tres réplicas de cada bioensayo. Además, para tener un análisis cuantitativo más exhaustivo se evaluó por RT-qPCR los niveles de silenciamiento de las desmetilasas, *ALKBH9B1* y *ALKBH9B2*, así como el título viral. Como en el caso de GVB, primero comparamos cada bioensayo analizando por Northern blot, en el mismo gel, las muestras de plantas silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)) y sin silenciar (pTRV2(GFP)) (Figura 13A). De nuevo, en consonancia con lo visto anteriormente analizando las muestras por separado, se observó una reducción en la acumulación del título viral de forma consistente en los mutantes GVA-M3 y GVA-M4. Tras esto, se analizó el efecto de silenciar las desmetilasas del huésped en la infección con GVA-WT, tomando como referencia las plantas no silenciadas

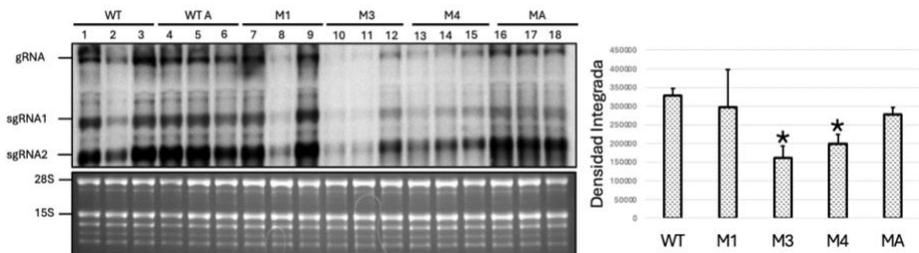
infectadas con GVA-WT. El silenciamiento observado fue del 30 % en el caso de *ALKBH9B1* y del 50 % en el caso de *ALKBH9B2*.

GVA-TRV(ALKBH9B1-2)

B1



B2



B3

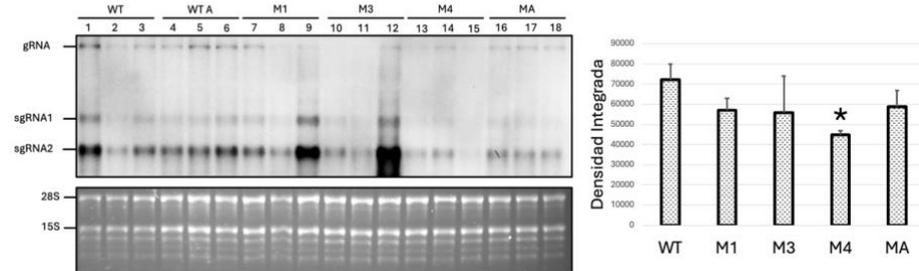


Figura 12: Análisis Northern blot de las muestras procedentes de los 3 bioensayos (B1, B2 y B3) de GVA-WT y sus mutantes correspondientes en plantas de *N. benthamiana* silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)). Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVA. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante pruebas one-way ANOVA con un valor de significancia $p < 0,05$.

Los niveles de silenciamiento observados en estas muestras fueron menores a los esperados según los experimentos iniciales. Sin embargo, se pudieron observar diferencias significativas en la acumulación del GVA-WT en las plantas silenciadas (p valor = 0,026), con una reducción de entorno al 60 % de media respecto de las plantas sin silenciar (Figura 13B). Al comparar la infección por los mutantes en ambos grupos de plantas respecto de GVA-WT (Figura 13C), se observó una reducción significativa (p valor = 0,015; 0,005; 0,004) en el caso de GVA-M1, M3 y M4 en plantas silenciadas frente a plantas no silenciadas. En el caso de la comparación entre los mutantes de GVA y GVA-WT, dentro de los bioensayos con plantas silenciadas, de nuevo se volvió a observar un silenciamiento inferior al esperado de entorno al 30-50% de ambas desmetilasas, siendo este silenciamiento en el caso de GVA-M3 prácticamente inexistente para *ALKBH9B1*. Aun así, se observó una reducción significativa en la acumulación viral en los mutantes GVA-M1, M3 y M4, respecto de GVB-WT, como se ha mencionado anteriormente,

siendo M4 el que mayor reducción presentó, lo cual era esperable al presentar más alteraciones del dominio AlkB viral (Figura 13D). Sin embargo, la reducción del título del mutante MA, que no modifica los dominios AlkB virales, fue del 20 %, considerablemente menor que en los tres mutantes anteriores. Por tanto, nuestros resultados indican que las mutaciones en los dominios de unión a hierro y a 2-OG reducen significativamente la capacidad de GVA para replicarse y producir progenie viral, y que este efecto negativo se ve acentuado en un escenario donde la actividad desmetilasa de la planta se ve reducida.

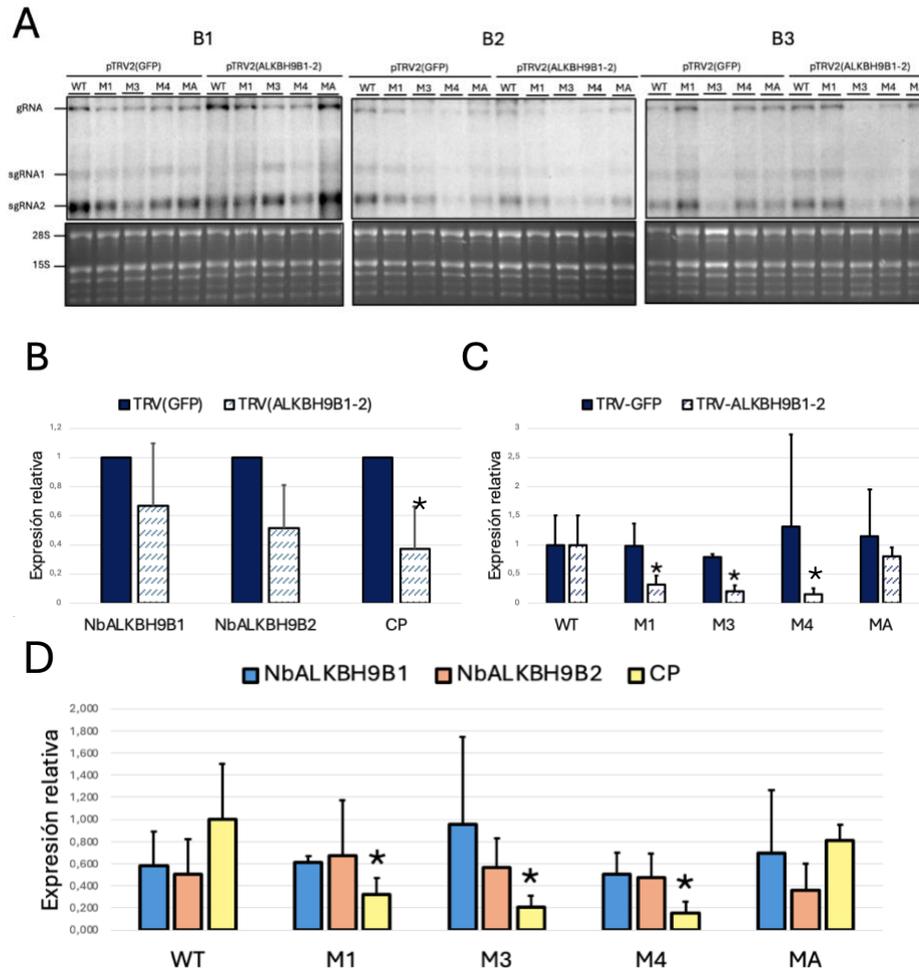


Figura 13: (A) Análisis Northern blot para los bioensayos 1, 2 y 3 (B1, B2 y B3, respectivamente) de plantas infectadas con GVA y sus respectivos mutantes y silenciadas con pTRV2(ALKBH9B1-2) y no silenciadas control con pTRV2(GFP) de *N. benthamiana*. Las muestras fueron hibridadas con una sonda viral complementaria a la CP de GVA. (B) Cuantificación relativa de los niveles de los RNA mensajeros de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* y de GVA-WT mediante RT-qPCR de grupos de plantas de *N. benthamiana* control (pTRV2(GFP)) y silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)). (C) Cuantificación relativa de los niveles de GVA-WT y de los mutantes correspondientes mediante RT-qPCR de grupos de plantas de *N. benthamiana* control (pTRV2(GFP)) y silenciadas (pTRV2(ALKBH9B1-2)). (D) Cuantificación relativa de los niveles de los RNA mensajeros de *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* y de GVA-WT y sus correspondientes mutantes. Los asteriscos marcan diferencias significativas entre muestras. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas t para muestras no dependientes aplicando la corrección de Welch's y un valor de significancia $p < 0,05$.

Discusión

Son ya muchos los estudios que señalan el papel de la modificación del RNA como un mecanismo de regulación génica postranscripcional, y este campo ha sido denominado "epitranscriptómica". La modificación m6A afecta a varios tipos de RNA, pero es la más abundante entre los RNA mensajeros eucariotas. Esta modificación se ha visto implicada en varios pasos del metabolismo de los RNA mensajeros incluyendo, su procesamiento, su exportación, su traducción, pero también su estabilidad. En este sentido, se ha observado que la presencia de la modificación m6A en los RNAm puede ocasionar tanto una degradación rápida de los mismos (Yujin et al, 2020) o, dependiendo de los entornos celulares apropiados favorecer su estabilidad (ej. Huang et al., 2018).

Por otra parte, cada vez son más las pruebas que indican que la modificación m6A también representa un mecanismo alternativo de defensa antiviral en mamíferos y plantas. En el caso de las infecciones virales en plantas, la modificación m6A parece desempeñar un papel dual. Por un lado, la ruta m6A actúa como una respuesta inmune de la planta inducida por la infección viral, inhibiendo la replicación o traducción del virus mediante la metilación de los RNA genómicos virales que entrarían en una ruta de degradación, como en el caso de los RNA mensajeros. Por otro lado, los virus de plantas podrían eludir la ruta de modificación m6A como parte de una estrategia de evasión, interactuando con proteínas relacionadas de la propia ruta en su propio beneficio, por ejemplo, desmetilasas. Alternativamente, existen virus que contienen dominios conservados con una posible actividad desmetilasa dentro de sus propias proteínas. Sin embargo, se sabe muy poco sobre la implicación real de estos dominios en la regulación de las modificaciones m6A durante la infección viral. Por este motivo, durante este trabajo final de máster, se ha realizado un análisis funcional de los dominios desmetilasa AlkB (Alkylation repair homolog B) conservados en dos especies virales del género *Vitivirus* como lo son GVA y GVB.

Los resultados obtenidos permitieron observar una diferencia entre ambos virus con respecto a los efectos ocasionados por la alteración de la actividad de las desmetilasas, tanto de la planta huésped (NbALKBH9B1 y 2) como del propio virus (dominio AlkB conservado de la replicasa viral), sugiriendo que la posible eliminación de la modificación m6A del RNA viral estaría relacionada con la respuesta de defensa de la planta y con el ciclo infectivo viral, al menos en el caso de GVA. En una hipótesis inicial, la presencia de los dominios AlkB virales conservados en GVA y GVB permitirían la autoeliminación de las modificaciones m6A producidas por las metilasas del huésped en respuesta a la infección permitiendo su avance. Por tanto, se esperaba observar un efecto negativo en la infección de las versiones de GVA y GVB con sus dominios AlkB alterados tras infectar plantas en las cuales las desmetilasas endógenas no fueron silenciadas (plantas silvestres). Sin embargo, esta tendencia sólo pudo observarse en plantas de *N. benthamiana* infectadas con GVA, aunque este efecto no fue lo suficientemente grande como para demostrar una reducción consistente en el título de los mutantes, siendo ésta significativa únicamente en un bioensayo (B2) y solo con el mutante

GVA-M3 (Figura 11). Además, al comparar el fenotipo de las plantas tampoco pudieron verse diferencias en las plantas infectadas con los mutantes respecto de GVA-WT.

Por otro lado, en el caso de GVB, esta tendencia pudo observarse en dos de los bioensayos realizados en *N. occidentalis* (B2 y B3) (Figura 5) y en un único bioensayo (B3) en *N. benthamiana*, (Figura 7) sin ser esta diferencia significativa. En el resto de los bioensayos en *N. benthamiana* y en *N. occidentalis* no se observó esta misma tendencia, aunque al comparar a las plantas fenotípicamente, si se pudo observar una sintomatología más suave en el caso de las plantas infectadas con GVB-M2, M3 y M4.

Estos resultados no coinciden con lo observado previamente con el virus de las manchas cloróticas del manzano (ACLSV, apple chlorotic leaf spot virus) en nuestro laboratorio. Este virus, al igual que GVA y GVB, posee un dominio AlkB conservado en su replicasa. Sin embargo, las mutaciones en los dominios de unión a hierro y 2-OG, provocaron reducciones significativas en la acumulación de todos los mutantes respecto de ACLSV-WT, en *N. occidentalis*, destacando los efectos negativos provocados por las mutaciones equivalentes a M3 y M4 descritas en este trabajo. Esto, aunque resulta llamativo, puede deberse a que, aunque se trata de virus de la misma familia (*Betaflexiviridae*) y cabría esperar un comportamiento similar en todos ellos, pertenecen a géneros distintos; trichovirus, en el caso de ACLSV y vitivirus, en el caso de GVA y GVB. Además, presentan una organización genómica diferente. Mientras que el genoma ACLSV solo contiene tres genes que codifican la replicasa y las proteínas de movimiento y cubierta, GVA y GVB, aparte de esos tres presentan una ORF2 (19-20 kDa) de función desconocida y una ORF5 (10-14 kDa), que codifica una proteína rica en cisteínas que, como se verá posteriormente en más detalle, ha sido descrita como un supresor del silenciamiento génico postranscripcional (Davino et al, 2020). En cambio, ninguna de las proteínas de ACLSV pudo suprimir el silenciamiento a nivel local, aunque la MP fue capaz de bloquear la señal sistémica inducida tanto por RNA monocatenario como bicatenario (Yaegashi et al., 2007). Esto indicaría que sus estrategias para evadir la maquinaria de defensa del huésped podrían ser distintas también y ser la razón por la cual los tres virus presentan una gama de hospedadores experimentales distinta, *N. benthamiana* en el caso de GVA, *N. occidentalis* en el caso de ACLSV y ambas especies de *Nicotiana* en el caso de GVB.

Tras los resultados anteriores, nos planteamos dos alternativas. En la primera los dominios conservados AlkB de GVA y GVB podrían no ser funcionales. En este escenario, la estrategia principal de contraataque de estos virus frente a la respuesta defensiva del huésped estaría dirigida principalmente a suprimir el silenciamiento génico postranscripcional inducido por la planta a través de los supresores virales (ORF5). En una segunda hipótesis, la utilización de huéspedes experimentales herbáceos podría estar sesgando los resultados. Tanto GVA como GVB son virus que de forma natural se encuentran confinados en el floema de la vid, una planta leñosa perenne que puede vivir muchas décadas y que sufre un periodo de letargo en invierno durante el cual el virus debe persistir. En estas etapas, el metabolismo de la planta se ralentiza y la actividad enzimática decae. El acceso a la actividad desmetilasa de la planta por

parte del virus puede verse restringida en estos tejidos y periodos. Esta situación es muy diferente a la que puede darse en *Nicotiana sp.*, ya que GVA y GVB podrían ser sustrato tanto de las metilasas del huésped como de las desmetilasas.

Partiendo de estas dos hipótesis decidimos analizar también la influencia de las desmetilasas del huésped sobre la infección de GVA y GVB. Para ello decidimos repetir los experimentos anteriores para observar el efecto que las mutaciones de los dominios AlkB de las replicasas de GVA y GVB tienen sobre la infección, pero esta vez en plantas de *N. benthamiana* donde los genes que expresan las dos isoformas homólogas de la desmetilasa ALKBH9B de *Arabidopsis* estuvieran silenciados. Los genes *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2* se silenciaron de forma parcial con el empleo de la técnica de silenciamiento inducido por virus (VIGS) y con TRV, en *N. benthamiana*. Tras el silenciamiento, los resultados obtenidos con GVA fueron llamativos, ya que por Northern blot se observó una reducción significativa en el caso del GVA-M4 en todos los bioensayos, además de observar también reducciones significativas en GVA-M3 en 2 bioensayos (B1 y B2) y GVA-M1 en un bioensayo (B1) (Figura 12). Además, también se observó una sintomatología más suave en el caso de las plantas infectadas con GVA-M3 y M4 (Figura 10).

La cuantificación mediante qRT-PCR (Figura 13), confirmó los resultados anteriores observándose una reducción significativa en el título viral de los tres mutantes que presentan los dominios AlkB alterados respecto a GVA-WT (entre un 70-85 %). En cambio, GVA-MA, aunque también mostró una reducción del título viral solo fue de un 20 %, presentando un comportamiento más similar a GVA-WT que al resto de mutantes. Esto daría evidencias de que GVA es capaz de hacer uso de las desmetilasas del huésped para retirar la modificación m6A de su propio genoma y evitar ser diana de la maquinaria inmune del huésped, ya que al retirar estas desmetilasas del proceso de infección y además mutar los dominios AlkB del virus, la infección disminuye. Aunque esta desmetilación podría ser circunstancial, no podemos descartar que algunas de las proteínas de GVA sean capaces de secuestrar las desmetilasas del huésped para poder retirar la modificación m6A de su genoma, al igual que lo hace AMV (Martínez-Pérez et al., 2017).

Además, estos resultados darían una mayor relevancia funcional al dominio de unión a 2-OG sobre el dominio de unión a hierro, ya que la reducción del título viral fue mayor en aquellos mutantes que afectaban al dominio de unión a 2-OG. Por otra parte, los niveles de silenciamiento obtenidos no fueron los esperados, siendo en algunos casos bastante inferiores a los obtenidos en las pruebas iniciales. A pesar de esto, se pudieron ver reducciones significativas en la acumulación del virus, por lo que entendemos que, si se hubieran obtenido niveles mayores de silenciamiento, los efectos en la infección hubieran sido más evidentes.

En el caso de GVB se observó una tendencia a que los mutantes se acumulasen en menor medida que GVB-WT en dos de tres bioensayos (B1 y B3) con plantas silenciadas (Figura 8), sin embargo y a diferencia de lo que pudo observarse con GVA, estas reducciones no resultaron significativas. Además, la sintomatología fue más suave únicamente en las plantas

infectadas con GVB-M4. Esto no descarta la posibilidad de que al igual que con AMV, de nuevo GVB sea capaz de secuestrar las desmetilasas del huésped y evitar su maquinaria inmune. Esto podría ocurrir ya que al igual que con los experimentos con GVA, el nivel de silenciamiento obtenido fue menor al esperado en las pruebas iniciales, por lo que realmente la infección por GVB no se estuvo desarrollando en un fondo totalmente libre de desmetilasas.

Una solución para este problema podría ser la obtención de líneas mutantes nulas de *N. benthamiana* para los genes *NbALKBH9B1* y *NbALKBH9B2*, asegurando así la ausencia total de desmetilasas. Esta solución no se ha abordado inicialmente debido a que se trata de un proceso largo alejado del calendario de este trabajo, aunque no se descarta realizarlo en un futuro. De igual forma, no se realizaran los bioensayos de GVB en *N. occidentalis* silenciadas, debido a que las desmetilasas de este huésped no están secuenciadas y además desconocemos la capacidad de TRV para infectar a esta planta y actuar como vector de silenciamiento puesto que sólo hay un ejemplo en la bibliografía en el que se describe la infección de TRV en *N. occidentalis* (Crosslin & Thomas, 1995). Por ello, silenciar las desmetilasas de este huésped también sería un proceso largo, ya que habría que conocer la secuencia de éstas y comprobar que TRV es infectivo en esta especie.

Llama la atención las diferencias observadas entre GVB y GVA, aun siendo ambos virus del género *Vitivirus* y especies muy cercanas filogenéticamente, que por tanto se esperaría que actuaran de igual forma ante un mismo tratamiento, como es el silenciamiento de las desmetilasas del huésped. Sin embargo, como hemos podido comprobar, no presentan el mismo comportamiento. Como se ha comentado anteriormente, esta situación puede deberse a diferencias en el genoma de ambos que, aunque presentan la misma organización genómica con cinco ORF, pueden existir a nivel de cada proteína provocando un resultado distinto. Además, el hecho de que GVB es capaz de infectar *N. occidentalis* y *N. benthamiana* mientras que GVA solo infecta *N. benthamiana* evidencia alguna diferencia funcional en alguna proteína de ambos virus.

Esta diferencia podría radicar en las diferentes proteínas que ambos virus codifican en su ORF5. Estas proteínas son la p10 de GVA y la p15 de GVB. Se ha visto que ambas proteínas están relacionadas con la supresión del silenciamiento del huésped, a través de la unión e inactivación de siRNA en el caso de la p10 de GVA (Zhou et al., 2006), y a través de una señal de localización nucleolar en el caso de la p15 de GVB (NoLS) (Davino et al., 2020). Aunque no se ha descrito con detalle los mecanismos de acción de ambas proteínas, estos podrían ser diferentes. Como se ha comentado anteriormente, estas proteínas suponen una estrategia adicional a la desmetilación para evitar la maquinaria defensiva del huésped durante el ciclo infectivo del virus, lo cual, según una de nuestras hipótesis, explicaría por qué no se observa una reducción mayor en la acumulación de los mutantes infectando plantas con las desmetilasas silenciadas. Además, también daría explicación a por qué GVB es más resistente a la metilación del huésped, ya que la p15 actúa a nivel de nucleolo mientras que la p10 de GVA depende de la probabilidad de encontrar siRNA para unirse a ellos e inactivarlos, lo que

supondría una mayor efectividad de la p15 durante el ciclo viral. Esto también podría explicar la diferente gama de huéspedes que presentan GVA y GVB, asumiendo que el silenciamiento producido por *N. occidentalis* es mayor que el de *N. benthamiana*.

En vista de los resultados obtenidos con GVA y GVB y de lo observado previamente con otros virus como AMV y ACLSV, se puede determinar que las desmetilasas desempeñan un papel en el mecanismo de defensa de la planta y que el propio virus puede hacer uso de ellas para mejorar su infección. Sin embargo, no es el único mecanismo empleado por el virus para poder evadir la respuesta inmune de la planta, ya que tanto GVA como GVB presentan proteínas supresoras del silenciamiento. Por ello, con el fin de confirmar todas las hipótesis que se plantean tras este estudio, se podrían realizar experimentos donde estos virus presentasen estos supresores del silenciamiento mutados, esperando obtener niveles de acumulación menores. Esto se podría complementar, como se ha comentado anteriormente, aplicando un fondo en el que las desmetilasas del huésped se encuentren silenciadas de forma total y no parcial como se encuentran en este trabajo, quedando aún por conocer los factores que provocan las diferencias durante la infección en virus con presencia de dominios AlkB en su genoma.

Conclusiones

La modificación m6A desempeña un papel clave en el metabolismo del RNA, pero también en la respuesta de las plantas contra las infecciones de virus con genomas de RNA. Su efecto es dual, favoreciendo la estabilidad o la degradación del RNA en función del contexto celular. Por ello, algunos virus pueden desarrollar estrategias para eludir esta modificación, como el uso de las desmetilasas propias del huésped. Sin embargo, otros virus presentan dominios desmetilasa (AlkB) en sus replicasas cuya función in planta no ha sido caracterizada.

En este trabajo final de máster se ha estudiado la posible implicación funcional de los dominios AlkB conservados en las replicasas de los vitivirus GVA y GVB durante el ciclo de infección viral, así como el papel desempeñado por las desmetilasas ALKBH9B del huésped. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. GVA y GVB, a pesar de ser virus filogenéticamente cercanos, pertenecer al mismo género *Vitivirus* y presentar dominios desmetilasa (AlkB) similares en sus proteínas replicasas, muestran un comportamiento diferencial en su respuesta a la eliminación de los sitios de unión a 2-OG y Fe. Mientras que la acumulación de GVB no se ve afectada, GVA presenta una clara tendencia negativa poniendo de manifiesto la funcionalidad del dominio AlkB en GVA. Estos resultados sugieren que estas especies podrían emplear mecanismos distintos para infectar a sus hospedadores y presentar diferencias funcionales en sus mecanismos de evasión, que podría atribuirse, por ejemplo, a una mayor relevancia de los mecanismos de supresión del silenciamiento de RNA frente a la metilación en GVB.
2. La funcionalidad del dominio AlkB en GVB no se puede descartar aún, considerando que la utilización de plantas herbáceas como modelo experimental podría no reflejar completamente el comportamiento de estos virus en vid, su hospedador natural. Una planta leñosa y perenne con periodos de letargo invernales en los cuales los mecanismos de metilación podrían prevalecer sobre los sistemas de silenciamiento génico como estrategia antiviral en la planta.
3. El efecto negativo de la eliminación de los sitios de unión a 2-OG y Fe en la acumulación de GVA se incrementa cuando la expresión de las desmetilasas del huésped (NbALKBH9B1 y NbALKBH9B2) se reduce mediante mecanismos de silenciamiento génico mediado por TRV, indicando que el genoma de GVA puede ser también sustrato de las desmetilasas endógenas. Por tanto, no podemos descartar la existencia de un mecanismo similar al de AMV en GVA para la desmetilación del genoma, coexistiendo con la posible actividad desmetilasa de la replicasa viral.

Bibliografia

- Adams, M.J., Antoniw, J.F., Bar-Joseph, M., Brunt, A.A., Candresse, T., Foster, G.D., Martelli, G.P., Milne, R.G., Zavriev, S.K., & Fauquet, C.M. (2004). The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*, 149(8), 1672–1672. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0384-x>
- Alvarado-Marchena, L., Márquez-Molins, J., Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., & Pallás, V. (2021). Mapping of Functional Subdomains in the atALKBH9B m6A-Demethylase Required for Its Binding to the Viral RNA and to the Coat Protein of Alfalfa Mosaic Virus. *Frontiers in Plant Science*, 12, 701683. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701683>
- Alvarado-Marchena, L., Martínez-Pérez, M., Úbeda, J.R., Pallás, V., & Aparicio, F. (2022). Impact of the Potential m6A Modification Sites at the 3'UTR of Alfalfa Mosaic Virus RNA3 in the Viral Infection. *Viruses*, 14(8), 1718. <https://doi.org/10.3390/v14081718>
- Amara, U., Shoib, Y. & Kang, H. (2022). ALKBH9C, a potential RNA m6A demethylase, regulates the response of Arabidopsis to abiotic stresses and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment*, 2022;1–16. DOI: 10.1111/pce.14447
- Aravind, L., & Koonin, E.V. (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and Ipreca define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology*, 2(3), research0007.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-3-research0007>
- Arribas-Hernández, L., Bressendorff, S., Hansen, M.H., Poulsen, C., Erdmann, S., & Brodersen, P. (2018). An m6A-YTH Module Controls Developmental Timing and Morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 30(5), 952–967. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00833>
- Arribas-Hernández, L., & Brodersen, P. (2020). Occurrence and Functions of m6A and Other Covalent Modifications in Plant mRNA. *Plant Physiology*, 182(1), 79–96. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01156>
- Azzam, S.K., Alsafar, H., & Sajini, A.A. FTO m6A Demethylase in Obesity and Cancer: Implications and Underlying Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Science*. 23(7):3800. doi: 10.3390/ijms23073800
- Baquero-Pérez, B., Geers, D., & Díez, J. (2021). From A to m6A: The Emerging Viral Epitranscriptome. *Viruses*, 13(6), 1049. <https://doi.org/10.3390/v13061049>
- Batten, J.S., Yoshinari, S., & Hemenway, C. (2003). Potato virus X: A model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology*, 4(2), 125–131. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00156.x>
- Belmont, P., Constant, J.F., & Demeunynck, M. (2001). Nucleic acid conformation diversity: From structure to function and regulation. *Chemical Society Reviews*, 30(1), 70–81. <https://doi.org/10.1039/a904630e>
- Bem, F., & Murant, A.F. (1979). Host range, purification and serological properties of heracleum latent virus. *Annals of Applied Biology*, 92(2), 243–256. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb03870.x>
- Bokar, J. A., Rath-Shambaugh, M. E., Ludwiczak, R., Narayan, P., & Rottman, F. (1994). Characterization and partial purification of mRNA N6-adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. Internal mRNA methylation requires a multisubunit complex. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17697–17704. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32497-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32497-3)
- Bokar J.A., Shambaugh ME, Polayes D, Matera AG, Rottman FM. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*. 3(11):1233-1247.
- Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M. A., Gonsalves, D., & Martelli, G.P. (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology*, 130(1–2), 109–120. <https://doi.org/10.1007/BF01319000>
- Bratlie, M.S., & Drabøl, F. (2005). Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BMC Genomics*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-1>
- Canaani, D., Kahana, C., Lavi, S., & Groner, Y. (1979). Identification and mapping of N⁶-methyladenosine containing sequences in Simian Virus 40 RNA. *Nucleic Acids Research*, 6(8), 2879–2899. <https://doi.org/10.1093/nar/6.8.2879>
- Cha-aim, K., Hoshida, H., Fukunaga, T., & Akada, R. (2012). Fusion PCR via Novel Overlap Sequences. In: Peccoud, J. (eds) Gene Synthesis. Methods in Molecular Biology, vol 852. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-564-0_8
- Cheng, X. (1995). DNA modification by methyltransferases. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(1), 4–10. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(95\)80003-J](https://doi.org/10.1016/0959-440X(95)80003-J)
- Davino, S., Ruiz-Ruiz, S., Serra, P., Forment, J. & Flores, R. (2020). Revisiting the cysteine-rich proteins encoded in the 3'-proximal open reading frames of the positive-sense single-stranded RNA of some monopartite filamentous plant viruses: functional dissection of p15 from grapevine virus B. *Archives of Virology*. 165(10):2229-2239. doi:10.1007/s00705-020-04729-w.
- Davis, F.F., & Allen, F.W. (1957) Ribonucleic acids from yeast which contain a fifth nucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, 227(2):907-15. PMID: 13463012.
- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of Methylated Nucleosides in Messenger RNA from Novikoff Hepatoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3971–3975. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>
- Duan, H-C., Wang, Y., & Jia, G. (2017). Dynamic and reversible RNA N6-methyladenosine methylation. *WIREs RNA*. e1507. <https://doi.org/10.1002/wrna.150>.
- Duechler, M., Leszczyńska, G., Sochacka, E., & Nawrot, B. (2016). Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: Focus on tRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(16), 3075–3095. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2217-y>
- Esteve-Puig, R., Bueno-Costa, A., & Esteller, M. (2020). Writers, readers and erasers of RNA modifications in cancer. *Cancer Letters*, 474, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.021>
- Fedeles, B.I., Singh, V., Delaney, J. C., Li, D., & Essigmann, J.M. (2015). The AlkB Family of Fe (II)/ α -Ketoglutarate-dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. *Journal of Biological Chemistry*, 290(34), 20734–20742. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.656462>

- Fuchs, M., Bar-Joseph, M., Candresse, T., Maree, H.J., Martelli, G.P., Melzer, M. J., Menzel, W., Minafra, A., Sabanadzovic, S., & Report Consortium, I. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Closteroviridae. *Journal of General Virology*, 101(4), 364–365. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001397>
- Furuichi, Y., Muthukrishnan, S., Tomasz, J., & Shatkin, A. J. (1976). Mechanism of formation of reovirus mRNA 5'-terminal blocked and methylated sequence, m7GpppGmpC. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 5043–5053. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33218-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33218-0)
- Galiakparov, N., Tanne, E., Sela, I., & Gafny, R. (2003). Functional analysis of the grapevine virus a genome. *Virology*, 306(1), 42–50. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00019-3)
- García, J. A., & Pallás, V. (2015). Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 11, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.001>
- Gokhale, N.S., McIntyre, A.B.R., McFadden, M.J., Roder, A.E., Kennedy, E.M., Gandara, J.A., Hopcraft, S.E., Quicke, K.M., Vazquez, C., Willer, J., Ilkayeva, O.R., Law, B.A., Holley, C.L., Garcia-Blanco, M.A., Evans, M.J., Suthar, M.S., Bradrick, S.S., Mason, C.E., & Horner, S.M. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host & Microbe*, 20(5), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.015>
- Grosjean, H. (Ed.). (2009). DNA and RNA modification enzymes: Structure, mechanism, function and evolution. Landes Bioscience.
- He, L., Li, H., Wu, A., Peng, Y., Shu, G., & Yin, G. (2019). Functions of N6-methyladenosine and its role in cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 176. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1109-9>
- He, Y., Li, L., Yao, Y., Li, Y., Zhang, H. & Fan, M. (2021). Transcriptome-wide N6-methyladenosine (m6A) methylation in watermelon under CGMMV infection. *BMC Plant Biology*, 21, 516 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03289-8>
- He, M., Li, Z., & Xie, X. (2023). The Roles of N6-Methyladenosine Modification in Plant-RNA Virus Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15608. <https://doi.org/10.3390/ijms242115608>
- Heinlein, M. (2015). Plant virus replication and movement. *Virology*, 479–480, 657–671. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.025>
- Horiuchi, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Ohashi, R., Naito, M., Kodama, T., & Hamakubo, T. (2013). Identification of Wilms' Tumor 1-associating Protein Complex and Its Role in Alternative Splicing and the Cell Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33292–33302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.500397>
- Horner, S. M. and Reaves, J.V. (2024). Recent insights into N6-methyladenosine during viral infection. *Current Opinion in Genetics & Development*, 87:102213. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102213>
- Hotchkiss, R.D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 175(1), 315–332. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57261-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57261-6)
- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B.S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C.L. et al (2018) Recognition of RNA N6 methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, 20:285–295
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0)
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.-G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, 7(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
- Jiang, T., & Zhou, T. (2023). Unraveling the Mechanisms of Virus-Induced Symptom Development in Plants. *Plants*, 12(15), 2830. <https://doi.org/10.3390/plants12152830>
- Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021). The role of m6A modification in the biological functions and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jones, R.A.C. (2016). Future Scenarios for Plant Virus Pathogens as Climate Change Progresses. In *Advances in Virus Research* (Vol. 95, pp. 87–147). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.02.004>
- Jones, R.A.C., & Naidu, R.A. (2019). Global Dimensions of Plant Virus Diseases: Current Status and Future Perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>
- Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J. J., Vågbø, C. B., Geula, S., Hanna, J. H., Black, D. L., Darnell, J. E., & Darnell, R. B. (2017). M⁶A mRNA modifications are deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify cytoplasmic turnover. *Genes & Development*, 31(10), 990–1006. <https://doi.org/10.1101/gad.301036.117>
- Kim, J., Kim, Y., Yeom, M., Kim, J.-H., & Nam, H. G. (2008). FIONA1 Is Essential for Regulating Period Length in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *The Plant Cell*, 20(2), 307–319. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055715>
- Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S.H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M.A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., & Roignant, J.-Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m⁶A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes & Development*, 32(5–6), 415–429. <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
- Kreuze, J.F., Vaira, A. M., Menzel, W., Candresse, T., Zavriev, S.K., Hammond, J., Hyun Ryu, K., & Report Consortium, I. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology*, 101(7), 699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Lavi, S., & Shatkin, A.J. (1975). Methylated simian virus 40-specific RNA from nuclei and cytoplasm of infected BSC-1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(6), 2012–2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2012>
- Lee, Y., Choe, J., Park, O.H., & Kim, Y.K. Molecular Mechanisms Driving mRNA Degradation by m6A Modification. *Trends Genet.* 2020 Mar;36(3):177-188. doi: 10.1016/j.tig.2019.12.007. Epub 2020 Jan 18. PMID: 31964509.
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., & Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708–D717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Li, Z., Shi, J., Yu, L., Zhao, X., Ran, L., Hu, D. & Song, B. (2018). N6-methyl-adenosine level in *Nicotiana tabacum* is associated with tobacco mosaic virus. *Virological Journal*, 15, 87. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0997-4>

- Linder, B., Grozhik, A.V., Olarerin-George, A.O., Meydan, C., Mason, C.E., & Jaffrey, S.R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature Methods*, 12(8), 767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Linder, B., & Jaffrey, S.R. (2019). Discovering and Mapping the Modified Nucleotides That Comprise the Epitranscriptome of mRNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(6), a032201. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032201>
- Liu, N., Zhou, K.I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., & Pan, T. (2017). N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Research*, 2;45(10):6051-6063. doi: 10.1093/nar/gkx141.
- Liu, Y., Schiff, M. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31: 777-786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01394.x>
- López-Gomollón, S., & Baulcombe, D.C. (2022). Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 23(10):645-662. doi: 10.1038/s41580-022-00496-5.
- López-Pérez, A.G., de la Cruz Piedra, A., Reyes-Taboada, J.L., & Diaz-Camino, C. (2021). El Epitranscriptoma: Escribiendo Borrando y Leyendo la Metilación en el RNA Mensajero. *Revista de Educación Bioquímica*, 40 (2), 48-60
- Luo, G.-Z., MacQueen, A., Zheng, G., Duan, H., Dore, L.C., Lu, Z., Liu, J., Chen, K., Jia, G., Bergelson, J., & He, C. (2014). Unique features of the m6A methylome in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 5(1), 5630. <https://doi.org/10.1038/ncomms6630>
- Ma, W., Cui, S., Lu, Z., Yan, X., Cai, L., Lu, Y., Cai, K., Zhou, H., Ma, R., Zhou, S., & Wang, X. (2022). YTH Domain Proteins Play an Essential Role in Rice Growth and Stress Response. *Plants*, 11(17), 2206. <https://doi.org/10.3390/plants11172206>
- Marcinkowski, M., Pilżys, T., Garbicz, D., Steciuk, J., Zugał, D., Mielecki, D., Sarnowski, T. J., & Grzesiuk, E. (2020). Human and Arabidopsis alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog proteins—New players in important regulatory processes. *IUBMB Life*, 72(6), 1126–1144. <https://doi.org/10.1002/iub.2276>
- Martelli, G.P., Adams, M.J., Kreuze, J.F., & Dolja, V.V. (2007). Family *Flexiviridae*: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45(1), 73–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401>
- Martelli, G.P., Agranovsky, A.A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R.H.A., Dolja, V.V., Falk, B.W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A.V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H.J., Wisler, G.C., & Yoshikawa, N. (2002). The family *Closteroviridae* revised. *Archives of Virology*, 147(10), 2039–2044. <https://doi.org/10.1007/s007050200048>
- Martelli, G.P., Candresse, T., & Namba, S. (1994). Trichovirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*, 134(3–4), 451–455. <https://doi.org/10.1007/BF01310583>
- Martelli, G.P., Minafra, A., & Saldarelli, P. (1997). Vitivirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*. 142(9):1929-32. PMID: 9672652.
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., Arribas-Hernández, L., Tankmar, M.D., Rennie, S., von Bulow, S., Lindorff-Larsen, K., Brodersen, P. and Pallás, V. (2023). Plant YTHDF proteins are direct effectors of antiviral immunity against an N6-methyladenosine-containing RNA virus. *The EMBO Journal*, 42(18): e113378 DOI 10.15252/embj.2022113378.
- Martínez-Pérez, M., Aparicio, F., López-Gresa, M. P., Bellés, J. M., Sánchez-Navarro, J. A., & Pallás, V. (2017). Arabidopsis m6A demethylase activity modulates viral infection of a plant virus and the m 6 A abundance in its genomic RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(40), 10755–10760. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703139114>
- Martínez-Pérez, M., Gómez-Mena, C., Alvarado-Marchena, L., Nadi, R., Micol, J.L., Pallás, V. & Aparicio, F. (2021) The m6A RNA Demethylase ALKBH9B Plays a Critical Role for Vascular Movement of Alfalfa Mosaic Virus in Arabidopsis. *Frontiers in Microbiology*, 12:745576. doi: 10.3389/fmicb.2021.745576
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A.V., Patil, D.P., Linder, B., Pickering, B.F., Vasseur, J.-J., Chen, Q., Gross, S.S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., & Jaffrey, S.R. (2017). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541(7637), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Mauer, J., Sindelar, M., Despic, V., Guez, T., Hawley, B. R., Vasseur, J.-J., Rentmeister, A., Gross, S.S., Pellizzoni, L., Debart, F., Goodarzi, H., & Jaffrey, S.R. (2019). FTO controls reversible m6Am RNA methylation during snRNA biogenesis. *Nature Chemical Biology*, 15(4), 340–347. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0231-8>
- Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M. (Eds.). (2017). *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7>
- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E., & Jaffrey, S.R. (2012). Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons. *Cell*, 149(7), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
- Mielecki, D., Zugał, D. Ł., Muszewska, A., Piwowarski, J., Chojnacka, A., Mielecki, M., Nieminuszczy, J., Grynberg, M., & Grzesiuk, E. (2012). Novel AlkB Dioxygenases—Alternative Models for In Silico and In Vivo Studies. *PLoS ONE*, 7(1), e30588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030588>
- Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., & Martelli, G.P. (1994). Nucleotide sequence of the 3' Terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. *Archives of Virology*, 137(3–4), 249–261. <https://doi.org/10.1007/BF01309473>
- Moore, C., & Meng, B. (2019). Prediction of the molecular boundary and functionality of novel viral AlkB domains using homology modelling and principal component analysis. *Journal of General Virology*, 100(4):691-703. doi: 10.1099/jgv.0.001237.
- Moss, B., Gershowitz, A., Stringer, J.R., Holland, L.E., & Wagner, E.K. (1977). 5'-Terminal and internal methylated nucleosides in herpes simplex virus type 1 mRNA. *Journal of Virology*, 23(2), 234–239. <https://doi.org/10.1128/jvi.23.2.234-239.1977>
- Navarro, J.A., Sánchez-Navarro, J.A. & Pallás, V. (2019). Key checkpoints in the movement of plant viruses through the host. *Advances in Virus Research*, 104, 1–64. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2019.05.001>
- Nichols, J.L., & Welder, L. (1981). Nucleotides adjacent to N6-methyladenosine in maize poly(A)-containing RNA. *Plant Science Letters*, 21(1), 75–81. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(81\)90071-7](https://doi.org/10.1016/0304-4211(81)90071-7)
- Ok, S.H., Jeong, H.J., Bae, J.M., Shin, J.-S., Luan, S., & Kim, K.-N. (2005). Novel CIPK1-Associated Proteins in Arabidopsis Contain an Evolutionarily Conserved C-Terminal Region That Mediates Nuclear Localization. *Plant Physiology*, 139(1), 138–150. <https://doi.org/10.1104/pp.105.065649>
- Ontiveros, R.J., Stoute, J., & Liu, K.F. (2019). The chemical diversity of RNA modifications. *Biochemical Journal*, 476(8), 1227–1245. <https://doi.org/10.1042/BCJ20180445>

- Pallás, V., Aranda, M.A., Landa, B., López-Herrera, C. Moriones, E., Navas, J.A., Ortego, F., Zas, R. & Carbonell, A. (2021). Plant Health. Resistance to Pests and Diseases. En: Sustainable Primary Production. CSIC Scientific Challenges: Towards 2030. Ed. CSIC.
- Pallás, V.; & Garcia, J.A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92, 2691–2705.
- Pasin, F., Bedoya, L., Bernabé-Orts, J., Gallo, A., Simón-Mateo, C., Orzáez, D. & García, J. (2017). Multiple T-DNA Delivery to Plants Using Novel Mini Binary Vectors with Compatible Replication Origins. *ACS Synthetic Biology*, 6. 1962-1968. 10.1021/acssynbio.6b00354.
- Pendleton, K.E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O.V., Xie, Y., Tu, B. P., & Conrad, N.K. (2017). The U6 snRNA m⁶A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, 169(5), 824–835.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>
- Petrzik, K. (2019). Evolutionary forces at work in partitiviruses. *Virus Genes*, 55(5), 563–573. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01680-0>
- Ping, X.-L., Sun, B.-F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W.-J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y.-S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X.-M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W.-P., Zhu, X.-F., & Yang, Y.-G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N⁶-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, 24(2), 177–189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
- Plotch, S.J., & Krug, R.M. (1977). Influenza virion transcriptase: Synthesis in vitro of large, polyadenylic acid-containing complementary RNA. *Journal of Virology*, 21(1), 24–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.21.1.24-34.1977>
- Reichel, M., Köster, T., & Staiger, D. (2019). Marking RNA: m⁶A writers, readers, and functions in Arabidopsis. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(10), 899–910. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz085>
- Reichel, M., Liao, Y., Rettel, M., Ragan, C., Evers, M., Alleaume, A.-M., Horos, R., Hentze, M. W., Preiss, T., & Millar, A.A. (2016). In Planta Determination of the mRNA-Binding Proteome of Arabidopsis Etiolated Seedlings. *The Plant Cell*, 28(10), 2435–2452. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00562>
- Ries, R.J., Zaccara, S., Klein, P., Oларerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B.F., Patil, D.P., Kwak, H., Lee, J.H., & Jaffrey, S.R. (2019). m⁶A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 571(7765), 424–428. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1374-1>
- Rubio-Costa, P. (2021). Identificación y análisis filogenético de los dominios ALKB de las replicasas de virus de plantas. Trabajo de Fin de Grado. Escola Tècnica Superior D'enginyeria Agronòmica I Del Medi Natural Universitat Politècnica De Valencia
- Růžička, K., Zhang, M., Campilho, A., Bodi, Z., Kashif, M., Saleh, M., Eeckhout, D., El-Showk, S., Li, H., Zhong, S., De Jaeger, G., Mongan, N.P., Hejátko, J., Helariutta, Y., & Fray, R.G. (2017). Identification of factors required for m⁶A mRNA methylation in Arabidopsis reveals a role for the conserved E3 ubiquitin ligase HAKAI. *New Phytologist*, 215(1), 157–172. <https://doi.org/10.1111/nph.14586>
- Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S.J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>
- Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N.E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen, T.S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S.A., Lander, E.S., & Regev, A. (2014). Perturbation of m⁶A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5' Sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>
- Scutenaire, J., Deragon, J.-M., Jean, V., Benhamed, M., Raynaud, C., Favory, J.-J., Merret, R., & Bousquet-Antonelli, C. (2018). The YTH Domain Protein ECT2 Is an m⁶A Reader Required for Normal Trichome Branching in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 30(5), 986–1005. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00854>
- Shen, L., Liang, Z., Gu, X., Chen, Y., Teo, Z. W. N., Hou, X., Cai, W.M., Dedon, P. C., Liu, L., & Yu, H. (2016). N⁶-Methyladenosine RNA Modification Regulates Shoot Stem Cell Fate in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 38(2), 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.008>
- Shi, H., Wei, J., & He, C. (2019). Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Molecular Cell*, 74(4), 640–650. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.025>
- Sommer, S., Lavi, U., & Darnell, J.E. (1978). The Absolute Frequency of Labeled IV-6-methyladenosine in HeLa Cell Messenger RNA Decreases with Label Time. *Journal of Molecular Biology*, 124(3), 487-499. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90183-3).
- Song J, Yan S. (2024). The role of N⁶-methyladenosine modification in neurodegenerative diseases. *Ageing and Neurodegenerative Diseases*, 4:15. <http://dx.doi.org/10.20517/and.2024.14>
- Stoltzfus, C. M., & Dimock, K. (1976). Evidence for Methylation of B77 Avian Sarcoma Virus Genome RNA Subunits. *J. VIROL.*, 18.
- This, P., Lacombe, T., & Thomas, M. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008>
- Thomason, A.R., Brian, D.A., Velicer, L.F., & Rottman, F.M. (1976). Methylation of high-molecular-weight subunit RNA of feline leukemia virus. *Journal of Virology*, 20(1), 123–132. <https://doi.org/10.1128/jvi.20.1.123-132.1976>
- Van Den Born, E., Omelchenko, M.V., Bekkelund, A., Leihne, V., Koonin, E.V., Dolja, V.V., & Falnes, P.Ø. (2008). Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. *Nucleic Acids Research*, 36(17), 5451–5461. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn519>.
- van Tran, N., Ernst, F.G.M., Hawley, B.R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K.E., Bohnsack, M.T., Jaffrey, S.R., Graille, M., & Lafontaine, D.L.J. (2019). The human 18S rRNA m⁶A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research*, 47(15), 7719–7733. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz619>
- Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O., & Gilmer, D. (2010). Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block-Encoding Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(10), 1231–1247. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-10-0086>
- Wan, Y., Tang, K., Zhang, D., Xie, S., Zhu, X., Wang, Z., & Lang, Z. (2015). Transcriptome-wide high-throughput deep m⁶A-seq reveals unique differential m⁶A methylation patterns between three organs in Arabidopsis thaliana. *Genome Biology*, 16(1), 272. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0839-2>
- Warda, A.S., Kretschmer, J., Hackert, P., Lenz, C., Urlaub, H., Höbartner, C., Sloan, K.E., & Bohnsack, M.T. (2017). Human METTL16 is a N⁶-methyladenosine (m⁶A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs. *EMBO Reports*, 18(11), 2004–2014. <https://doi.org/10.15252/embr.201744940>

- Weaver, R.F. (2012). *Molecular biology* (5. ed).
- Williams, G.D., Gokhale, N.S., & Horner, S.M. (2019). Regulation of Viral Infection by the RNA Modification N6-Methyladenosine. *Annual Review of Virology*, 6(1), 235–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015559>
- Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M., & ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *Journal of General Virology*, 98(3), 352–354. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000740>
- Yaegashi, H., Takahashi, T., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S., & Yoshikawa, N. (2007). Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology*, 88(1):316-324. doi: 10.1099/vir.0.82377-0. PMID: 17170464.
- Yue, J., Lu, Y., Sun, Z., Guo, Y., San Leon, D., Pasin, F., & Zhao, M. (2023) Methyltransferaselike (METTL) homologues participate in *Nicotiana benthamiana* antiviral responses. *Plant Signaling & Behaviour*, 18(1):2214760. doi: 10.1080/15592324.2023.2214760.
- Yue, J., Wei, Y., Sun, Z., Chen, Y., Wei, X., Wang, H., Pasin, F., & Zhao, M. (2022). AlkB RNA demethylase homologues and N6 -methyladenosine are involved in Potyvirus infection. *Molecular Plant Pathology*, 23(10):1555-1564. doi: 10.1111/mpp.13239.
- Zaccara, S., Ries, R.J., & Jaffrey, S.R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(10), 608–624. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>
- Zhang, T., Shi, C., Hu, H., Zhang, Z., Wang, Z., Chen, Z., Feng, H., Liu, P., Guo, J., Lu, Q., Zhong, K., Chen, Z., Liu, J., Yu, J., Chen, J., Chen, F., & Yang, J. (2022). N6-methyladenosine RNA modification promotes viral genomic RNA stability and infection. *Nature Communications*, 13(1), 6576. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34362-x>
- Zhang, T., Wang, Z., Hu, H., Chen, Z., Liu, P., Gao, S., Zhang, F., He, L., Jin, P., Xu, M., Chen, J., & Yang, J. (2021). Transcriptome-Wide N6-Methyladenosine (m6A) Profiling of Susceptible and Resistant Wheat Varieties Reveals the Involvement of Variety-Specific m6A Modification Involved in Virus-Host Interaction Pathways. *Frontiers in Microbiology*, 12, 656302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656302>
- Zheng, G., Dahl, J.A., Niu, Y., Fedorcak, P., Huang, C.-M., Li, C. J., Vågbø, C.B., Shi, Y., Wang, W.-L., Song, S.-H., Lu, Z., Bosmans, R.P.G., Dai, Q., Hao, Y.-J., Yang, X., Zhao, W.-M., Tong, W.-M., Wang, X.-J., Bogdan, F., ... He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>
- Zhong, S., Li, H., Bodi, Z., Button, J., Vespa, L., Herzog, M., & Fray, R.G. (2008). MTA Is an *Arabidopsis* Messenger RNA Adenosine Methylase and Interacts with a Homolog of a Sex-Specific Splicing Factor. *The Plant Cell*, 20(5), 1278–1288. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058883>
- Zhou, Z. Sh., Dell’Orco, M., Saldarelli, P., Turturo, C., Minafra, A., & Martelli, G.P. (2006). Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. *Journal of General Virology*, 87(8), 2387–2395. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81893-0>

