



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PROTEÍNAS VIRALES COMO INDUCTORES DE LA
RESPUESTA INMUNE EN PLANTAS Y SU IMPACTO EN LA
COMUNIDAD MICROBIANA QUE HABITA EL RIZOBIOMA.**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Isaac Salvador Sánchez Sotelo

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 15 del Mes de Marzo del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Proteínas virales como inductores de la respuesta inmune en plantas y su impacto en la comunidad microbiana que habita el rizobioma"

Presentada por el alumno:

Isaac Salvador Sánchez Sotelo

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Abraham Loera Muro
Co-Director de Tesis



VALLI ADRIAN
ALEJANDRO - DNI
X4853460T
2022.12.09 12:00:02
+01'00'

Dr. Adrián Alejandro Valli
Co-Tutor de Tesis



Dra. María Goretty Caamal Chan
Revisora de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 5 de diciembre de 2022.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Isaac Salvador Sánchez Sotelo del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
Ithenticate.
- Filtros utilizados:
Excluir citas.
Excluir bibliografía.
- Porcentajes de similitud:
3%
Se muestra captura de pantalla

INFORME DE ORIGINALIDAD		
3% INDICE DE SIMILITUD		
FUENTES PRIMARIAS		
1	docplayer.es <small>Internet</small>	81 palabras — < 1%
2	cibnor.repositorioinstitucional.mx <small>Internet</small>	79 palabras — < 1%
3	vocero.uach.mx <small>Internet</small>	74 palabras — < 1%
4	www.elsevier.es <small>Internet</small>	63 palabras — < 1%
5	cca.uas.edu.mx <small>Internet</small>	55 palabras — < 1%
6	hdl.handle.net <small>Internet</small>	50 palabras — < 1%
7	repository.agrosavia.co <small>Internet</small>	45 palabras — < 1%
8	revistas.unal.edu.co <small>Internet</small>	40 palabras — < 1%
9	repositorio.unal.edu.co <small>Internet</small>	29 palabras — < 1%

Firmas del comité



Dr. Abraham Loera Muro
Co-Director de Tesis



VALLI ADRIAN
ALEJANDRO - DNI
X4853460T
2022.12.09 12:00:02
+01'00'

Dr. Adrián Alejandro Valli
Co-Tutor de Tesis



Dra. María Goretty Caamal Chan
Revisora de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Directora de Tesis
(Período 7 de diciembre del 2020-31 de agosto del 2022)

Dr. Abraham Loera Muro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Adrián Alejandro Valli
Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, España
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Abraham Loera Muro
Dr. Adrián Alejandro Valli
Dra. María Goretty Caamal Chan

Jurado del Examen

Dr. Abraham Loera Muro
Dr. Adrián Alejandro Valli
Dra. María Goretty Caamal Chan

Suplente

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Resumen

La agricultura desempeña un papel económico fundamental para los países, sin embargo, existen múltiples causas de pérdidas en los cultivos a nivel mundial que reducen significativamente las cosechas. En las últimas décadas, las enfermedades causadas por virus han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción agrícola en México. Los begomovirus (familia *Geminiviridae*) son virus que afectan a gran parte de los cultivos de hortalizas. Una de las especies más relevantes es el *Pepper Golden Mosaic Virus* (PepGMV), que afecta principalmente a las plantas de chile. Adicionalmente, se ha reportado que la interacción con organismos patógenos puede afectar a la comunidad microbiana que habita la rizósfera de las plantas, sin embargo, la información sobre los cambios en el microbioma frente a enfermedades virales es escasa. En este estudio se analizó la expresión de los genes relacionados a la defensa de la planta modelo *Nicotiana benthamiana* frente a la infección con PepGMV y la inoculación de la proteína viral Rep, así como los cambios en la comunidad microbiana de la planta asociados a la presencia del virus. Para ello se realizó la agroinfiltración, de forma independiente, del virus PepGMV o de Rep en plantas de *N. benthamiana* y se recolectaron muestras de hoja, raíz y rizósfera a los días 1, 7 y 21 después de la inoculación. A partir de las muestras obtenidas se analizaron los cambios de expresión en genes involucrados en los mecanismos de defensa de la planta. Así mismo, se cuantificó la abundancia de comunidades microbianas de bacteria, archaia y fungi, y se realizó el análisis de perfiles taxonómicos por NGS. Los resultados obtenidos demostraron que durante la infección viral aumenta la expresión de los genes DCL2 y DCL3. Por otro lado, Rep aumenta la expresión de los genes DCL1, DCL2 y DCL3, AGO1, y un gen relacionado a la señalización de SA. Durante la infección por PepGMV, las comunidades de bacterias presentes en la rizósfera aumentan durante los primeros 7 días después de la inoculación, mientras que en el compartimento endofítico disminuye la abundancia, destacándose en ambos resultados el aumento de la presencia del filo *Firmicutes* en el perfil taxonómico de las muestras bacterianas. Los resultados sugieren que en presencia del PepGMV los genes AGO1 y DCL1 relacionados al silenciamiento génico en la planta se ven inhibidos por el PepGMV, mientras que un componente viral, como la Rep, induce la expresión de los genes modulados durante la infección viral. Por otra parte, se comprueba que las plantas de *N. benthamiana* son capaces de modificar la composición de su rizobioma en presencia de una enfermedad viral.

Palabras clave: PepGMV, begomovirus, microbioma, rizósfera.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0220-6710>

Dr. Abraham Loera Muro
Co-Director de Tesis

Dra. María Goretty Caamal Chan
Revisora de Tesis

Summary

Agriculture plays a fundamental economic role for countries; however, there are multiple causes of crop losses worldwide that significantly reduce harvests. In recent decades, diseases caused by viruses have caused heavy economic losses in agricultural production in Mexico. Begomoviruses (Geminiviridae family) are viruses that affect a large part of vegetable crops. One of the most relevant species is the Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV), which mainly affects chili plants. Additionally, it has been reported that the interaction with pathogenic organisms can affect the microbial community that inhabits the rhizosphere of plants, however, information on changes in the microbiome against viral diseases is scarce. In this study, the expression of genes related to the defense of the *Nicotiana benthamiana* model plant against infection with PepGMV and the inoculation of the viral protein Rep was analyzed, as well as the changes in the microbial community of the plant associated with the presence of the virus. To this end, agroinfiltration of the PepGMV or Rep virus was carried out independently in *N. benthamiana* plants and leaf, root and rhizosphere samples were collected on days 1, 7 and 21 after inoculation. From the samples obtained, the expression changes in genes involved in the defense mechanisms of the plant were analyzed. Likewise, the abundance of microbial communities of bacteria, archaea and fungi was quantified, and the analysis of taxonomic profiles by NGS was carried out. The results obtained demonstrated that during the viral infection the expression of the DCL2 and DCL3 genes increases. On the other hand, Rep increases the expression of the DCL1, DCL2 and DCL3 genes, AGO1, and a gene related to SA signaling. During PepGMV infection, the communities of bacteria present in the rhizosphere increase during the first 7 days after inoculation, while abundance decreases in the endophytic compartment, highlighting in both results the increased presence of the Firmicutes phylum in the profile. taxonomy of bacterial samples. The results suggest that in the presence of PepGMV, the AGO1 and DCL1 genes related to gene silencing in the plant are inhibited by PepGMV, while a viral component, such as Rep, induces the expression of modulated genes during viral infection. On the other hand, it is verified that *N. benthamiana* plants are capable of modifying the composition of their rhizobiome in the presence of a viral disease

Keywords: PepGMV, begomovirus, plant microbiome, rizosphere.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0220-6710>



Dr. Abraham Loera Muro
Co-Director de Tesis



Dra. María Goretty Caamal Chan
Revisora de Tesis

Dedicatoria

A mi familia, porque son el principal apoyo en mi vida.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad como estudiante, por todo el apoyo y el seguimiento que brindaron durante mi estancia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de manutención 1083055 otorgada a lo largo de mi periodo como estudiante.

A los integrantes de mi Comité Tutorial. El Dr. Abraham Loera Muro por compartir conmigo su conocimiento y guiarme en toda esta etapa. Por su paciencia y empeño en mi desarrollo como estudiante.

A la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes por su confianza, su paciencia y todo el apoyo que mostró en mi desde antes de iniciar la maestría.

Al Dr. Adrián Alejandro Valli por su valiosa orientación y sus aportes para enriquecer mi trabajo. Muchas gracias a todos.

A la Dra. María Goretty Caamal Chan por su apoyo incondicional, por mostrar interés verdadero en mi progreso académico y por guiarme desde la primera etapa de mi formación como estudiante hasta este momento.

Al M. C. Ángel Edgardo Carrillo por todo el tiempo y conocimiento que compartió conmigo a lo largo de estos años. Por sus consejos y su buen humor en el laboratorio. Pero sobre todo por la disciplina y el rigor hacia la ciencia que demostró, y que fueron la base de mi formación técnica como científico.

A los técnicos Margarito Rodríguez y Gabriela Mendoza por su apoyo, disposición y por brindarme la confianza de trabajar en sus laboratorios.

A mi familia y amigos por estar siempre presentes y nunca dejar de creer en mí.

Muchas gracias a todos.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
Abreviaturas	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de la agricultura en México	1
1.2 Enfermedades vegetales	1
1.3 Los virus como agentes patógenos que limitan la producción agrícola	2
1.4 Familia Geminiviridae (Geminivirus)	2
1.5 Características de los Begomovirus	3
1.6 Primeros reportes de Begomovirus en México	4
1.6.1 Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV)	5
1.7 Importancia de la proteína de replicación (Rep) en la infección viral de Begomovirus	6
1.8 Mecanismos de defensa de las plantas	8
1.9 Microbioma de las plantas	9
1.9.1 La rizósfera	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Proteínas elicitoras de la respuesta contra patógenos en plantas	12
2.2 Resistencia a partir de secuencias derivadas de patógenos	13
2.3 Efecto de los patógenos en las comunidades microbianas de las plantas	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos particulares	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Obtención de cepas bacterianas	18
6.2 Extracción y análisis de material genético de cepas bacterianas	18
6.3 Siembra, germinación y crecimiento de plantas de <i>N. benthamiana</i>	20
6.4 Preparación de células competentes y transformación genética	20
6.5 Inoculación de plantas por agroinfiltración e infiltración	21
6.6 Recolección de muestras de tejido foliar y radicular	22
6.6.1 Recolección de tejido vegetal foliar	22
6.6.2 Recolección de tejido vegetal radicular y rizósfera	22
6.7 Preparación de las muestras para extracción de ADN	23
6.8 Extracción de ADN	23
6.9 Extracción de ARN de tejido foliar	24
6.10 Síntesis de primera cadena (ADNc)	25
6.11 Cuantificación de la expresión génica (PCR tiempo real)	25

6.12 Cuantificación absoluta de genes 16S e ITS (bacteria, archea y fungi)	27
6.13 Cuantificación absoluta de carga viral.....	28
6.14 Secuenciación de nueva generación.	28
7. RESULTADOS	30
7.1 Extracción de ADN de cepas bacterianas y comprobación de la presencia de los plásmidos	30
7.2 Inoculación de PepGMV y desarrollo de síntomas en <i>N. benthamiana</i>	31
7.3 Extracción de material genético	33
7.3.1 Extracción de ARN de hojas	33
7.3.2 Extracción de ADN de raíz y suelo	35
7.4 Análisis de la expresión de genes mediante qPCR	39
7.5 Cuantificación absoluta de comunidades microbianas.....	44
7.6 Secuenciación de nueva generación	49
7.6.1 Composición de comunidades microbianas asociadas a <i>N. benthamiana</i> durante la infección con Pepper Golden Mosaic Virus	49
8. DISCUSIÓN	58
9. CONCLUSIONES	64
10. LITERATURA CITADA	65
11. ANEXOS	68
ANEXO A: Tabla de OTUs para muestras endofíticas 7dpi.....	68
ANEXO B: Tabla de OTUs para muestras endofíticas 7dpi.....	69
ANEXO C: Tabla de OTUs para muestras rizósfera 7dpi.....	70
ANEXO D: Tabla de OTUs para muestras rizósfera 21dpi.....	71

Lista de figuras

Figura 1. A) Electroforesis de PCR en tiempo real de muestras de ADN plasmídico bacteriano utilizando oligos específicos para detectar la presencia de PepGMV dentro del vector. B) Tabla de las muestras ubicadas en cada carril del gel.....	31
Figura 2. Comparación de sintomatología causada por la agroinfiltración del virus PepGMV y la secuencia Rep en <i>N. benthamiana</i> . a, e, i: Plantas control a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. b, f, j: Plantas mock (inoculación con <i>A. tumefaciens</i> sin vector viral) a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. c, g, k: Plantas infectadas con PepGMV a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. d, h, i: Plantas inoculadas con Rep a 1 dpi, 7dpi y 21dpi respectivamente.....	32
Figura 3. Gráficas de comparación de carga viral de hojas infectadas para los tres tiempos de muestreo en muestras agroinfiltradas con PepGMV y con Rep (barra izquierda: PepGMV, barra derecha: Rep).	33
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN. A) Control, B) mock. C) PepGMV, D) Rep (numeración correspondiente a tabla 3). Se pueden observar las bandas de los ARN ribosomales 18S y 25S de cada una de las muestras.	35
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de tejido endofítico (raíz) de muestras control, mock y PepGMV (Tabla 4). Se observa la banda representativa del ADN genómico en la parte superior de cada carril.	37
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de rizósfera para muestras control, mock y PepGMV (Tabla 5). Se observa la banda representativa del ADN genómico en la parte superior de cada carril.....	38
Figura 7. Expresión relativa del gen Isochorismate Synthase relacionados al ácido salicílico. Se observó diferencia significativa a los 7 dpi en PepGMV y en los 3 tiempos con la secuencia de Rep.....	40
Figura 8. Expresión relativa del gen Ethylene Insensitive 2, relacionados al etileno. Se observó diferencia significativa a 1 dpi para PepGMV y a los 7dpi con Rep.	41
Figura 9. Expresión relativa de genes relacionados al jasmonato. A) COI: Se observaron diferencias significativas a 1 dpi y a los 7 dpi en las plantas inoculadas con PepGMV y a los 21dpi en las plantas inoculadas con Rep. B) Gen OPR3: no se observaron diferencias significativas....	42
Figura 10. Expresión relativa de genes relacionados al silenciamiento génico. A) AGO1 se observa diferencia significativa en los 3 tiempos para las plantas inoculadas con Rep. B) DCL1: Se observa un incremento significativo en su expresión a 1 dpi en las muestras con PepGMV. En las muestras de Rep se observa un incremento significativo a los 1 y 7 dpi mientras que a los 21 dpi hay una disminución de la expresión. C) DCL2: Se observó diferencia significativa a los 7 dpi en PepGMV y en Rep. D) DCL3: Se observó diferencia significativa a 1 dpi en PepGMV y en Rep a los 1 y 7dpi. E) DCL4: No se observaron diferencias significativas.	43
Figura 11. Curvas de cuantificación de número de copias contra Ct para bacteria, archaia y fungi.	45
Figura 12. Gráficas de comparación de abundancia para bacterias endofíticas en muestras de raíz a partir del gen 16S de ARN.....	45
Figura 13. Gráficas de comparación de abundancia para archeas endofíticas en muestras de raíz a partir del gen 16S de ARN.	46
Figura 14. Gráficas de comparación de abundancia para organismos fungi endofíticos en muestras de raíz a partir de la región ITS.....	46

Figura 15. Gráficas de comparación de abundancia para bacterias en muestras de rizósfera a partir del gen 16S de ARN.	47
Figura 16. Gráficas de comparación de abundancia para archeas en muestras de rizósfera a partir del gen 16S de ARN.	48
Figura 17. Gráficas de comparación de abundancia para organismos fungi en muestras de raíz a partir de la región ITS.	48
Figura 18. Perfil bacteriano de muestras endofíticas de raíz de <i>N. benthamiana</i> a los 7 días después de la inoculación. Se muestran los filos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C7R: Control 7dpi; M7R: Mock 7dpi; V7R: Virus 7dpi; R7R: Rep 7dpi.	50
Figura 19. Curva de refacción de abundancia de especies y numero de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C7R: Control 7dpi; M7R: Mock 7dpi; V7R: Virus 7dpi, R7R: Rep 7dpi....	51
Figura 20. Perfil bacteriano de muestras endofíticas de raíz de <i>N. benthamiana</i> a los 21 días después de la inoculación. Se muestran los filos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C21R: Control 21dpi; M21R: Mock 21dpi; V21R: Virus 21dpi; R21R; Rep 21dpi.....	52
Figura 21. Curva de refacción de abundancia de especies y numero de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C21R: Control 21dpi; M21R: Mock 21dpi; V21R: Virus 21dpi; R21R: Rep 21dpi.....	53
Figura 22. Perfil bacteriano de muestras de rizósfera de <i>N. benthamiana</i> a los 7 días después de la inoculación. Se muestran los filos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C7S: Control 7dpi; M7S: Mock 7dpi; V7S: Virus 7dpi; R7S: Rep 7dpi. T0: Muestra de sustrato.....	54
Figura 23. Curva de refacción de abundancia de especies y numero de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C7S: Control 7dpi; M7S: Mock 7dpi; V7S: Virus 7dpi, R7S: Rep 7dpi; T0: Sustrato al tiempo 0.	55
Figura 24. Perfil bacteriano de muestras de rizósfera de <i>N. benthamiana</i> a los 21 días después de la inoculación. Se muestran los filos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C21S: Control 21dpi; M21S: Mock 21dpi; V21S: Virus 21dpi; R21S: Rep 21dpi; T0: Muestra de sustrato.....	56
Figura 25. Curva de refacción de abundancia de especies y numero de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C21S: Control 21dpi; M21S: Mock 21dpi; V21S: Virus 21dpi; R21S: Rep 21dpi; T0: Sustrato al tiempo 0.	57

Lista de tablas

Tabla 1. Primers utilizados para el análisis de la expresión de genes involucrados en distintos mecanismos de defensa.....	26
Tabla 2. Genes utilizados para cuantificación absoluta del microbioma.	28
Tabla 3. Concentración y calidad de muestras de ARN de hojas.....	34
Tabla 4. Concentración y calidad de muestras de ADN de tejido endofítico.	36
Tabla 5. Concentración y calidad de muestras de ADN de rizósfera.	37

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	Ácido ribonucleico.
AT-PGMV	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> con vector viral de <i>Pepper Golden Mosaic Virus</i> .
DPI	Días post inoculación.
EC-PGMV	<i>Escherichia coli</i> con vector viral de <i>Pepper Golden Mosaic Virus</i> .
ISR	Resistencia sistémica inducida (Induced Systemic Resistance).
OTU	Unidad Taxonómica Operativa (Operational Taxonomic Unit).
PepGMV	<i>Pepper Golden Mosaic Virus</i> .
PGRP	Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (Plant growth-promoting Rhizobacteria).
Rep	Proteína de replicación de <i>Pepper Golden Mosaic Virus</i> .
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida (Systemic Acquired Resistance).

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de la agricultura en México

La agricultura desempeña un papel fundamental para el desarrollo de los países, promoviendo recursos tanto a los sectores no agrícolas, así como generando un importante mercado para los productos industriales, haciendo que los países se beneficien de su crecimiento (Pérez, 2008). México es uno de los principales países productores y exportadores de alimentos en el mundo, y en los recientes años ha contado con el potencial productivo, las condiciones agroclimáticas, la infraestructura y disponibilidad para adaptarse a la demanda de los mercados nacional e internacional y posicionar al sector agroalimentario como uno de los principales motores de la economía nacional. Lo anterior confirma que los productos agronómicos mexicanos se han posicionado fuertemente en los mercados internacionales (SAGARPA, 2017).

1.2 Enfermedades vegetales

Existen múltiples causas de pérdidas en los cultivos a nivel mundial, que reducen significativamente las cosechas y tienen un gran impacto económico sobre la producción agrícola. Por una parte, se encuentran los factores abióticos como las temperaturas extremas, la sequía y la pérdida de nutrientes en los suelos. Sin embargo, las principales causas de deterioro de los cultivos se encuentran relacionadas con las enfermedades ocasionadas por factores bióticos (Jiménez, 2017).

Las enfermedades en plantas, al igual que en los animales y seres humanos, perjudican el funcionamiento fisiológico como resultado de complejas interacciones con un agente causal primario, independientemente de su origen. Estas interacciones son moduladas por el medio ambiente en el que se encuentran, y comprenden tanto microorganismos no patogénicos habitantes del suelo y las superficies vegetales, como animales que contribuyen a la dispersión de vectores, así como de elementos abióticos del suelo y el aire (oxígeno, agua, nutrientes, temperatura, pH, salinidad, humedad e iluminación) (Jiménez, 2017).

La diversidad de los agentes causales y las enfermedades en las plantas se han convertido en objeto de estudio de una gran cantidad de investigaciones, ya que, aunque no constituyen una

amenaza seria para las comunidades vegetales silvestres, los ataques de ellas en cultivos agrícolas pueden reducir significativamente las cosechas y tener un gran impacto económico sobre la población agrícola. Se ha reportado que las enfermedades en cultivos pueden ocasionar una pérdida global media anual del 12.3 al 13.3% de la cosecha alcanzable en el mundo, que unida a otras causas de disminución de cultivo incrementa a una pérdida global media anual del 33% al 42% de la cosecha agrícola alcanzable (Jiménez, 2017).

1.3 Los virus como agentes patógenos que limitan la producción agrícola

Las enfermedades en los cultivos hortícolas constituyen uno de los factores de mayor riesgo de pérdidas en la producción. En las últimas décadas, las enfermedades causadas por virus han ocasionado fuertes pérdidas económicas en la producción agrícola en México. La incidencia de estas enfermedades varía cada año y depende principalmente de las condiciones climáticas, el manejo de los cultivos y el tipo de control que se aplique ya sea químico, biológico o cultural de los insectos vectores y las plantas hospederas (Robles *et al.*, 2010).

En plantas, los virus son considerados como el grupo de agentes patogénicos más importantes y peligrosos, principalmente por la gravedad de la sintomatología, así como, por la dificultad para combatirlos, ya que no existe un tratamiento para eliminarlos (Robles *et al.*, 2010). En las regiones tropicales y subtropicales, tiene principal relevancia la familia *Geminiviridae*, causando daños económicos y pérdidas de hasta 20% en la producción (Hernández *et al.*, 2018).

1.4 Familia *Geminiviridae* (Geminivirus)

Los geminivirus se caracterizan por tener una morfología geminada de dos icosaedros incompletos unidos con 110 moléculas de proteínas capsídicas organizadas como 22 capsómeros pentámetricos. Se caracterizan también por contener genomas circulares de ADN de cadena simple, que oscila entre los 2.5 y 3 kilobases. Su material genético puede ser tanto monopartita como bipartita, pudiendo contener dos componentes genómicos conocidos como DNA-A y DNA-B, los cuales son requeridos para establecer la infección (Brown *et al.*, 2015). Ambos componentes se encuentran organizados en unidades de transcripción divergentes separadas por la región intergénica, que contiene el origen de replicación y los promotores que dirigen la transcripción en direcciones opuestas. La parte DNA-A contiene la información

necesaria para la replicación y la formación de la cápside del virus, por otro lado, el DNA-B codifica proteínas involucradas en la movilidad del virus, tanto del núcleo al citoplasma, así como de célula a célula (Hernández, 2018).

La familia *Geminiviridae* se compone de 14 géneros que presentan distintos rangos de hospederos tanto de plantas monocotiledonias como dicotiledonias, distintos insectos vectores y diferente organización de su genoma. Entre los 14 generos se encuentran los Becurtovirus (3 especies), los Begomovirus (que son el género más grande con 445 especies), los Capulavirus (4 especies), Citlodavirus (4 especies), Curtovirus (3 especies), Eragrovirus (1 especie), Grablovirus (3 especies), Maldovirus (3 especies), Mastrevirus (45 especies), Mulcrilevirus (2 especies), Opunvirus (1 especie), Topilevirus (2 especies), Topocovirus (1 especie) y Turncurtovirus (que contiene 3 especies) (ICTV, 2022).

De acuerdo con su filogenia y a la organización de su genoma, los geminivirus se clasifican en dos grandes grupos; los del viejo mundo que se ubican en Europa, Asia y África, y los virus del nuevo mundo que se encuentran en América. Esta clasificación coincide con el tipo de genoma de los geminivirus, ya que los del viejo mundo pueden ser tanto monopartitas como bipartitas, mientras los del nuevo mundo solo presentan genoma bipartito (Huanca y Trejo, 2013).

1.5 Características de los Begomovirus

Los begomovirus son el género de mayor tamaño en la familia *Geminiviridae*, el cual posee más de 409 especies diferentes que pueden subclasificarse a su vez en virus monopartita, si su genoma posee una sola molécula de ADN, o bipartita, si el genoma posee dos moléculas separadas, conteniendo alrededor de 3kb de tamaño independientemente del tipo de genoma que poseen (Luna y Lozano, 2020).

El inicio de la infección de los begomovirus se da cuando la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) que transporta el begomovirus se alimenta a través del floema de una hoja saludable y transmite los viriones a las células asociadas al tejido vascular de la planta. Dentro de las células, el ADN viral de cadena simple es liberado de los viriones y convertido en ADN de doble cadena por las polimerasas de la planta que utilizan oligonucleótidos de ARN para complementar la cadena principal. El ADN de doble cadena sintetizado es transcrito por la ARN polimerasa II,

permitiendo así la producción de la proteína Rep, que inicia la replicación viral por dos mecanismos conocidos como replicación de círculo rodante (RCR) y replicación dependiente de recombinación (RDR). El ADN de cadena simple proveniente de esta replicación puede convertirse en ADN de doble cadena para volver a entrar en el ciclo de replicación o puede ser empaquetado después de la producción de la proteína de la cápside (CP). La infección es propagada dentro de la planta por el movimiento del ADN viral mediante la proteína de desplazamiento nuclear (NSP) que transporta el ADN viral del núcleo al citoplasma, y de una célula infectada a una célula adyacente mediante la proteína de movimiento (MP) (Handley *et al.*, 2013).

Los síntomas de los begomovirus provocan entre otras cosas, el fallo en los órganos reproductivos de la planta y en el desarrollo de la planta. Entre ellos se encuentran la curvatura y deformación de las hojas, la aparición de patrones moteados o mosaicos amarillos, y algunas veces hinchazón en las venas y enanismo (Handley *et al.*, 2013).

Los begomovirus tienen la capacidad de utilizar la maquinaria molecular de las células de las plantas para producir entre 4 y 8 proteínas multifuncionales, que están codificadas en su material genético a partir de marcos abiertos de lectura de manera bidireccional y parcialmente sobrelapados entre ellos. Los begomovirus bipartita codifican seis proteínas distribuidas en ambas partículas de ADN. El ADN-A codifica la proteína iniciadora de la replicación (Rep), la proteína de activación de la transcripción (TrAP), la proteína potenciadora de la replicación (Ren), y la proteína de la cápside (CP), mientras que el ADN-B codifica dos proteínas adicionales, la proteína de desplazamiento nuclear (NSP) y la proteína de movimiento (MP) (Luna y Lozano, 2020).

1.6 Primeros reportes de Begomovirus en México

En 1993 se reportó por primera vez en México un virus de la familia *Geminiviridae* transmitido por la mosquita blanca que afectaba fuertemente los cultivos de chile, específicamente en la zona de la Huasteca, en el estado de Tamaulipas, al que se le denominó Virus Huasteco Del Chile (PHV). Este virus, que no era transmisible mecánicamente, se detectó después en múltiples áreas hortícolas alrededor del país, usualmente asociado a otros geminivirus no

caracterizados en ese momento. Estas enfermedades virales complejas fueron un importante problema fitopatológico en la horticultura mexicana, ya que provocaban entre el 60 al 70% de pérdidas una vez se introducían dentro de cultivares de chile (Torres-Pacheco, 1993).

Durante los últimos años se han reportado diversos begomovirus en México, como el *Tomato mottle virus* (ToMoV) aislado a partir de muestras de chile en el sureste de México (Diaz *et al.*, 2002), el *Pepper Golden mosaic virus* (PepGMV) y el *Tomato Chino La Paz Virus* (ToCHLPV), agentes causales del mosaico dorado del chile y el enchinamiento foliar del tomate respectivamente (Holguin *et al.*, 2004).

1.6.1 Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV)

El virus del mosaico dorado del chile o PepGMV (*Pepper Golden Mosaic Virus*) se reportó en un inicio en 1987. Fue denominado *Texas Pepper Geminivirus*, o TPGV por sus siglas, ya que se encontró infectando los campos de cultivo de chile en el estado de Texas, EUA. Posteriormente fue reportado por Brown y colaboradores en 1990 como un nuevo geminivirus identificado, que era transmitido por la mosquita blanca (*B. tabacci*) en cultivos de chile. En México, se reportó por primera vez en 2005 con el nombre de *Pepper Golden Mosaic Virus*, como uno de los virus más importantes que afectaban a los cultivos de pimiento morrón (*C. annuum*), con un amplio rango de hospederos (Castro *et al.*, 2013).

El PepGMV se encuentra distribuido ampliamente en todo México, afectando a variedades de *C. annuum* como el chile Serrano, Jalapeño, Ancho (Poblano), Anaheim, Morrón, y Cayenne, además de afectar también a otras solanáceas entre las que se encuentran los cultivos de tomate y de tabaco (Castro *et al.*, 2013).

Se han reportado cultivos agrícolas en donde es común encontrar infecciones mixtas producidas por los virus PepGMV y Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV). Este tipo de infecciones se han presentado en la mayor parte del país y han demostrado producir síntomas más severos, además de ser una fuente potencial de variabilidad de Begomovirus, facilitando así eventos de recombinación (García *et al.*, 2007).

El chile (género *Capsicum spp.*) es una hortaliza cultivada alrededor de todo el mundo caracterizada por sus frutos pungentes y por ser el condimento con mayor valor económico del

mundo (Hernández *et al.*, 2012). El chile representa una de las especies más importantes como condimento de alimentos. Se estima que, en la población mundial, una de cada cuatro personas lo consumen diariamente, lo que se debe en gran medida a la variedad de formas, usos y aromas que presenta (Robles *et al.*, 2010).

El género *Capsicum* está conformado por alrededor de 30 especies que se distribuyen desde el sur de Estados Unidos, hasta el norte de Argentina (Castro *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2012). De estas especies, cinco son las mayormente cultivadas en el mundo, siendo *Capsicum annuum* la de mayor importancia y consumo (Castro *et al.*, 2011). La mayoría de las variedades de chile cultivadas pertenecen a esta especie (Palevitch, 1996).

Capsicum annuum es la especie más conocida, extendida y cultivada del género *Capsicum*, y es, además, la hortaliza más importante en cuanto a superficie de siembra en México (Castro *et al.*, 2011). Es exportada hacia los Estados Unidos, Japón, Canadá, Reino Unido y Alemania, entre otros países, y según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), México es el segundo país productor de chile y pimientos verdes en el mundo, habiendo producido más de 3 millones de toneladas producidas en 2019 con un valor estimado de 1.7 mil millones de dólares (www.fao.org).

El estado de Baja California Sur cuenta con una superficie de cultivo de 91,953 hectáreas, donde los cultivos más importantes son: chile, tomate, maíz para forraje y la avena para forraje. En 2020 el Servicio de Información Agropecuaria y Pesquero (SIAP) reportó que se cosecharon 79,651 toneladas de chile verde, posicionando al Estado en el noveno lugar a nivel nacional en valor de la producción agrícola, y en tercer lugar en cuanto a rendimiento de producción por hectárea de siembra (www.gob.mx/siap).

1.7 Importancia de la proteína de replicación (Rep) en la infección viral de Begomovirus

La proteína de replicación (REP) está codificada por el gen C1 y es la única proteína que es indispensable para la replicación del virus. Esta es una proteína multifuncional que se desempeña en un gran número de procesos biológicos, entre los cuales están la iniciación y la terminación de la replicación por círculo rodante (RDR) en donde esta puede unir y religar el

origen de replicación del ADN viral, la supresión de la propia transcripción del virus y también la interacción con las células hospederas para controlar el ciclo celular (Lucioli *et al.*, 2003).

La replicación de los virus de la familia *Geminiviridae* ocurre dentro del núcleo de las células de plantas infectadas, en donde la proteína REP juega un papel importante interactuando e inhibiendo proteínas hospederas para activar la expresión de las ADN polimerasas y otros factores involucrados en la maquinaria de replicación de las plantas infectadas. La Rep es una proteína altamente conservada que no comparte similitudes con las polimerasas, pero en su lugar tiene tres motivos necesarios para la iniciación y terminación en la síntesis del ADN. También se ha demostrado que representa un papel importante como regulador de la transcripción viral, como estimulador de la transcripción a través de la maquinaria de modificaciones post traduccionales y como supresor del mecanismo de silenciamiento de genes virales (Lazarowitz y Shepherd, 1992).

La infección de los begomovirus modifica los niveles de expresión de un gran número de genes de plantas que regulan los procesos biológicos tales como el ciclo celular, el metabolismo de los nucleótidos, la reparación del ADN y la recombinación. También es capaz de inducir o activar la maquinaria de síntesis de ADN de las células de plantas con el fin de promover la regulación de genes requeridos durante las fases S/G2 mientras disminuye la activación de los genes asociados con las fases M/G1 (Ibañez *et al.*, 2008).

La proteína iniciadora de la replicación REP es una proteína altamente conservada en los geminivirus, y comparte muchas similitudes con las proteínas iniciadoras de replicación en plásmidos de eubacterias. Contiene tres motivos conservados llamados motivo I, II y III, los cuales son necesarios para la iniciación y la terminación de la síntesis de DNA durante la replicación por circulo rodante (RCR) a falta de la presencia de ADN polimerasa en el genoma de los geminivirus. Es requerida para la iniciación, elongación y terminación del proceso de replicación viral, y está involucrada en la estimulación de la transcripción. Además, se ha demostrado que juega un rol en la infección viral actuando como supresor del silenciamiento génico en las plantas y regula la expresión de genes virales específicos (Ruhel y Chakraborty, 2019).

Rep es también una proteína con la presencia de varios motivos, lo que le permite interactuar con factores del hospedero. Es capaz de unirse al ADN en un sitio específico en los iterones presentes en la región intergénica (IR) y después inicia la replicación viral creando una muesca en una secuencia de nonanucleótidos conservada. Posee propiedades de actividad ligasa, topoisomerasa dependiente de ATP, ATPasa y helicasa (Choudhury *et al.*, 2006). También interactúa con algunas proteínas virales como la proteína CP promoviendo la encapsulación del material genético, la proteína REn a través de la cual es capaz de potencial la replicación y con múltiples factores hospederos involucrados en diferentes procesos de defensa en la planta, lo que permite la replicación viral y una infección eficiente (Ruhel y Chakraborty, 2019).

1.8 Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas interactúan todo el tiempo con organismos tanto benéficos como patógenos, por ello han desarrollado respuestas adaptativas para interpretar las diferentes señales moleculares que reciben por parte de estos agentes externos. Esta compleja comunicación varía a su vez con la gran diversidad de especies de plantas, insectos y microorganismos que interactúan entre sí y pueden permitir el mejoramiento y la nutrición vegetal, favorecer la tolerancia al estrés y ayudar al control de plagas (Pumplin y Voinnet, 2013).

Los procesos de defensa de las plantas frente a agentes patógenos, como los virus, inician a través de señalizaciones moleculares entre los organismos involucrados, entre los cuales se encuentran los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por parte de los receptores de reconocimiento PRRs de la planta, así como las proteínas o efectores específicos derivados del agente causal que son detectados por los receptores inmune de la planta, activando así dos mecanismos de defensa conocidos como Inmunidad activada por PAMPs (PTI) e inmunidad activada por efectores (ETI) respectivamente (Ramírez y Rodríguez, 2012; Pumplin y Voinnet, 2013).

Los PRRs son un componente crucial en el sistema inmune de las plantas. Entre estos receptores se encuentran los tipos cinasa-receptor localizados en la superficie (RK) y las proteínas semejantes a receptores (RLP). Los PRRs son capaces de percibir 2 clases de patrones moleculares, los que están asociadas a patógenos o PAMPs y los asociados a microorganismos o

MAMPS. La inmunidad activada por patrones (PTI) es capaz de reconocer a las moléculas que están altamente conservadas que poseen la mayoría de los microorganismos, como las PAMP o las MAMP. La ETI por otra parte, es la inmunidad activada por efectores, y es capaz de reconocer y responder a factores causantes de virulencia denominados “efectores”. Estos son capaces de suprimir la respuesta de primer nivel PTI y así facilitar el proceso de infección y colonización (Burbano, 2020).

Un mecanismo de adaptación de plantas es la rapidez y habilidad para reconocer y responder frente a una posible invasión encendiendo sus mecanismos de defensa. Estas respuestas de resistencia, que están mediadas por hormonas como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET), no solo permiten a la planta la rápida comunicación celular para limitar el crecimiento de patógenos, sino que pueden ser activadas también por organismos benéficos y rizobacterias, que confieren mejoras contra posibles ataques posteriores. Los patógenos inducen la resistencia sistémica adquirida (SAR) mientras las bacterias benéficas la resistencia sistémica inducida (ISR) y ambos mecanismos se encargan de la producción de compuestos como proteínas relacionadas con patogénesis (PR) con actividad antimicrobiana (Ramírez y Rodríguez, 2012).

1.9 Microbioma de las plantas

El microbioma, es un ecosistema que comprende todos los microorganismos presentes en un medio determinado. Las plantas pueden dividirse en diferentes microambientes; la rizósfera que comprende la raíz y el área alrededor de ella, la filósfera donde se encuentran las hojas, la antrósfera que comprende las flores, la espermosfera y la carpósfera que representan a las semillas y a los frutos, respectivamente, por lo que existen diversos microambientes que proporcionan condiciones bióticas y abióticas específicas para la vida microbiana, que a su vez tiene una función específica en relación con la planta que la hospeda (Cotes, 2018).

Los microorganismos son los seres vivos con más variedad en la tierra y están distribuidos por todos los ambientes conocidos. La capa de suelo alrededor de las raíces de las plantas, denominada rizósfera, alberga una gran variedad de microorganismos, siendo considerado el ecosistema más grande de la tierra con gran cantidad de flujo de energía (Prashar *et al.*, 2013).

1.9.1 La rizósfera

La rizósfera es un microambiente caracterizado por su elevado contenido de comunidades microbianas, siendo uno de los ambientes más estudiados principalmente porque los microorganismos presentes cerca de la raíz promueven el aprovechamiento de los nutrientes y pueden afectar positivamente a la salud de las plantas, aumentando su desarrollo o evitando enfermedades (Cotes, 2018).

Durante su metabolismo, muchas moléculas son liberadas a través de las raíces de las plantas, haciendo que la rizósfera sea rica en nutrientes, lo que permite que la microflora sea más abundante en la rizósfera a comparación del suelo común, siendo desde 10 a 100 veces mayor la cantidad de bacterias presentes en la rizósfera comparadas con el suelo (Prashar *et al.*, 2013). Las bacterias son los microorganismos más abundantes en la rizósfera, gran parte de la superficie total de las raíces están cubiertas por bacterias, entre las que destacan los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arhtrobacter*, *Rhizobia*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Mycobacterium*, *Flavobacter*, *Cellulomonas* y *Micrococus* (Prashar *et al.*, 2013).

Las bacterias promotoras de crecimiento (PGPB) pueden promover el crecimiento directo e indirecto de las plantas. Entre los mecanismos directos se incluyen la producción de auxinas, ACC deaminasa, citoquinina, gibberelina, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosforo y el secuestro de hierro por bacterias sideróforas, que tienen un efecto directamente en beneficio de la planta. Por otro lado, los mecanismos indirectos son más enfocados hacia las bacterias que promueven la inhibición de organismos patógenos, tanto hongos como otras bacterias, y entre estos se encuentran la producción de ACC deaminasa, antibióticos, enzimas en la pared celular, competencia con otras bacterias y la respuesta sistémica inducida. Algunas otras bacterias promotoras también permiten a las plantas mantenerse saludables en ciertos ambientes, modificando el pH o permitiéndole soportar otras condiciones estresantes en diferentes tipos de suelos (Olanrewaju *et al.*, 2017).

Muchas bacterias que forman parte del suelo, como el género *Bacillus*, poseen ciertas características metabólicas que permiten su supervivencia y la colonización en las raíces de las plantas, estimulando diversos mecanismos de promoción de crecimiento a través de la síntesis

de hormonas. Además, tienen la capacidad de favorecer la fijación de nitrógeno, movilización de fosfatos, así como de inducir la producción de enzimas estimulando la resistencia en la planta (Samaniego *et al.*, 2017). Así mismo, los microbiomas asociados a las plantas pueden variar respecto a interacciones complejas con los hospederos, con otros microorganismos y con el ambiente, lo que da lugar a un cambio en las interacciones bioquímicas y metabólicas con otros organismos, como con los patógenos (Trivedi *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteínas elicitoras de la respuesta contra patógenos en plantas

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal son un tipo de bacterias capaces de estimular las respuestas de resistencia liberando moléculas elicitoras, sustancias que estimulan las plantas para producir una reacción de defensa, logrando así en algunas ocasiones el control de las enfermedades de las plantas. Estos elicitores pertenecen a un amplio y diverso grupo de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a microorganismos (MAMPs), y pueden ser de tipo proteínas, polipéptidos, oligosacáridos y lípidos (Zhang *et al.* 2018).

El género *Pseudomona* ha destacado entre los grupos de bacterias que promueven la respuesta sistémica inducida (ISR) en plantas. Sin embargo, en años recientes se ha incrementado el número de *Bacillus spp* reportados con capacidad de inducir la respuesta sistémica inducida, y que pueden reducir significativamente la severidad de la enfermedad para un amplio rango de patógenos en diversos hospederos. Se ha reportado una proteína elicitora PeBA1 proveniente de *B. amyloliquefaciens*, un organismo estudiado previamente como promotor del crecimiento en plantas, que es capaz de inducir eventos de señalización temprana en los mecanismos de defensa de la planta de tabaco y es capaz de activar la resistencia sistémica contra la infección del virus del mosaico del tabaco y el hongo *Botrytis cinérea*. Los resultados de dicho estudio también mostraron que la proteína PeBA1 promovió la activación de múltiples genes de defensa, incluyendo PR1a, PR1b, PR5 y PAL relacionados con la vía de ácido salicílico (SA) y los genes PDF12 y Col1, relacionados con el ácido jasmonico (JA) (Wang *et al.*, 2016).

En 2019, Li y colaboradores utilizaron la proteína PeaT1 derivada de *B. amyloliquefaciens* NC6 como inductor de la defensa en plantas contra hongos, virus y áfidos, comprobando que la inoculación de dicha proteína resulta eficiente hasta un 30% contra el *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV), reduciendo significativamente la acumulación de ARNm viral en las plantas tratadas. Además, se probó que el áfido *S. graminum* que cumple la función como vector del virus, tomó más tiempo para encontrar y alimentarse de las plántulas tratadas con la proteína PeaT1, ganando además mayor peso en las plantas y cantidad de clorofila (Li *et al.*, 2019).

En hongos se ha encontrado que el género *Trichoderma spp.* actúa como biocontrol mediante la segregación de proteínas de bajo peso molecular que inducen las respuestas de defensa en las plantas. Uno de los grandes grupos de proteínas secretadas por *Trichoderma* son las proteínas ricas en cisteína (SSCPs) entre las que destacan la proteína Ep1, que se ha confirmado actúa como elicitador para inducir los mecanismos de defensa y juega un rol importante en la interacción entre *T. asperellum* y distintas especies de álamo (Yu *et al.*, 2018). Yu y colaboradores en 2018 encontraron que dos proteínas Epl1 obtenidas de *T. asperellum* que pueden inducir y altera los niveles de expresión de 11 genes relacionados con las vías de señalización del ácido salicílico, jasmonato y auxinas.

Se ha reportado también una proteína elicitora aislada del actinomiceto *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 denominada BAR 11 que funciona como estimulante de la resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana* frente a *Pseudomonas syringae* pv, y ha demostrado la capacidad de inducir las vías de ácido salicílico y ácido jasmonico, así como la interacción con catalasas hospederas dentro de las células de las plantas (Zhang *et al.*, 2017).

2.2 Resistencia a partir de secuencias derivadas de patógenos

Existen diversos estudios que se han enfocado en el tratamiento de enfermedades causadas por Geminivirus en cultivos, frecuentemente utilizando la expresión de secuencias derivadas de patógenos para obtener plantas resistentes al virus que se tiene como objetivo (Lucioli *et al.*, 2003). Algunas investigaciones se han enfocado en este principio para mejorar el sistema de protección viral utilizando secuencias homologas. En 2004, Chellappan y colaboradores utilizaron la secuencia de la proteína Rep del *African cassava Mosaic virus* (ACMV) en plantas de *Manihot esculenta* retándola frente al *East African cassava Mosaic Cameroon Virus* (EACMCV) y demostrando que la secuencia transformada era capaz de conferir una fuerte protección mediante la activación del silenciamiento génico.

Se ha demostrado también que la expresión de una sola parte del gen de replicación de Geminivirus es capaz de conferir cierta resistencia ante la infección viral. En 1996, Noris y colaboradores transformaron plantas de *Nicotiana benthamiana* con una parte del gen de la proteína de replicación Rep y demostraron que una secuencia incompleta que codifica 210

aminoácidos era capaz de conferir resistencia contra el Virus Del Rizado Amarillo Del Tomate (YLCV).

Posteriormente, Lucioli y colaboradores (2003) utilizaron la misma secuencia de Rep 210 transformando plantas de *N. benthamiana* y retándolas frente a virus heterólogos y observando cómo intervienen los distintos dominios de la proteína al conferir resistencia frente a estos, llegando a demostrar que no solo dicha parte de la proteína confería resistencia, sino que incluso una secuencia que codifica solo 130 aminoácidos de la proteína era capaz de disminuir el nivel de replicación del virus dentro de la planta (Lucioli *et al.*, 2003).

2.3 Efecto de los patógenos en las comunidades microbianas de las plantas

Estudios recientes indican que las plantas infectadas con patógenos pueden alterar la comunidad microbiana presente en la rizósfera y filósfera de las plantas. Bai y colaboradores aislaron cultivos de microbiota derivada de hojas y raíz de *Arabidopsis thaliana* y encontraron similitudes en las categorías taxonómicas encontradas, indicando que ambos microbiomas, tanto en rizósfera como en filósfera se encuentran relacionados, y estos a su vez se relacionan con la salud de la planta, la productividad y la función en el ecosistema. Complementado esto, Gao y colaboradores en 2021 encontraron que frente a la enfermedad *Fusarium wilt disease* (FWD), las comunidades microbianas de diferentes compartimentos de plantas de *Capsicum annuum L.* eran afectadas de distinta manera dependiendo del órgano de la planta, viéndose más afectadas las comunidades de raíz y tallo, a comparación con partes aéreas de la planta como frutos y hojas. También demostraron que las plantas enfermas fueron más susceptibles a colonización por hongos patogénicos y a su vez aumentó la abundancia de bacterias benéficas presentes en su microbioma (Gao *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades virales en plantas son una de las principales causas de pérdidas económicas en los cultivos agrícolas de todo el mundo. En México, los begomovirus han demostrado estar relacionados con gran parte del deterioro de cultivos hortícolas, principalmente en el chile (*Capsicum*). A pesar de que se tienen medidas para manejar a las poblaciones del insecto vector de estos virus, estas no resultan siempre eficaces, ya que dependen en gran parte de la detección temprana del vector y de implementación de medidas de control de riesgo en el cultivo.

Las proteínas elicitoras aisladas de patógenos han surgido como alternativa para la inducción de mecanismos de defensa y genes de resistencia en plantas, sin embargo, se ha estudiado muy poco el potencial de las proteínas virales en su uso como activadores de la resistencia en plantas susceptibles a diversas enfermedades.

El estudio del efecto que puede provocar una proteína de origen viral, altamente conservada e involucrada en el éxito de la infección, en plantas susceptibles, podría abrir paso a nuevas investigaciones enfocadas en esta alternativa para la inducción de los mecanismos de defensa en plantas susceptibles a virus. Aunado a esto, se destaca la importancia del microbioma de las plantas como parte de la compleja red de señales moleculares que intervienen tanto en su crecimiento como en la respuesta ante diversos patógenos, por lo que se pretende encontrar una alternativa que estimule la resistencia a la enfermedad y al mismo tiempo no represente un impacto negativo en la comunidad microbiana.

4. HIPÓTESIS

Si la inoculación de proteínas elicitoras obtenidas de diversos microorganismos ha favorecido la inducción de genes de resistencia y la activación de la respuesta inmune en ciertas especies de plantas, entonces, se espera que proteínas de origen viral, como la proteína REP del PepGMV, tengan un efecto como promotores de la resistencia a enfermedades virales en la planta modelo *Nicotiana benthamiana*, y así mismo, que esta respuesta no genere impactos negativos sobre la comunidad microbiana del rizobioma de la misma.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la proteína viral REP del Begomovirus PepGMV como inductora del sistema inmune en la planta modelo *N. benthamiana*, así como, comparar los posibles efectos del virus y la proteína en la comunidad microbiana que habita el rizobioma.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar el tipo de respuesta inmune que PepGMV induce en *N. benthamiana*.
- Evaluar la respuesta inmune ante la proteína REP de PepGMV inoculada en *N. benthamiana*.
- Analizar los efectos que PepGMV y la proteína REP provocan en la comunidad microbiana del rizobioma.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* que contienen los constructos PepGMV-A y PepGMV-B en los plásmidos pBluescript y pGreen, respectivamente, así como la cepa de *Escherichia coli* que contiene la secuencia de la proteína REP en un plásmido pBINX fueron proporcionadas por el Dr. Rafael Rivera Bustamante del CINVESTAV-Unidad Irapuato. Se preparó medio de cultivo LB en placas Petri adicionado con Ampicilina a concentración de 100 µg/mL para las cepas de *E. coli* con el vector pBluescript resistente a ampicilina, y medio adicionado con kanamicina y rifampicina 50 µg/mL para las cepas de *A. tumefaciens* con el vector pGreen resistentes a ambos antibióticos. Por su parte se preparó medio LB a concentración de 100 µg/mL de kanamicina para las cepas de *E. coli* con Rep en el vector pBINX resistente a este antibiótico. Las 5 cepas donadas se sembraron en placas con sus respectivos antibióticos y a su vez en las placas con el antibiótico al cual no son resistentes, con el fin de comprobar la presencia del vector que confiere la resistencia en cada una de las cepas.

6.2 Extracción y análisis de material genético de cepas bacterianas

Una vez comprobada la presencia del vector, se realizó la siembra de las 4 cepas en matraces con 30 mL de medio de cultivo LB adicionado con el respectivo antibiótico y se incubaron a 30 °C, 150 rpm durante 3 días. Con el fin de comprobar la presencia del ADN viral dentro del constructo, se realizó la extracción de ADN plasmídico, utilizando el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep (Zymo) según las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración del ADN plasmídico recuperado en Nanodrop y se realizó la técnica de electroforesis en gel de 50 mL de agarosa 1 % con 3 µL de Bromuro de Etidio a 90 V durante 1 hora para observar su integridad.

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligos PAL1v1978 (5' GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT 3'), PAR1c496 (5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3') para amplificar una región de 1.1 kb del ADN-A de geminivirus perteneciente a un fragmento de la proteína de replicación Rep, y los oligos PBLv20440 (5' GCCTCTGCAGCARTGRTCKATCTTCATACA 3'), y PCRc1 (5' CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA

3') para amplificar una región de 0.65 kb que pertenece a la proteína CP del ADN-B utilizando las siguientes condiciones: 30 ciclos, 1 min 94 °C, 1 min a 50 °C, 1 min a 72 °C y 3 min de extensión 72 °C (Rojas *et al.*, 1993). La técnica de PCR fue realizada mediante la siguiente metodología; se definieron 25 µL como volumen final, por cada reacción se agregó 1 µL de muestra de ADN genómico de aproximadamente 100 ng/µL, 0.62 µL de oligos F (10 pmol/µL) y 0.62 µL de oligos R (10 pmol/µL), 5 µL de buffer 5X, 17.13 µL de agua, 0.5 µL de dNTPs y 0.125 µL de Go taq ADN polimerasa. Una vez obtenido el resultado de PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de 50 mL de agarosa al 1 % adicionado con 3 µL de Bromuro de Etidio, a un voltaje de 90 V durante 60 minutos y fue visualizado en un fotodocumentado para observar las bandas de ADN amplificadas.

Para confirmar la presencia de la secuencia viral del PepGMV en ambas cepas se utilizaron primers diseñados para amplificar regiones específicas del virus, tanto del genoma A como del genoma B. Se seleccionaron los oligos PepGMVRepq5' (5'-CAAAGCTGGTGATCCGAAAACG-3') y PepGMVRepq3' (5'-GTAAACGAGGATAATGGATAAGG-3') para amplificar la secuencia de la proteína Rep, localizada en el genoma A del virus, esperando un producto de PCR de 104 pb. Para corroborar la presencia del genoma B, se utilizaron los oligos PepGMVMPq5' (5'-GGATAACGAGTCATTACAAGC-3') y PepGMVMPq3' (5'-GGTCCTTCAGTGAAAAGAATG-3'), para amplificar la proteína MP, esperando un producto de PCR de 94 pb (Carrillo *et al.*, 2006).

A partir de los oligos seleccionados y el ADN plasmídico extraído se realizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando 1 µL de templado (100 ng/µL), 1 µL de cada primer (500 nM), 7 µL de agua libre de DNAsas y 10 µL de SYBR Green qPCR Master Mix de Biorad según las indicaciones del fabricante. Los resultados del qPCR fueron analizados digitalmente con el fin de observar si existía amplificación en las cepas que contienen el vector respecto a los oligos que se utilizaron. Además, se realizó una electroforesis en gel de 50 mL de agarosa 1 % con 3 µL de Bromuro de Etidio a 70 V por 60 minutos para analizar las bandas formadas por la amplificación a los 104 y 94pb, que fueron observadas en un fotodocumentador.

6.3 Siembra, germinación y crecimiento de plantas de *N. benthamiana*

Para este estudio, se diseñó un esquema experimental inicial para plantas de *N. benthamiana*, en donde se asignaron 6 plantas por tratamiento (3 muestras de dos plantas por tratamiento), 4 tratamientos a inocular (control, mock, Rep y PepGMV) y 3 tiempos de recolección (1, 7 y 21 días post inoculación). En total se necesitaron 72 plantas de *N. benthamiana* para el primer paso del experimento.

Se realizó el conteo inicial de las semillas y se asignaron 500 pertenecientes a *N. benthamiana* para la siembra del primer experimento. Las semillas se colocaron en 10 macetas con sustrato SOGEMIX (turba ligera y vermiculita) previamente hidratado. Las macetas con semillas se mantuvieron en una cámara bioclimática a 25 °C de temperatura con un periodo natural de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Pasadas 3 semanas de germinación, las plántulas se trasplantaron a macetas individuales con medio SOGEMIX, con una hidratación por riego de manera constante. Se utilizó medio Hoagland 0.5 X como nutriente principal para las plántulas, con un riego periódico de 2 mL por plántula cada 3 días por semana de crecimiento. A partir de la semana 2 de desarrollo, se aumentó la dosis a 4 mL de medio Hoagland 0.5 X por cada planta, 3 días cada semana. A las 4 semanas de crecimiento se aumentó la concentración del medio Hoagland a 1 X, manteniendo la dosis de 4 mL por cada planta, 3 días cada semana.

6.4 Preparación de células competentes y transformación genética

La construcción de la proteína Rep fue proporcionada por el grupo del Dr. Rafael Rivera Bustamante, del CINVESTAV campus Irapuato. La secuencia se introdujo en un vector pBINX, dentro de una cepa de *E. coli* resistente a Kanamicina. Una vez proporcionada, se realizó su siembra en medio LB adicionado con Kanamicina 50 µg/mL, así como en medio LB con Rifampicina 50 µg/mL para verificar que contuviera el plásmido que le confiere la resistencia. Se realizó la extracción de ADN plasmídico con el kit ZymoPure Plasmid Miniprep según las indicaciones del fabricante, se cuantificó su concentración y se corrió en una electroforesis en gel de agarosa 1 % para comprobar su integridad.

Las células competentes de *A. tumefaciens* fueron preparadas inoculando la cepa AT-SLP durante 2 días a 28 °C en placas Petri con medio LB sólido. Una vez crecidas se resembraron en medio LB líquido tomando una colonia aislada y dejándola crecer a 28 °C en agitación constante a 150g durante 3 días. Pasada la incubación se tomaron los tubos y se enfriaron a 0 °C durante 30 minutos (hielo), transfiriendo 1.5 mL del cultivo enfriado dentro de tubos eppendorf previamente enfriados. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 4000 g a 4 °C, descartando el sobrenadante y agregando 1 mL de CaCl₂ 20 mM enfriado con hielo. Se resuspendieron las células en el CaCl₂ y se realizó un lavado centrifugando a 4000 g a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y las células precipitadas fueron resuspendidas en 200 µL de CaCl₂ 20 mM. Se agregaron 4 µL de ADN plasmídico que contenía la secuencia de Rep a los tubos con las células competentes y se incubaron 30 minutos en hielo, seguido de 5 minutos de incubación a -80 °C. Se realizó un choque térmico colocando los tubos en baño de agua a 37 °C durante 5 minutos y después regresándolos por 5 minutos a la incubación en hielo. Se agregó 1 mL de medio LB líquido en cada uno de los tubos y se colocaron en una incubadora orbital a 28 °C y 150g durante 3-4 horas. Una vez pasadas las horas, se resembraron las bacterias en placas Petri con medio LB adicionado con antibióticos para comprobar la presencia del plásmido dentro de las células transformadas y se dejaron incubando de 2-4 días a 28 °C.

6.5 Inoculación de plantas por agroinfiltración e infiltración

Para realizar la agroinfiltración de forma exitosa, previamente se realizó la incubación de las cepas de *A. tumefaciens* con los constructos virales y el constructo de Rep en 50 mL de medio LB líquido adicionado con kanamicina 50 µg/mL y rifampicina 50 µg/mL para las cepas de *A. tumefaciens* con PepGMV y 100 µg/mL de ampicilina para la cepa con Rep, dejando incubar por 24 horas en agitación a 28°C y a 150 g. Una vez crecidas las cepas se tomaron muestras en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 1600 g durante 10 minutos descartando el sobrenadante. El pellet formado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se midió la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectofotómetro.

Una vez determinada la DO necesaria para la agroinfiltración, se llevó a cabo la preparación de las colonias para iniciar el experimento. Se tomaron las colonias de las cepas AT-PGMV-A y AT-

PGMV-B (*A. tumefaciens* que contienen el clon viral PepGMV A y PepGMV B clonados en vector binario pGreen) y se inocularon en 8 tubos falcon de 50 mL con 50 mL de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina y rifampicina por 24 horas a 28°C y en agitación a 150 g. Se tomaron 8 tubos (4 con *Agrobacterium* sin vector viral como mock y 4 con el vector del virus para el PepGMV) y se centrifugaron a 1600 g durante 10 minutos hasta formar la pastilla bacteriana. Se prepararon 400 mL de buffer de infiltración (MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM pH 5.8, acetosiringona 150 µM) y se agregaron 50 mL a cada uno de los tubos resuspendiendo la pastilla bacteriana formada. Para las cepas con la proteína Rep se inocularon 2 tubos falcon de 50 mL con 25 mL de medio de cultivo LB suplementado con kanamicina por 24 horas a 28°C y en agitación a 150 g. Se tomaron los 2 tubos, se centrifugaron a 1600 g durante 10 minutos y se preparó 100 mL de buffer de infiltración, agregando 50 mL a cada tubo para resuspender las pastillas. Se inocularon 2 mL del medio de infiltración con AT-PGMV-A y AT-PGMV-B (50:50) y el medio con AT-Rep en la superficie de 3 hojas expandidas por cada planta, utilizando una jeringa sin aguja. Para los mock se utilizó la solución de infiltración homogenizada con células de *A. tumefaciens* carentes del clon viral. Para las plantas control no se manejó ningún tratamiento. Todas las plantas se mantuvieron a temperatura de 25°C en fotoperiodo natural de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, verificando la aparición de síntomas diariamente.

6.6 Recolección de muestras de tejido foliar y radicular

6.6.1 Recolección de tejido vegetal foliar

Utilizando tijeras, se tomó tejido sistémico vegetal de 3 hojas no inoculadas por cada planta y se realizó un grupo de 2 plantas por cada muestra (triplicado), para cada uno de los tratamientos (1 día, 7 días y 21 días post inoculación). En total, 9 muestras por tratamiento, cuatro tratamientos, 36 muestras en total. Las muestras se colocaron en tubos falcon de 50 mL y se resguardaron inmediatamente a -80°C.

6.6.2 Recolección de tejido vegetal radicular y rizósfera.

Con ayuda de tijeras y pinzas, se tomaron 2 plantas y se recortaron las raíces a partir del inicio del tallo, procurando sacudir el exceso de tierra adherido, haciendo un grupo de ambas raíces

para cada muestra. Para las muestras de rizósfera, se recolectó la tierra adherida a la raíz y se agregaron 30 mL del suelo adyacente a las raíces, de dos plantas por cada muestra. Todas las muestras se resguardaron inmediatamente en tubos falcon a -80°C .

6.7 Preparación de las muestras para extracción de ADN

Las muestras designadas para el análisis de las bacterias endofíticas de las raíces fueron lavadas con agua destilada y esterilizadas con etanol al 70 % en un lavado de 2 minutos en agitación. Las muestras fueron lavadas de nuevo con agua destilada estéril durante 2 minutos con el fin de retirar el exceso de etanol, y seguido se aplicó hipoclorito de sodio al 5 % durante 10 minutos como segundo método de asepsia. Por último, se realizaron dos lavados más con agua destilada estéril para remover los residuos de hipoclorito de sodio. Las muestras de raíz para el análisis de tejido endofítico fueron maceradas con nitrógeno líquido en un mortero y recolectadas en tubos para su posterior procesamiento.

6.8 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las muestras se realizaron dos metodologías. En la primera, utilizada para muestras de hoja y raíz, se tomaron las muestras recolectadas y se agregaron 10 mL de buffer de extracción precalentado (2 % SDS, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris y 20 mM EDTA). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 55°C y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 72 horas.

Una vez realizada la lisis celular, se tomó 1 mL del sobrenadante obtenido y se transfirió a tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL, a los que se agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) a pH 8.0 y se mezcló cuidadosamente por inversión. Se realizó una centrifugación de las muestras a 12000 g por 15 minutos y la fase acuosa fue recuperada en tubos eppendorf de 1.5 mL. Una vez descartadas las proteínas, se agregaron 500 μL de isopropanol al ADN y se dejó incubar por toda la noche a -20°C para su precipitación. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 70%. El pellet de ADN formado se dejó secar a temperatura ambiente, se resuspendió en 50 μL de buffer TE (10:1) y se resguardó a -20°C para su posterior uso.

Las muestras de ADN fueron purificadas mediante un kit de limpieza Wizard DNA clean-up system (Promega) para la eliminación de los ácidos húmicos. Se colocó una columna para cada muestra de ADN, conectando una jeringa de 3 mL de volumen. Se mezcló el reactivo DNA clean up resin previo a su uso y se agregó 1 mL a cada una de las muestras, mezclándolas por inversión. Las mezclas se agregaron a cada columna y se colocó el émbolo ejerciendo presión para hacer pasar la solución lentamente a través de la matriz de la columna. Se lavó la columna haciendo pasar 2 mL de isopropanol al 80 % y se centrifugó por 2 minutos a 10000 g para retirar el exceso de la resina. La columna se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 50 µL de agua grado biología molecular precalentada. Por último, se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 30 segundos para obtener el ADN purificado en un tubo nuevo.

La segunda metodología se realizó con el kit DNeasy Power Soil Prokit y se utilizó para la extracción de muestras de rizósfera y de suelo (sustrato previo a la siembra de plantas). Se inició tomando 50 mg de cada muestra de rizósfera y se agregaron 800 µL de CD1. Se realizó un vortex a máxima velocidad por 10 minutos y se centrifugó la muestra por 1 minuto a 15000 g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL y se agregaron 200 µL de CD2 con vortex de 5 s para mezclar. Se centrifugó a 15000 g por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de 2 mL. Se agregaron 600 µL de CD3 con vortex de 5 s. Se tomaron 650 µL de la mezcla y se agregaron a una columna MB SpinColumn centrifugando a 15000 g por 1 minuto. Se descartaron los residuos y se pasó por la columna el resto del lisado. Se lavó la columna agregando 500 µL de solución EA y centrifugando a 15000 g por 1 minuto. Se descartaron los residuos y se colocó la columna en un tubo nuevo centrifugando a 16000 g por 2 minutos para eliminar todo residuo de etanol. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se agregaron 50 µL de buffer de elución. Se realizó una centrifugación a 15000 g por 1 minuto y se descartó la columna. El proceso se repitió para cada muestra de rizósfera de 7 y 21 dpi.

6.9 Extracción de ARN de tejido foliar

Las muestras de hojas recolectadas fueron procesadas en un mortero agregando nitrógeno líquido y macerando hasta conseguir un polvo fino. Se colocaron tubos eppendorf de 2 mL de volumen para cada muestra con 1 mL de PureZol (BioRad) y se agregaron 500 mg de muestra a cada uno de los tubos homogenizando inmediatamente. Las muestras se incubaron por 2 horas

y después se centrifugaron a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se agregaron 200 µL de cloroformo por cada volumen de PureZol y se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 segundos. Se incubaron 5 minutos y se centrifugaron durante 15 minutos a 4 °C transfiriendo la fase acuosa resultante a un tubo nuevo libre de ARNasas. Se agregaron 500 µL de isopropanol a cada muestra y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Se realizó una centrifugación a 12000 g por 10 minutos a 4 °C en donde el ARN precipitó como un pellet blanco en el fondo del tubo. El sobrenadante se descartó y se realizó un lavado con etanol al 75% preparado con agua libre de ARNasas. Se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Por último, las muestras fueron resuspendidas en 30 µL de agua libre de ARNasas grado biología molecular.

6.10 Síntesis de primera cadena (ADNc)

Se cuantificó la concentración de las muestras de ARN en un nanodrop y se agregó 1 µg a tubos eppendorf nuevos de 1.5 mL. Para la síntesis de la primera cadena se utilizó el kit First Strand cDNA Synthesis de Thermofisher. Se agregaron 4 µL de mix de reacción 5X, 2 µL de la enzima, y se llevó el volumen a 20 µL con agua libre de ADNasas. Se mezcló y se centrifugó por spin. La mezcla se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de 15 minutos a 50 °C. La reacción finalizó calentando los tubos a 85 °C por 5 minutos. Una vez finalizado, se cuantificó el ADNc obtenido y se realizaron diluciones a cada muestra para obtener una concentración final de 100 ng/µL.

6.11 Cuantificación de la expresión génica (PCR tiempo real)

Para el análisis de la expresión se eligieron 14 genes involucrados en distintos mecanismos de defensa característicos de las plantas ante la invasión por un organismo patogénico. Los genes seleccionados fueron MYB4L, PR1, PR2, PDF1, ACS6, EIN2, COL1, OPR3, NPR1, ICS1 (Zhu *et al.*, 2021), AGO1 (Kenesi *et al.*, 2017), DCLs1, DCLs2, DCLs3 y DCLs4 (Qin *et al.*, 2017) (Tabla 1).

Se prepararon los mix de reacción para cada oligo utilizando 10 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix, 0.8 µL de cada oligo forward a 10 pmol/µL y 0.8 µL de cada oligo reverse a 10 pmol/µL. Se agregó 1 µL de templado de ADNc a concentración de 100 ng/ µL y se llevó el volumen a 20

μL en total. Cada reacción fue agregada por triplicado y se llevó a cabo la PCR en tiempo real a 95°C, 30s por 1 ciclo y 95°C, 0.5s, 60°C, 30s, por 40 ciclos.

Tabla 1. Primers utilizados para el análisis de la expresión de genes involucrados en distintos mecanismos de defensa.

<i>Gen N. benthamiana</i>	Nombre oligo	Secuencia	Referencia
<i>NbMYB4L</i>	NbMYB4L-F	TGGAGTCGTCGAGTATTT	Zhu et al. 2021
	NbMYB4L-R	TAGCAGCAACCATAACAT	
<i>NbPR1</i> <i>Pathogenesis related gene 1</i>	NbPR1-F	TAACGCTGGATTGTTCTGT	Zhu et al. 2021
	NbPR1-R	TCCTTCTCCTCCTTGACCC	
<i>NbPR2</i> <i>Pathogenesis related gene 2</i>	NbPR2-F	CTAATGGCATCAGAAAGA	Zhu et al. 2021
	NbPR2-R	GTGTCCCGTCTGTTTGTG	
<i>NbPDF1</i> <i>Plant defensin gene 1</i>	NbPDF1-F	AACMTCGCTTGATWACAA	Zhu et al. 2021
	NbPDF1-R	ATGGGKYWTKGAAYAACT	
<i>NbACS6</i> <i>1-aminocyclopropane-1 carboxylic acid-synthase</i>	NbACS6-F	CTACACCGTATTACCCAG	Zhu et al. 2021
	NbACS6-R	CAGATTCTAAGGCTTCTT	
<i>NbEIN2</i> <i>Ethylene insensitive 2</i>	NbEIN2-F	AGTACCATCTCCTCGTT	Zhu et al. 2021
	NbEIN2-R	GAATTATTTGCGGCTACA	
<i>NbCOI1</i> <i>Coronatine insensitive 1</i>	NbCOI1-F	GACGAGTTGTAGCCAGTG	Zhu et al. 2021
	NbCOI1-R	ATTCAGCGAGAAGGTAAG	
<i>NbOPR3</i> <i>Oxophytodienoate reductase 3</i>	NbOPR3-F	ATTTGTAGTGGCGGATAT	Zhu et al. 2021
	NbOPR3-R	CTTAGTTAGAGGTGCGTTA	
<i>NbNPR1</i> <i>Nonexpresor of pathogenesis related gene 1</i>	NbNPR1-F	TGCGAACATTTGTGGTAA	Zhu et al. 2021
	NbNPR1-R	CAGAATCCAATGCCCTAT	
<i>NbICS1</i> <i>Isochorismate synthase 1</i>	NbICS1-F	GAAGAAACAACCCGATGC	Zhu et al. 2021
	NbICS1-R	CAATGAATGCCGCTGACT	
<i>NbAGO</i> <i>ARGONAUTE</i>	AGO2-1fwd	CATGACTTTGGGTTTGGAGTTG	Kenesi et al. 2017
	AGO2-1rev	CGGAATGCCAAGACTGAGTAA	
<i>DCLs1</i> <i>DICER-LIKEs 1</i>	NbDCLs1-F	TTTTCAGCCATTATTGCAT	Qin et al. 2017
	NbDCLs1-R	CTATATCCCACCTTCGACT	
<i>DCLs2</i> <i>DICER-LIKEs 2</i>	NbDCLs2-F	ATAATGAATGTACTCGCTCAGG	Qin et al. 2017
	NbDCLs2-R	GGACTCCCATCCGAACGTG	
<i>DCLs3</i> <i>DICER-LIKEs 3</i>	NbDCLs3-F	CCTATGCCTAGTTTGGAGTCA	Qin et al. 2017
	NbDCLs3-R	AGCTCTATCAAACCGTAGTCG	

<i>DCLs4</i>	NbDCLs4-F	ACGTGATCAATCATTTTATCCCA	Qin <i>et al.</i> 2017
<i>DICER-LIKEs 4</i>	NbDCLs4-R	GCACCATCTGTTACATTACCAC	
<i>EF1</i>	EF1fwd	AGCTTTACCTCCCAAGTCATC	Czechowski <i>et al.</i> ,
	EF1rev	AGAACGCCTGTCAATCTTGG	2004

6.12 Cuantificación absoluta de genes 16S e ITS (bacteria, archea y fungi)

Para determinar la abundancia de las comunidades microbianas en las muestras de rizósfera y endofítica, se utilizó la técnica de qPCR en donde se cuantificó el número de copias presentes de gen ADN ribosomal 16S para bacteria (BAC338F y BAC805R) y archeas (ARC787F y ARC1054R), y el número de copias de la región ITS para hongos (NST1 y 58A2R) (Tabla 2). Para la obtención de la curva estándar, se realizaron 6 diluciones seriadas de cada muestra de Bacteria, Archea y Fungi tomando 5 μL de cada una y transfiriéndolos a 45 μL de agua grado biología molecular para obtener una dilución 1/10 en cada serie. Se calculó el número de copias en cada dilución a partir de la fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{\text{Cantidad (ng)} \times 6.022 \times 10}{(pb)} \quad (1)$$

Se comparó el resultado con los Ct obtenidos mediante el qPCR. Se obtuvo el logaritmo en base 10 de los valores obtenidos para el número de copias y realizó una gráfica para correlacionar dicha cantidad con los valores Ct en una ecuación lineal. Una vez obtenida la gráfica y la ecuación de la recta, se realizó un qPCR para cada muestra de rizósfera y endofítica de raíz con el fin de obtener el Ct según la siguiente metodología. Se prepararon los mix de reacción para cada oligo utilizando 10 μL de iTaq Universal SYBR Green Supermix, 0.8 μL de cada oligo forward a 10 pmol/ μL y 0.8 μL de cada oligo reverse a 10 pmol/ μL . Se agregó 1 μL de templado de ADNc a concentración de 100 ng/ μL y se llevó el volumen a 20 μL en total. Cada reacción fue agregada por triplicado y se llevó a cabo la PCR en tiempo real a 95°C, 30s por 1 ciclo y 95°C, 0.5s, 60°C, 30s, por 40 ciclos. Se reemplazó el valor Ct en la ecuación obtenida. Los valores obtenidos a partir de la sustitución se reemplazaron por el anti logaritmo en base 10 obteniendo así la abundancia de la población microbiana para cada una de las muestras. Todo se realizó por triplicado.

Tabla 2: Genes utilizados para cuantificación absoluta del microbioma.

<i>Gen</i>	<i>Nombre oligo</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Referencia</i>
16S Bacteria	BAC338-F	ACTCCTACCGGAGGCAG	Yu <i>et al.</i> 2005.
	BAC805-R	GACTACCAGGGTATCTAATCC	
16S Arquea	ARC787-F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	Yu <i>et al.</i> 2005.
	ARC1054-R	GCCATGCACCWCCTCT	
ITS	NSI1-F	GATTGAATGGCTTAGTGAGG	Martin and Rygielwicz, 2005.
	58A2R-R	CTGCGTTCTTCATCGAT	

6.13 Cuantificación absoluta de carga viral.

Para conocer la carga viral en las muestras para cada uno de los tiempos, se realizó una curva de concentración a partir de diluciones seriadas del plásmido con el constructo de PepGMV-A a partir de concentración conocida (14 ng/ μ L). Se calculó el número de copias presentes en la muestra original y se realizó un qPCR con el fin de obtener los valores de Ct para cada dilución seriada. Se realizó la curva de concentración a partir de los datos y se cuantificaron las muestras de todos los tratamientos en los 3 tiempos seleccionados a través de PCR en tiempo real. Ambos qPCR se llevaron a cabo con el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix y con las condiciones a 95°C, 30s por 1 ciclo y 95°C, 0.5s, 60°C, 30s, por 40 ciclos. A partir de los datos obtenidos se calculó la carga viral aproximada del PepGMV presente en las muestras de hoja por cada gramo.

6.14 Secuenciación de nueva generación.

24 muestras de ADN de rizósfera (7 y 21 días post inoculación, 4 tratamientos por triplicado), 24 muestras de ADN de endofítica (7 y 21 días post inoculación, 4 tratamientos por triplicado) y 3 muestras de suelo (sustrato utilizado como control) se enviaron a secuenciación de Nueva Generación para perfiles taxonómicos por 16S a través de la plataforma Miniseq.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas en la plataforma MG-RAST. Se subieron ambos pares de cada una de las secuencias y se unieron. Las secuencias no pareadas fueron eliminadas y se procesaron las muestras removiendo las secuencias de baja calidad ($Q \geq 33$). Una vez obtenidos los perfiles metagenómicos de las muestras se separaron por tipo de muestra

(endofítica y rizósfera) y por tiempos de muestreo (7 y 21 días). El programa MG-RAST estimó el índice de Shannon de alfa biodiversidad, la tabla de OTU (unidades taxonómicas operativas), el análisis de componentes principales y la distribución de abundancia del conjunto de muestra.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN de cepas bacterianas y comprobación de la presencia de los plásmidos

Para comprobar que las cepas bacterianas contenían el plásmido con la secuencia del genoma A y B de PepGMV, y de la proteína Rep, se realizaron pruebas microbiológicas y moleculares. Inicialmente, se analizó la presencia del vector de cada cepa utilizando siembra en medio de cultivo LB con antibióticos a los que presentan resistencia (kanamicina y rifampicina para las cepas de AT-PGMV (*A. tumefaciens* que contienen los genomas A y B del PepGMV en un vector pGEM), ampicilina para la cepa EC-PGMV (*E. coli* que contienen los genomas A y B del PepGMV en un vector pbluescript) y kanamicina para la cepa con la secuencia de la proteína Rep, utilizando como control negativo antibióticos a los que no les confiere resistencia. Los resultados mostraron que todas las cepas crecieron en los medios con los antibióticos a los que tienen resistencia, mientras que no hubo crecimiento cuando se sembraron en medio con antibióticos distintos.

Una vez comprobado que el vector que le confiere resistencia está presente en las cepas, se quiso corroborar si se encontraba presente la secuencia viral contenida en cada una de las cepas. Por lo que se realizaron extracciones de ADN plasmídico para cada una de las muestras. Todas fueron comprobadas por electroforesis en gel de agarosa y cuantificadas para verificar la calidad del material genético.

Para identificar las cepas que contienen el virus PepGMV se utilizaron 4 oligos generales de begomovirus, PAL1v1978, PAR1c496, PBLv20440 y PCRC1. Después de comprobar la presencia de una secuencia de begomovirus dentro de los vectores, se sintetizaron oligos específicos para PepGMV y se comprobó la presencia de la secuencia del virus mediante los oligos PepGMVRepq5' y PepGMVRepq3' para amplificar la secuencia de Rep en el genoma A, y los oligos PepGMVMVPq5' y PepGMVMVPq3' para amplificar la proteína MP, en el genoma B. Se realizó un PCR en tiempo real el cual mostró que todos los oligos utilizados amplificaron con las muestras de ADN extraídas de las bacterias alrededor de las 100 pb (Fig. 1). Con esta información se pudo continuar con el experimento, y utilizar las bacterias AT-PGMV A y B para la infección de las plantas con el virus PepGMV.

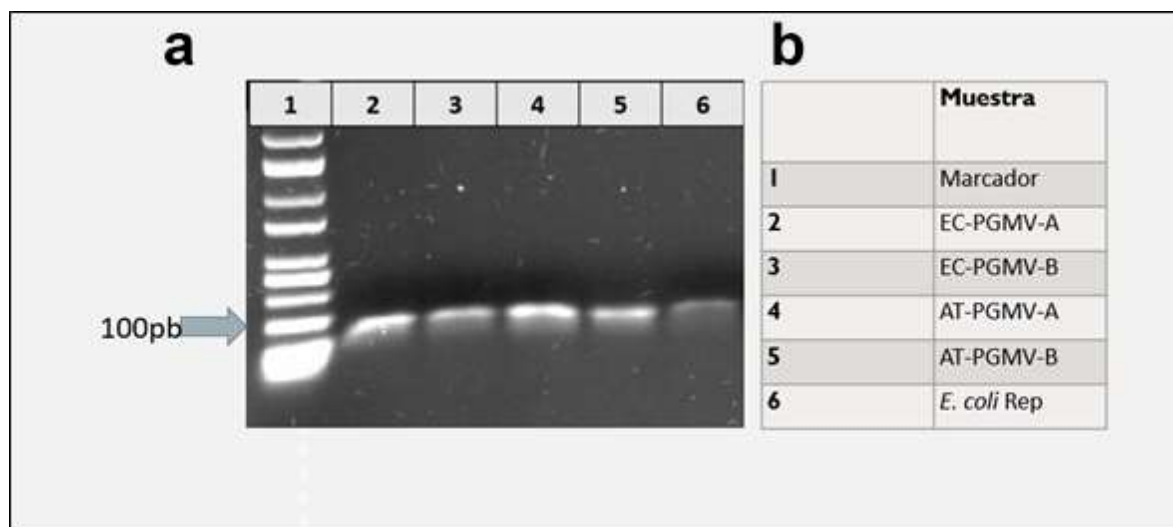


Figura 1. A) Electroforesis de PCR en tiempo real de muestras de ADN plasmídico bacteriano utilizando oligos específicos para detectar la presencia de PepGMV dentro del vector. B) Tabla de las muestras ubicadas en cada carril del gel.

7.2 Inoculación de PepGMV y desarrollo de síntomas en *N. benthamiana*

Una vez realizada la agroinfiltración, se realizaron las recolecciones de muestras (hoja, raíz, rizósfera y suelo) al 1, 7 y 21 días post inoculación (dpi). Se tomaron fotografías en cada uno de los tiempos para evaluar la severidad de los síntomas. En la figura 2 se muestra la comparativa de los tres tiempos de muestreo y los 4 diferentes tratamientos: A los 7 dpi las plantas agroinfiltradas con PePGMV comenzaron a desarrollar síntomas como arrugamiento y amarillamiento en las hojas (Fig. 2g). A los 21 días, se observa el arrugamiento y amarillamiento con mayor intensidad, así como la aparición del mosaico amarillo característico de la enfermedad (Fig. 2k). Estos síntomas no fueron observados en los otros tratamientos.

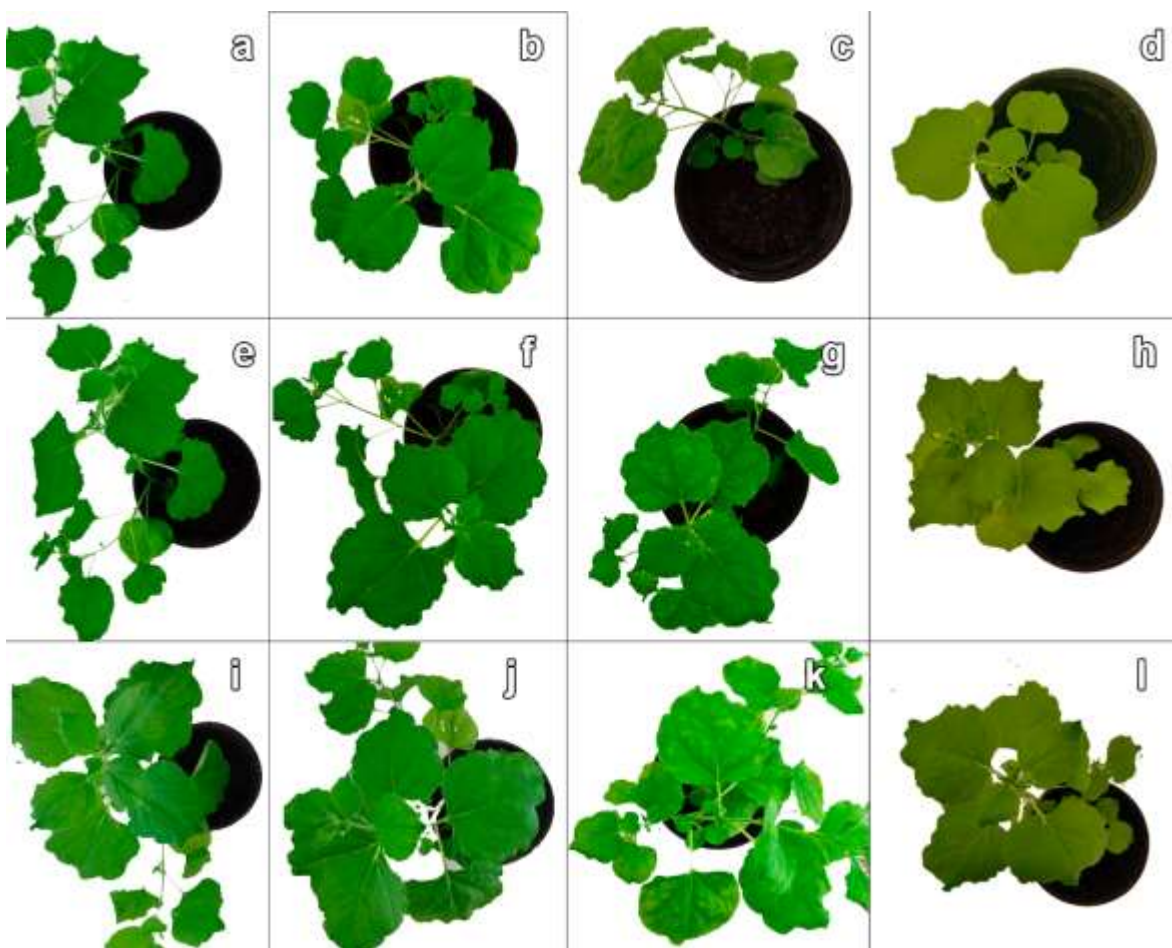


Figura 2. Comparación de sintomatología causada por la agroinfiltración del virus PepGMV y la secuencia Rep en *N. benthamiana*. **a, e, i:** Plantas control a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. **b, f, j:** Plantas mock (inoculación con *A. tumefaciens* sin vector viral) a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. **c, g, k:** Plantas infectadas con PepGMV a 1 dpi, 7 dpi y 21 dpi respectivamente. **d, h, i:** Plantas inoculadas con Rep a 1 dpi, 7dpi y 21dpi respectivamente.

Por otra parte, se realizó la extracción de ADN en muestras de hoja con el objetivo de comprobar la presencia del virus en las plantas infectadas y de conocer la carga viral presente en cada tiempo de recolección. Una vez obtenido el ADN genómico se realizó la técnica de PCR cuantitativo en todas las muestras utilizando el primer que amplifica la proteína Rep para comprobar la presencia en el plásmido. A partir de los valores de Ct y la concentración se calculó el número de copias de los virus presentes en 500 µg de muestra de hoja infectada (Fig. 3). Se observó que la carga viral aumentó significativamente entre 1 y 7 días después de la inoculación, y se mantuvo estable hasta los 21 días. Las muestras control y mock también

fueron analizadas, sin embargo, al no presentar infección por el PepGMV no mostraron amplificación durante el PCR cuantitativo. La muestra inoculada con Rep demostró contener secuencias de la proteína Rep muy baja que no aumentó con los días post inoculación (Fig. 3).

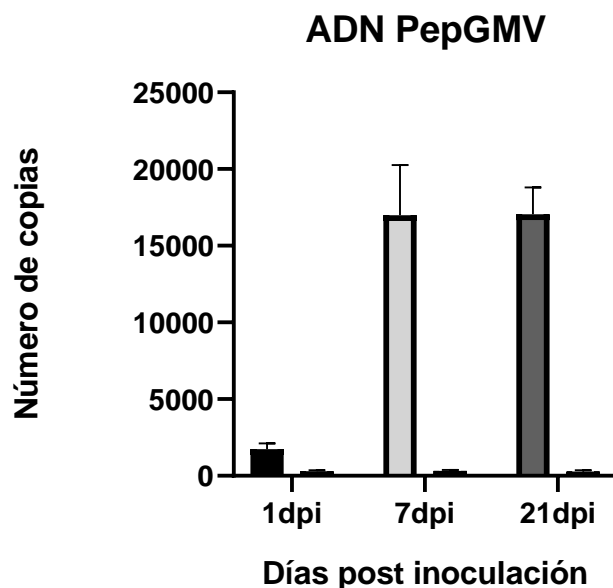


Figura 3. Gráficas de comparación de carga viral de hojas infectadas para los tres tiempos de muestreo en muestras agroinfiltradas con PePGMV y con Rep (barra izquierda: PepGMV, barra derecha: Rep).

7.3 Extracción de material genético

7.3.1 Extracción de ARN de hojas

Las muestras de hojas recolectadas fueron maceradas con nitrógeno líquido y procesadas para la extracción de ARN. Una vez obtenido, se comprobó la integridad de este mediante un gel de electroforesis (Fig. 4) y se cuantificó con el fin de conocer su calidad y la concentración presente en cada muestra (Tabla 3). Se llevó a cabo la síntesis de primera cadena (ADNc) mediante un RT y se cuantificó la concentración obtenida para realizar diluciones a 100 ng/μL necesarias para la técnica de PCR en tiempo real.

Tabla 3. Concentración y calidad de muestras de ARN de hojas.

	<i>Muestra</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Unidad</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
1	C241	1763.6	ng/μl	1.64	1.91
2	C242	1823.1	ng/μl	1.64	1.89
3	C243	1633	ng/μl	1.64	1.87
4	C71	1809.4	ng/μl	1.67	1.97
5	C72	1701.6	ng/μl	1.63	1.87
6	C73	1759.4	ng/μl	1.64	1.92
7	C211	1893.6	ng/μl	1.68	2.04
8	C212	1766.5	ng/μl	1.69	2.05
9	C213	1898.7	ng/μl	1.68	2
10	M241	2077.1	ng/μl	1.68	2.08
11	M242	2027.5	ng/μl	1.69	2.08
12	M243	2070.1	ng/μl	1.69	2.08
13	M71	1725.6	ng/μl	1.7	2.09
14	M72	1560.6	ng/μl	1.68	2.03
15	M73	2369.5	ng/μl	1.68	2.03
16	M211	1679	ng/μl	1.7	2.01
17	M212	1658.3	ng/μl	1.69	2.02
18	M213	1572.6	ng/μl	1.7	2.05
19	V241	1625.4	ng/μl	1.71	2.06
20	V242	1501.8	ng/μl	1.69	2.06
21	V243	1518.8	ng/μl	1.7	2.05
22	V71	1543.9	ng/μl	1.69	2.03
23	V72	1677.9	ng/μl	1.69	2.04
24	V73	2697.8	ng/μl	1.7	2.09
25	V211	1440.8	ng/μl	1.69	2.04
26	V212	1598.1	ng/μl	1.7	2.05
27	V213	1614.7	ng/μl	1.7	2
28	R241	876	ng/μl	1.69	2.09
29	R242	912	ng/μl	1.68	2.03
30	R243	675	ng/μl	1.68	2.03
31	R71	303	ng/μl	1.69	2.01
32	R72	458	ng/μl	1.69	2.02
33	R73	287	ng/μl	1.7	2.05
34	R211	47.1	ng/μl	1.68	1.85
35	R212	347	ng/μl	1.68	1.98
36	R213	175	ng/μl	1.6	1.87

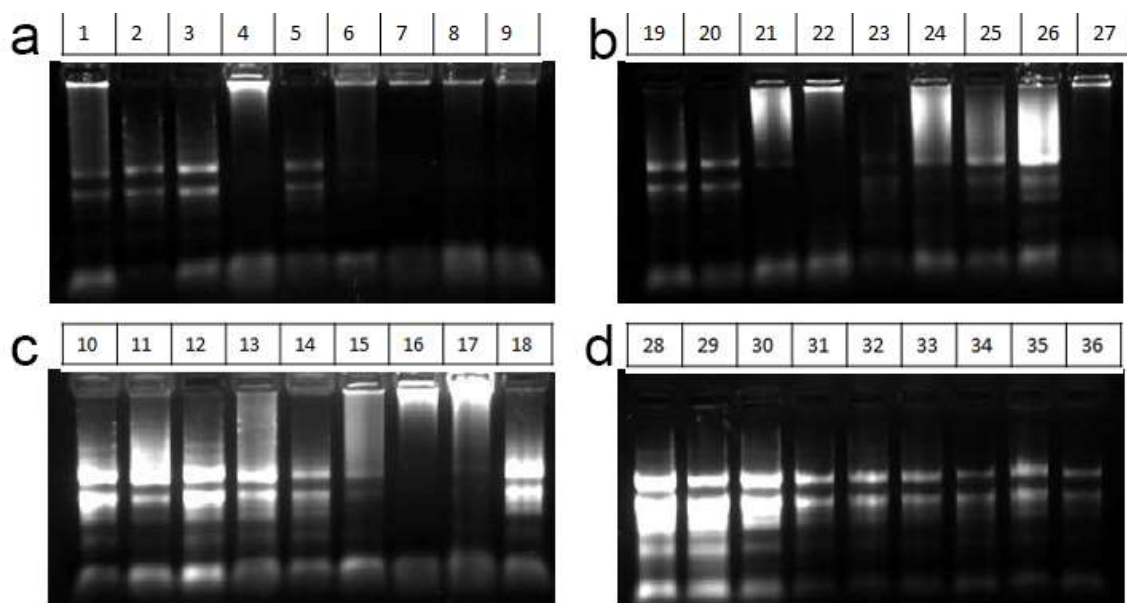


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN. A) Control, B) mock. C) PepGMV, D) Rep (numeración correspondiente a tabla 3). Se pueden observar las bandas de los ARN ribosomales 18S y 25S de cada una de las muestras.

7.3.2 Extracción de ADN de raíz y suelo

Una vez recolectadas, las muestras de raíz y suelo fueron procesadas, agregando buffer de lisis para obtener suficiente material para la extracción de ADN bacteriano. Se comprobó la integridad del ADN extraído para las muestras de raíz mediante la técnica de electroforesis (Fig. 5) y se cuantificaron las muestras con el fin de conocer su concentración y la calidad obtenida (Tabla 4). Las muestras de suelo fueron procesadas mediante el kit de limpieza Wizard DNA clean-up system antes de ser enviadas para su secuenciación (Fig. 6) (Tabla 5). Se enviaron un total de 51 muestras al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Coordinación Mazatlán para secuenciar la microbiota presente por secuenciación de nueva generación en la región 16S-V3 con adaptadores lúmina. Entre las cuales se encontraban 24 de raíz (endofítica), 24 de rizósfera y 3 de suelo (muestras del sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas).

Tabla 4. Concentración y calidad de muestras de ADN de tejido endofítico.

	<i>Muestra</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Unidad</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
1	C7R1	123.1	ng/ μ l	1.99	2.04
2	C7R2	136.4	ng/ μ l	2.09	1.9
3	C7R3	135.7	ng/ μ l	1.95	1.80
4	M7R1	175.1	ng/ μ l	2.08	2.01
5	M7R2	97.3	ng/ μ l	2.04	2.07
6	M7R3	281.9	ng/ μ l	1.71	1.2
7	V7R1	217.3	ng/ μ l	2.09	1.97
8	V7R2	352.5	ng/ μ l	2	1.67
9	V7R3	342.1	ng/ μ l	2.08	1.94
10	C21R1	285.2	ng/ μ l	1.98	1.51
11	C21R2	284.1	ng/ μ l	1.83	1.25
12	C21R3	84.3	ng/ μ l	1.99	1.69
13	M21R1	277.8	ng/ μ l	1.76	1.2
14	M21R2	239.8	ng/ μ l	2.05	1.92
15	M21R3	164	ng/ μ l	1.99	1.82
16	V21R1	606	ng/ μ l	1.65	1
17	V21R2	417.8	ng/ μ l	1.94	1.5
18	V21R3	481.9	ng/ μ l	1.8	1.25
19	R7R1	37.8	ng/ μ l	1.83	0.87
20	R7R2	23.8	ng/ μ l	1.86	1.14
21	R7R3	39.8	ng/ μ l	1.88	1.6
22	R21R1	32.7	ng/ μ l	1.9	0.61
23	R21R2	47.7	ng/ μ l	1.84	1.46
24	R21R3	62	ng/ μ l	1.81	1.72

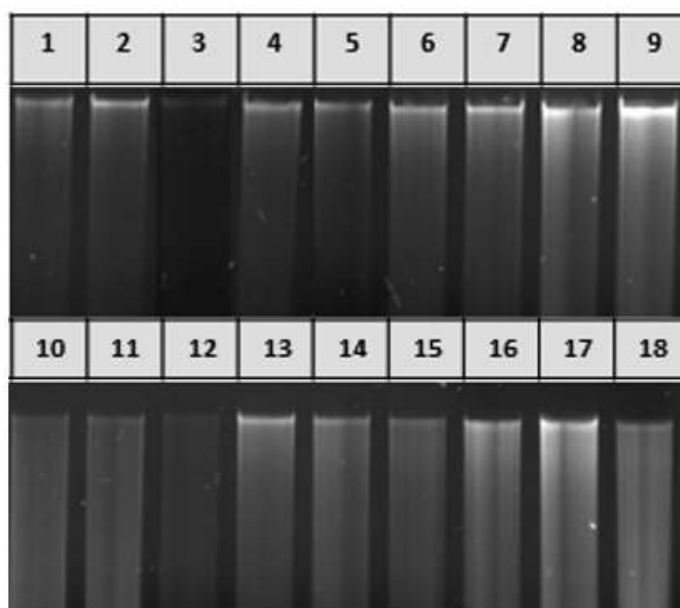


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de tejido endofítico (raíz) de muestras control, mock y PepGMV (Tabla 4). Se observa la banda representativa del ADN genómico en la parte superior de cada carril.

Tabla 5. Concentración y calidad de muestras de ADN de rizósfera.

	<i>Muestra</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Unidad</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
1	C241	123	ng/μl	1.8	1.41
2	C242	163	ng/μl	1.87	1.85
3	C243	59.7	ng/μl	1.8	0.21
4	C71	60	ng/μl	1.86	0.65
5	C72	115	ng/μl	1.85	1.18
6	C73	102	ng/μl	1.88	0.55
7	C211	157	ng/μl	1.89	0.39
8	C212	161	ng/μl	1.87	0.87
9	C213	285	ng/μl	1.59	0.21
10	T01	32.4	ng/μl	1.87	0.5
11	M241	56.9	ng/μl	1.92	0.11
12	M242	79.5	ng/μl	1.9	0.28
13	M243	61	ng/μl	1.84	1.41
14	M71	105	ng/μl	1.83	1.34
15	M72	105	ng/μl	1.85	0.94
16	M73	186	ng/μl	1.88	0.43
17	M211	94.8	ng/μl	1.90	0.22
18	M212	96.7	ng/μl	1.87	0.59
19	M213	145	ng/μl	1.77	0.93
20	T02	45	ng/μl	1.88	0.73

21	V241	102	ng/μl	1.87	0.26
22	V242	66	ng/μl	1.88	0.19
23	V243	101	ng/μl	1.82	0.84
24	V71	140	ng/μl	1.89	0.16
25	V72	11	ng/μl	2.27	0.40
26	V73	10	ng/μl	1.85	0.94
27	V211	69.3	ng/μl	1.86	0.38
28	V212	145	ng/μl	1.87	0.72
29	V213	54	ng/μl	1.74	0.57
30	T03	43	ng/μl	1.7	0.57
31	R241	75	ng/μl	1.84	1.64
32	R242	74	ng/μl	1.88	1.83
33	R243	120	ng/μl	1.9	2.11
34	R71	29	ng/μl	1.89	0.5
35	R72	34	ng/μl	1.86	1.7
36	R73	15.6	ng/μl	1.95	0.96
37	R211	117	ng/μl	1.87	0.85
38	R212	106	ng/μl	1.87	1.118
39	R213	86	ng/μl	1.87	0.51

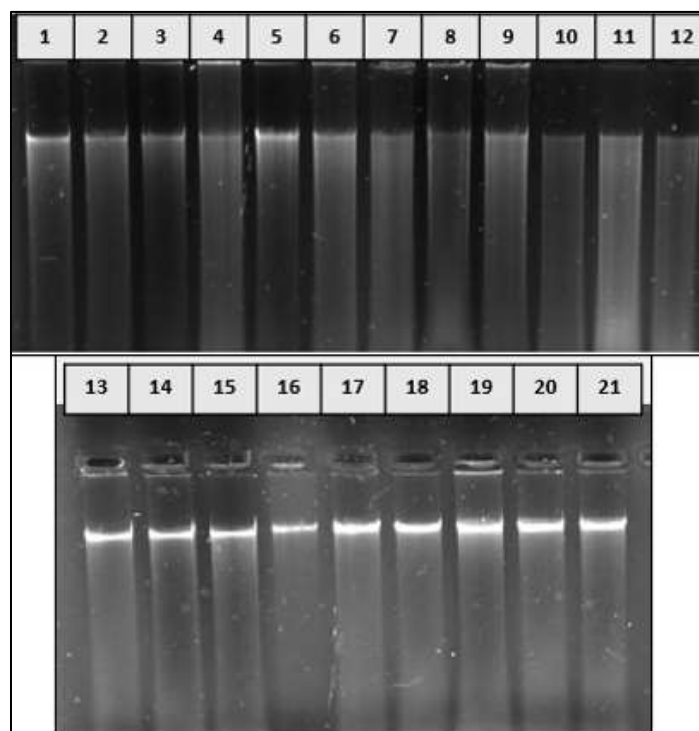


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de rizósfera para muestras control, mock y PepGMV (Tabla 5). Se observa la banda representativa del ADN genómico en la parte superior de cada carril.

7.4 Análisis de la expresión de genes mediante qPCR

Para el análisis de la expresión se utilizaron genes relacionados con distintas respuestas de defensa en las plantas. Para la ruta de ácido salicílico se eligieron los genes PR1, PR2, NPR1 y ISR1. Para la ruta de etileno los genes ACS6 y EIN2, para jasmonato se eligió COL1 y OPR3. Para la expresión de genes involucrados con el silenciamiento génico se eligieron los genes AGO, DCLs1, DCLs2, DCLs3 y DCLs4. Por último, para la expresión de genes involucrados en distintas rutas relacionadas con la defensa en plantas se eligieron los genes PDF1 y MYB4L.

La cuantificación de expresión de genes mostró que solo uno de los genes seleccionados para la ruta de ácido salicílico (ISR1) se expresó durante los tiempos elegidos (Fig. 7), teniendo una expresión relativa significativamente menor la muestra infectada con el PepGMV que con respecto a los controles a los 7 dpi. En el caso de las plantas inoculadas con Rep, se observó la expresión de este gen en los 3 tiempos, teniendo diferencia significativa con todos los tratamientos. De igual manera, para la ruta del etileno solo se mostró la expresión de uno de los dos genes elegidos (EIN2), el cual mostró un incremento significativo en su expresión para las muestras de PepGMV respecto a los controles a 1 dpi (Fig. 8), mientras en las muestras con Rep se observó una sobreexpresión a los 7 dpi. Los dos genes relacionados a la ruta del jasmonato (OPR3 y COI) se expresaron en las muestras obtenidas, el gen COI mostró diferencia significativa respecto al Mock en PepGMV, sobre expresándose a 1dpi y disminuyendo la expresión a los 7dpi. En Rep, aumentó su expresión a 1 dpi y 21 dpi (Fig. 9). El gen OPR3 mostró diferencia significativa en la expresión, la cual disminuyó tanto en PepGMV como en Rep a 1dpi (Fig. 9) y a los 21dpi en Rep.

Se analizaron 5 genes relacionados al silenciamiento génico. El gen AGO1 mostró aumento significativo en Rep para todos los tiempos de muestreo (Fig. 10a), sin embargo, no se observaron diferencias significativas para las muestras infectadas con PepGMV. De igual manera, el segundo gen analizado, DCL1, mostró diferencia significativa para todos los tiempos de muestreo en Rep, sobre expresándose a 1dpi y 7dpi y disminuyendo su expresión respecto al control a 21dpi, mientras que en PepGMV solo se observó aumento significativo a 1dpi (Fig. 10b). El gen DCL2 presentó diferencia significativa a los 7dpi tanto para Rep como para PepGMV, mientras que a los 21dpi solo se observó sobre expresión en las muestras de Rep (Fig.

10c). DCL3 mostró sobre expresión en PepGMV a 1dpi, pero su expresión a los 7 y 21 dpi se mantuvo similar al control, contrario a Rep en donde a 1dpi no mostró diferencias respecto a los controles, pero aumentó su expresión a los 7 y 21dpi (Fig. 10d). El gen DCL4 por otra parte no mostró diferencias significativas para ninguno de los tratamientos en los 3 tiempos de muestreo (Fig. 10e). Estos resultados indican que ciertos genes involucrados en el silenciamiento génico se activan de manera temprana durante la infección con PepGMV, mientras que la mayoría de los genes aquí analizados se activan en todos los tiempos con la inoculación de Rep.

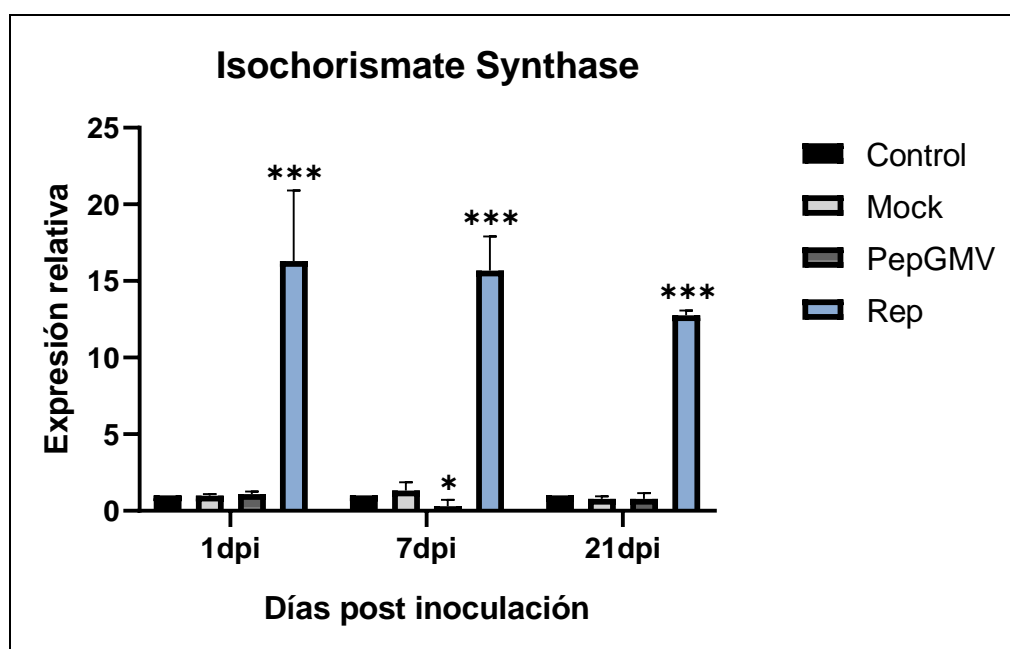


Figura 7. Expresión relativa del gen Isochorismate Synthase relacionados al ácido salicílico. Se observó diferencia significativa a los 7 dpi en PepGMV y en los 3 tiempos con la secuencia de Rep.

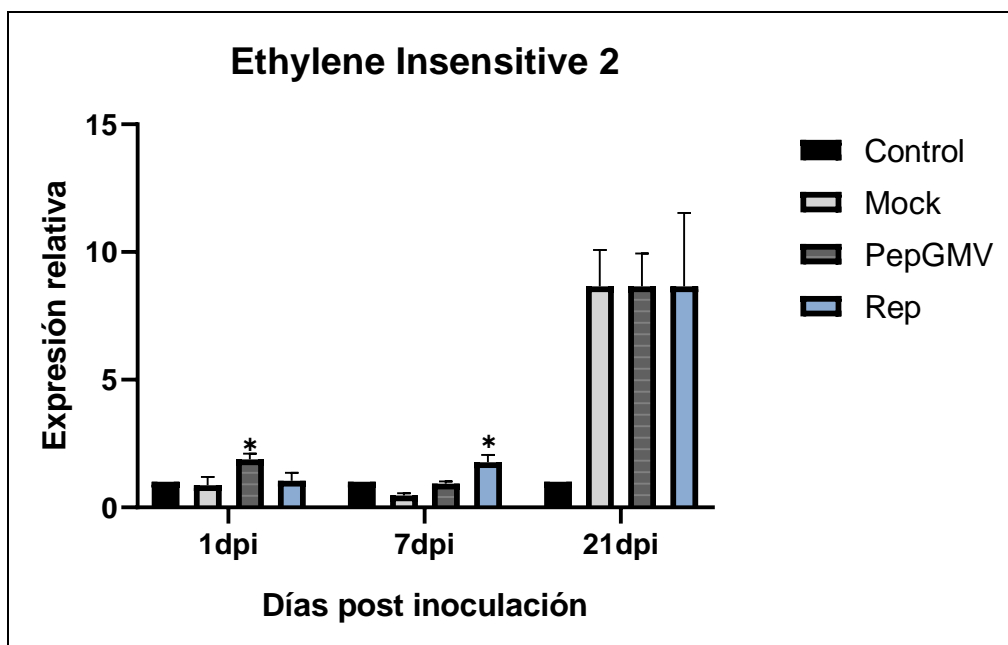


Figura 8. Expresión relativa del gen Ethylene Insensitive 2, relacionados al etileno. Se observó diferencia significativa a 1 dpi para PepGMV y a los 7dpi con Rep.

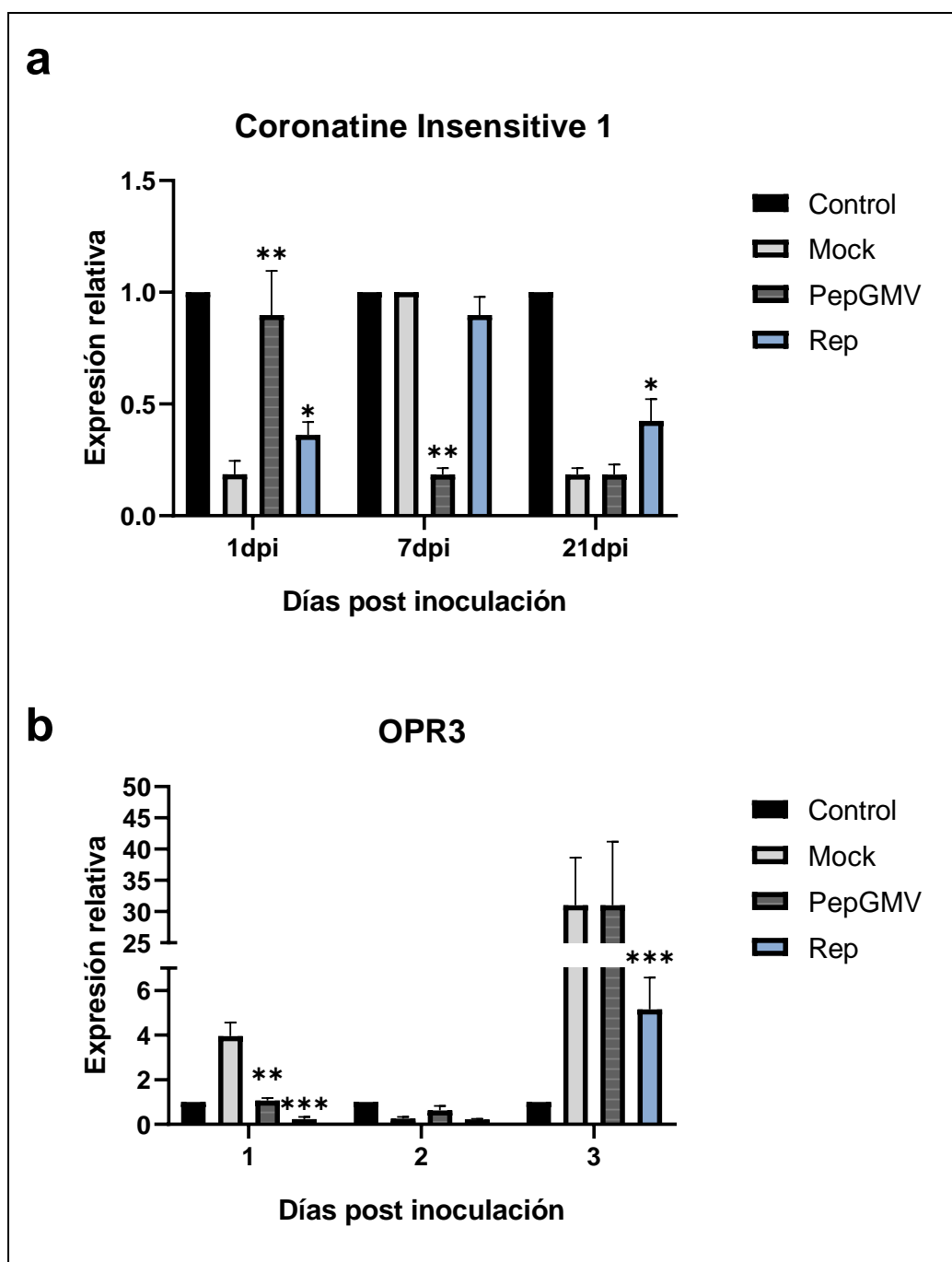


Figura 9. Expresión relativa de genes relacionados al jasmonato. A) COI: Se observaron diferencias significativas a 1 dpi y a los 7 dpi en las plantas inoculadas con PepGMV y a los 21dpi en las plantas inoculadas con Rep. B) Gen OPR3: no se observaron diferencias significativas.

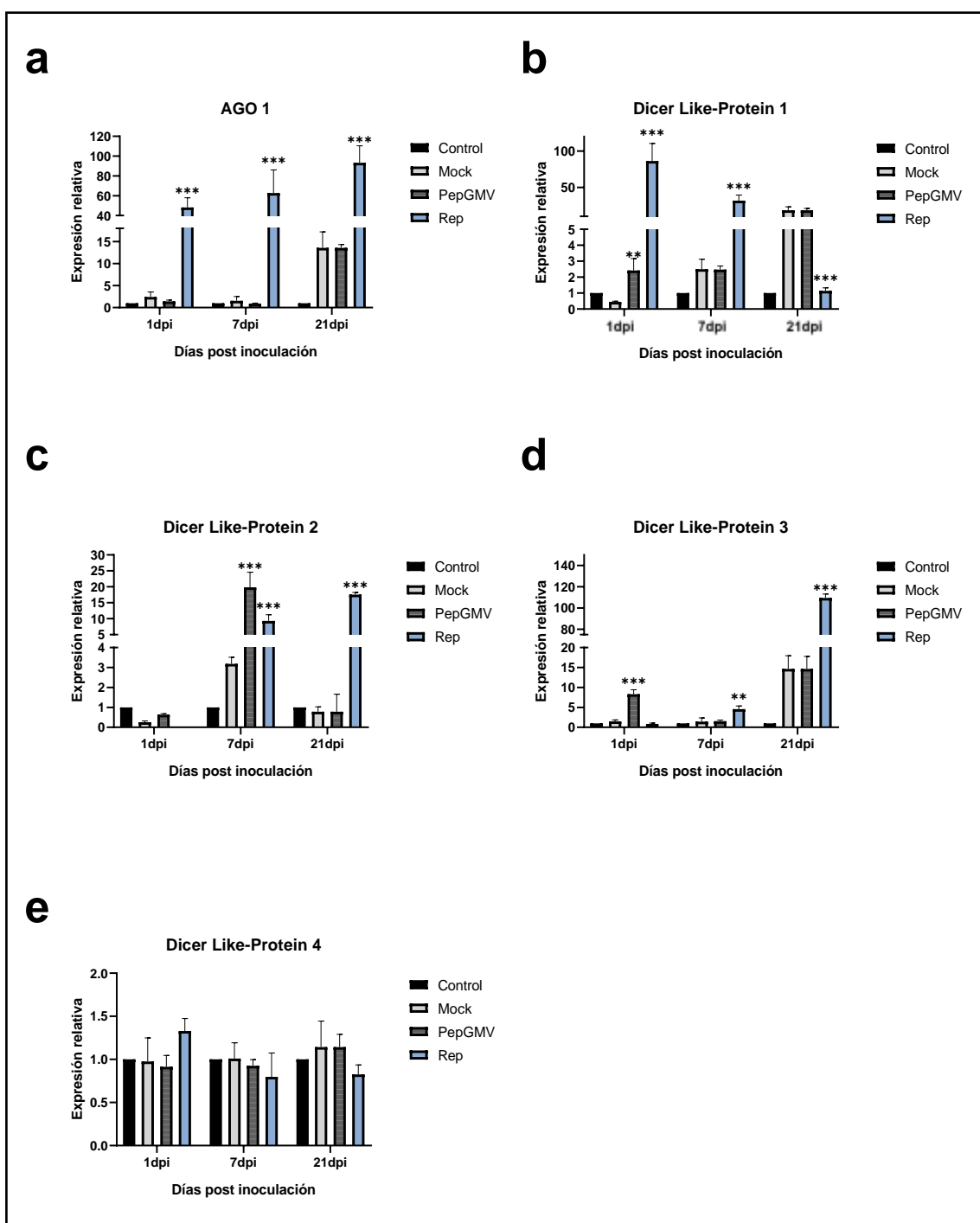


Figura 10. Expresión relativa de genes relacionados al silenciamiento génico. A) AGO1 se observa diferencia significativa en los 3 tiempos para las plantas inoculadas con Rep. B) DCL1: Se observa un incremento significativo en su expresión a 1 dpi en las muestras con PepGMV. En las muestras de Rep se observa un incremento significativo a los 1 y 7 dpi mientras que a los 21 dpi hay una disminución de la expresión. C) DCL2: Se observó diferencia significativa a los 7 dpi en PepGMV y en Rep. D) DCL3: Se observó diferencia significativa a 1 dpi en PepGMV y en Rep a los 1 y 7dpi. E) DCL4: No se observaron diferencias significativas.

7.5 Cuantificación absoluta de comunidades microbianas

La abundancia de las comunidades microbianas se realizó a través de cuantificación absoluta por qPCR. Se realizaron 3 curvas de cuantificación utilizando concentraciones conocidas de cada gen para cuantificar bacterias, archeas y fungi (Fig. 11). Una vez obtenidas las curvas, se realizó el qPCR con las muestras de ADN de rizósfera y endofíticas de raíz para los tiempos de 1, 7 y 21 días post inoculación con el fin de observar la diferencia en la abundancia entre poblaciones en relación con el tiempo y a los tratamientos.

Los resultados obtenidos para las bacterias endofíticas muestran un aumento en la abundancia de la población a partir del primer día y en el día 21 para las plantas Rep respecto al mock, y una disminución de las plantas infectadas con PepGMV al día 1 y 7 dpi (Fig. 12). Por otra parte, las archeas endofíticas mostraron una disminución significativa a 1 día post inoculación en las plantas infectadas, y un incremento en la abundancia en Rep a los 1 y 7 dpi (Fig. 13). Así mismo, en la población de organismos fungi se observó una disminución drástica en la población para las plantas infectadas respecto al mock a 1 y 7 dpi, mientras a los 21 días ambas poblaciones mostraron no tener diferencias significativas (Fig. 14). Por último, las muestras inoculadas con Rep, mostraron tener una disminución a los 7 dpi y una abundancia relativa mayor a los 21 dpi. Esto indicaría que la presencia del PepGMV provoca una disminución en la población de microorganismos presentes dentro de las raíces durante los primeros días como efecto de la enfermedad, mientras el tratamiento con Rep al parecer es capaz de reclutar mayor cantidad de microorganismos endofíticos, principalmente bacterias y arqueas.

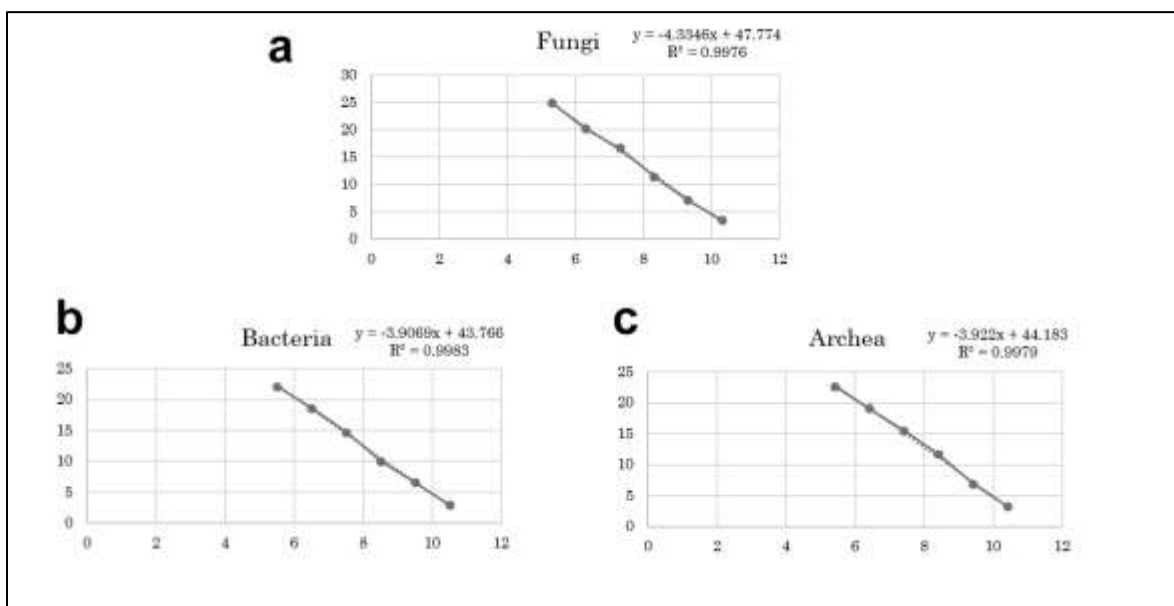


Figura 11. Curvas de cuantificación de número de copias contra Ct para bacteria, archea y fungi.

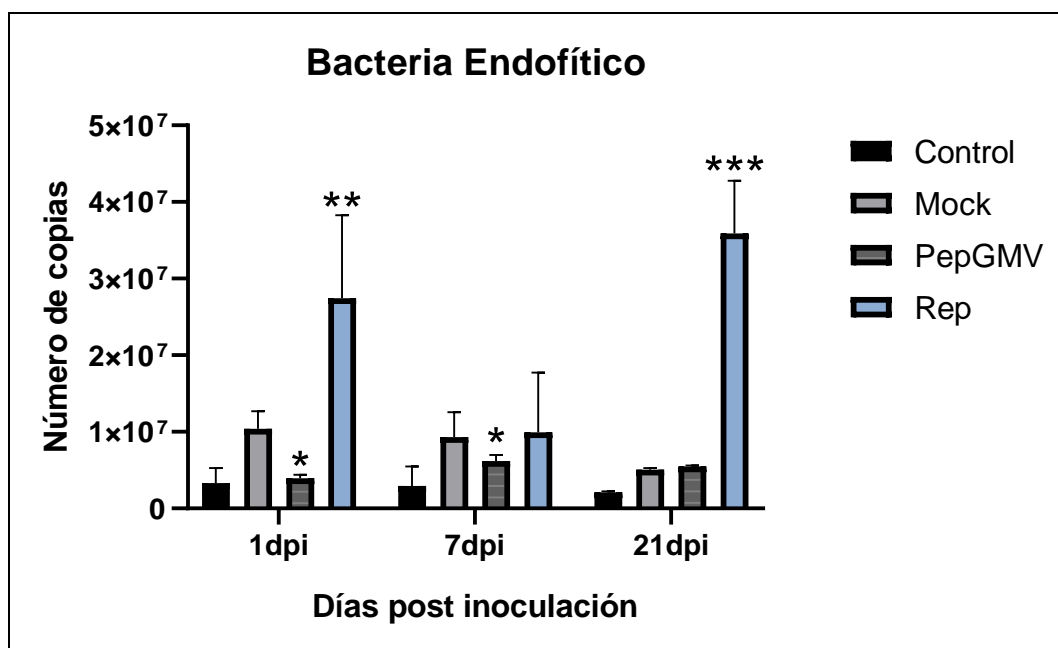


Figura 12. Gráficas de comparación de abundancia para bacterias endofíticas en muestras de raíz a partir del gen 16S de ARN.

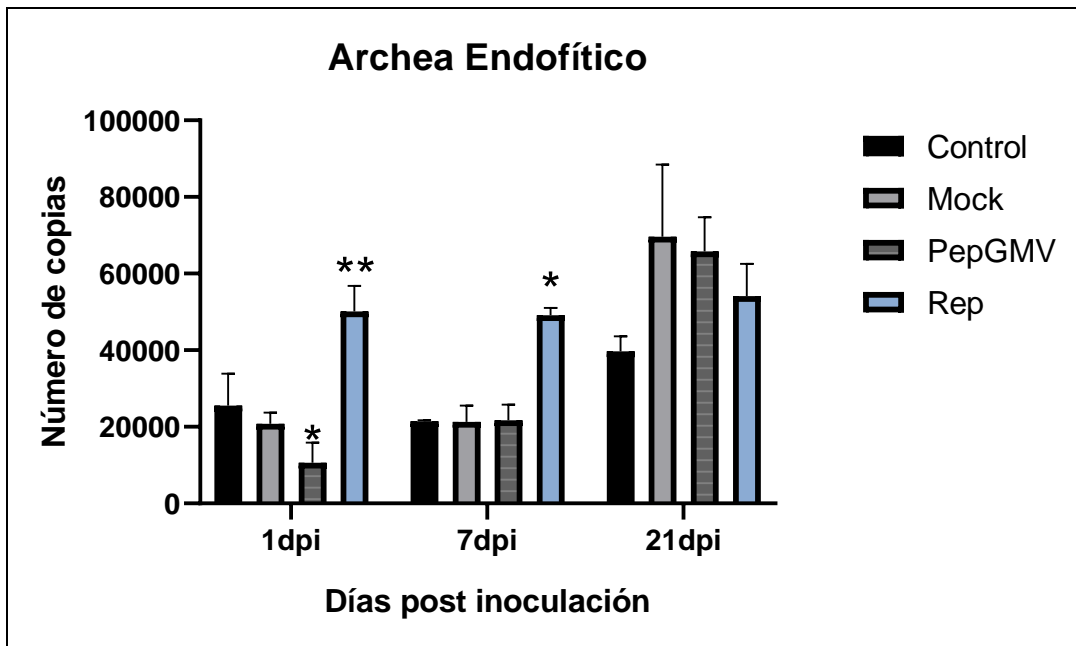


Figura 13. Gráficas de comparación de abundancia para archeas endofíticas en muestras de raíz a partir del gen 16S de ARN.

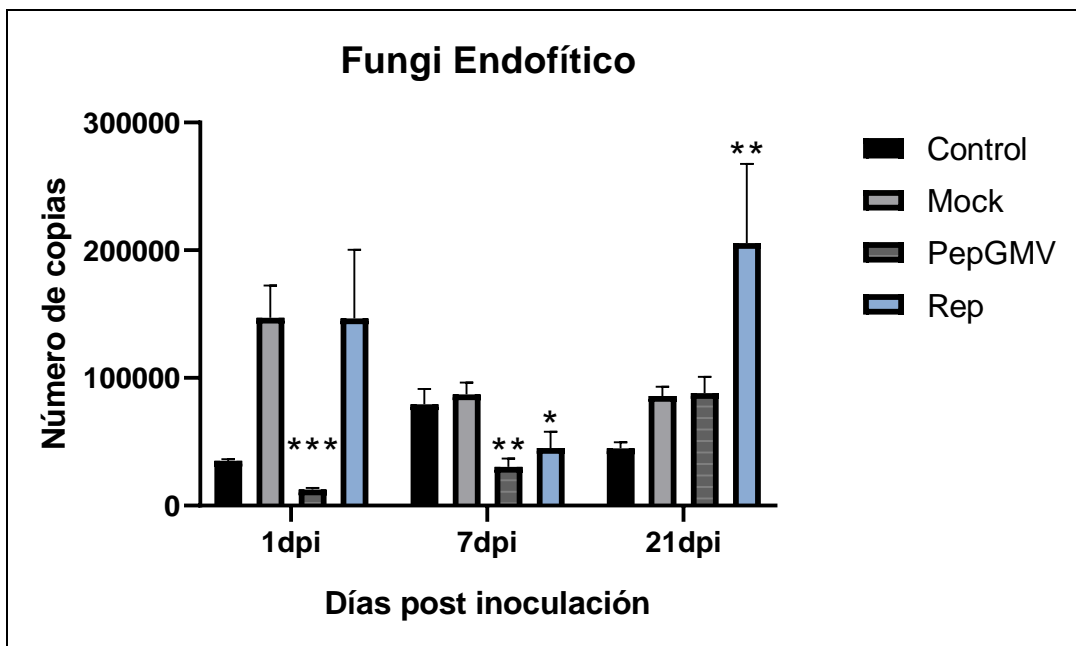


Figura 14. Gráficas de comparación de abundancia para organismos fungi endofíticos en muestras de raíz a partir de la región ITS.

Para las bacterias presentes en la rizósfera, la cuantificación absoluta mostró un incremento significativo en la abundancia de las muestras infectadas a 1 y 7 días post inoculación, sin embargo, a los 21 dpi se observó una disminución con respecto al mock (Fig. 15). Las muestras de Rep presentaron una disminución en todos los tiempos. Las arqueas de la rizósfera no mostraron diferencia significativa hasta los 7 dpi en donde las plantas infectadas aumentaron significativamente comparadas con el mock, igual que a los 21 dpi (Fig. 16). Las muestras de Rep por el contrario mostraron menor abundancia en la rizósfera. De manera contraria a las muestras endofíticas, los organismos fungi presentes en la rizósfera demostraron incrementar significativamente en las plantas infectadas con PepGMV y Rep a 1 y 7 días dpi, mientras a los 21 días la abundancia fué mayor solamente para las muestras con Rep (Fig. 17).

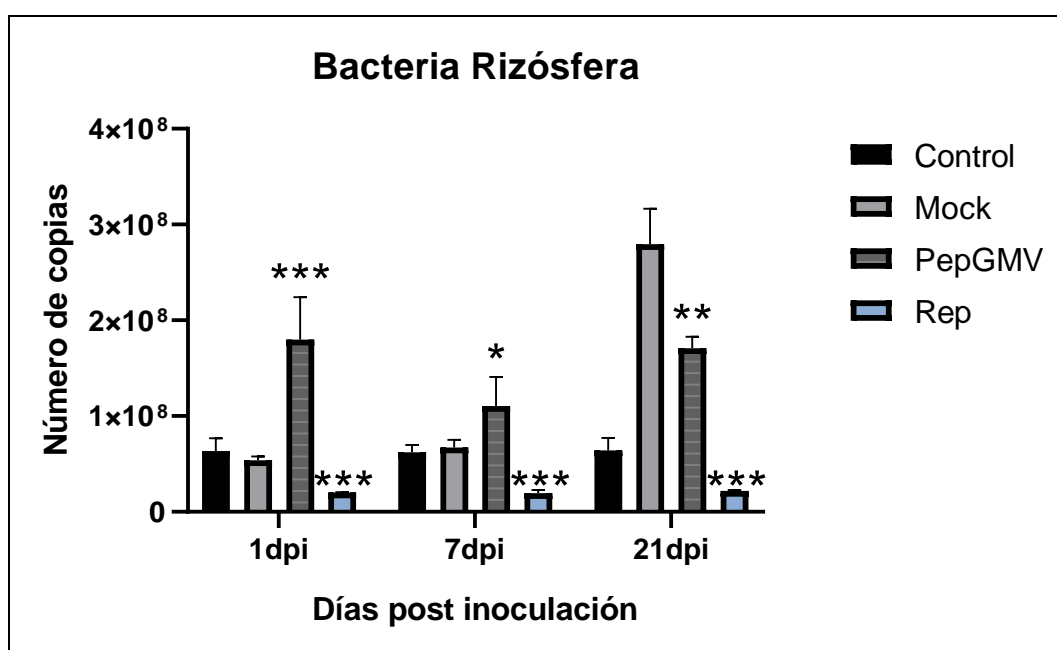


Figura 15. Gráficas de comparación de abundancia para bacterias en muestras de rizósfera a partir del gen 16S de ARN.

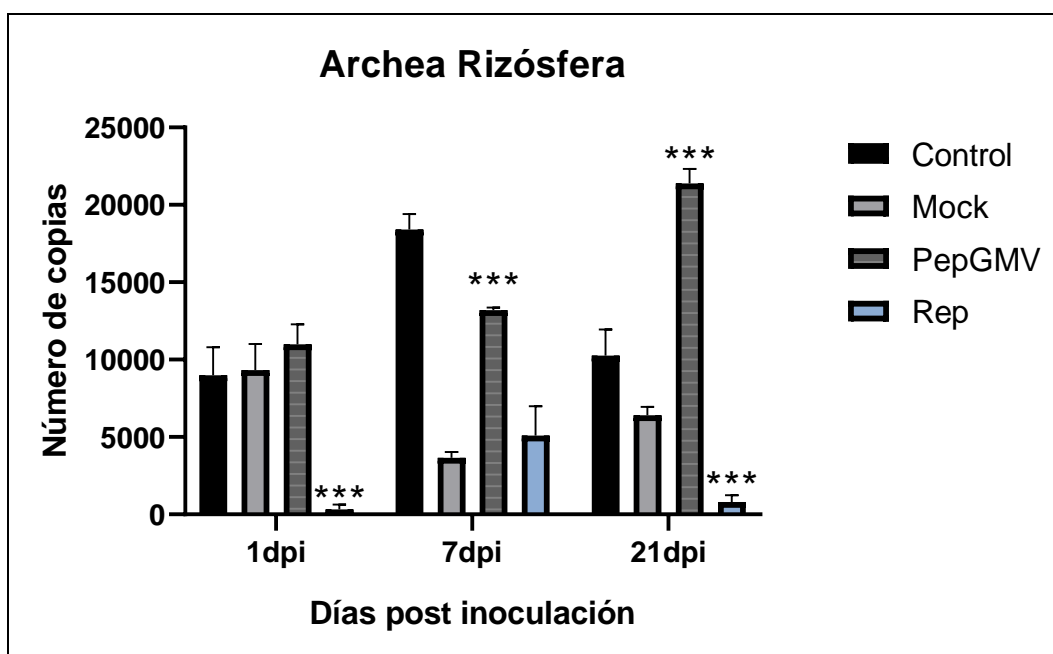


Figura 16. Gráficas de comparación de abundancia para archeas en muestras de rizósfera a partir del gen 16S de ARN.

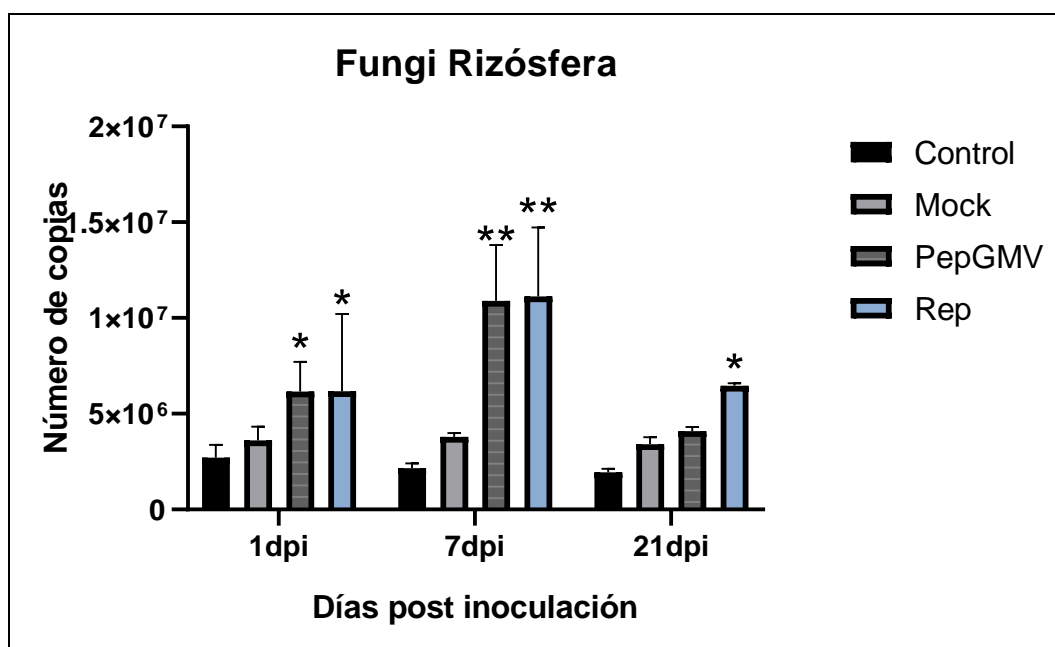


Figura 17. Gráficas de comparación de abundancia para organismos fungi en muestras de raíz a partir de la región ITS.

7.6 Secuenciación de nueva generación

Se secuenciaron 51 muestras y se obtuvieron un total de 2,421,164 secuencias pareadas en formato fastq, en promedio 62,081 secuencias pareadas por muestra (Máx. 326,736 Mín. 8,894) con una calidad promedio de Q 32.2. Del total de secuencias, 79 % fueron iguales o mayores a 149 bases.

7.6.1 Composición de comunidades microbianas asociadas a *N. benthamiana* durante la infección con Pepper Golden Mosaic Virus

Se analizaron las secuencias obtenidas a partir de la secuenciación de nueva generación utilizando el programa bioinformático MG-RAST. En los primeros resultados se encontró que, para las muestras de bacterias endofíticas, a los 7 días de tratamiento, la composición bacteriana de las muestras infectadas con el PepGMV estaba en su mayoría compuesta por el filo *Firmicutes* (77.6%), mientras en las muestras control y el mock tenía predominancia el filo *Proteobacterias* (23.3%), seguido de los *Firmicutes* (17.2%), *Bacteroidetes* (13.21%) y *Actinobacterias* (12.11%) y en las muestras Rep destacaron los filios *Fusobacteria* (36%), *Proteobacteria* (11%) y *Firmicutes* (9%) (Fig. 18a). La clase más abundante en las muestras infectadas fue *Bacilli* (72.63%), mientras que en las muestras control y mock se observaron en su mayoría *Alphaproteobacteria* (12% y 14.8%), y *Bacilli* (10.2% y 23%); En Rep se observó *Fusobacteria* (36%) como la clase con mayor abundancia (Fig. 18b). La familia más abundante en las muestras infectadas fue *Lactobacillaceae* (67%), en las muestras control y mock se encontraban las familias *Cytophagaceae* (5.3%), y *Mycobacteriaceae* (5.9%) mientras que en Rep fue la familia *Fusobacteriaceae* (35.8%) (Fig. 18c).

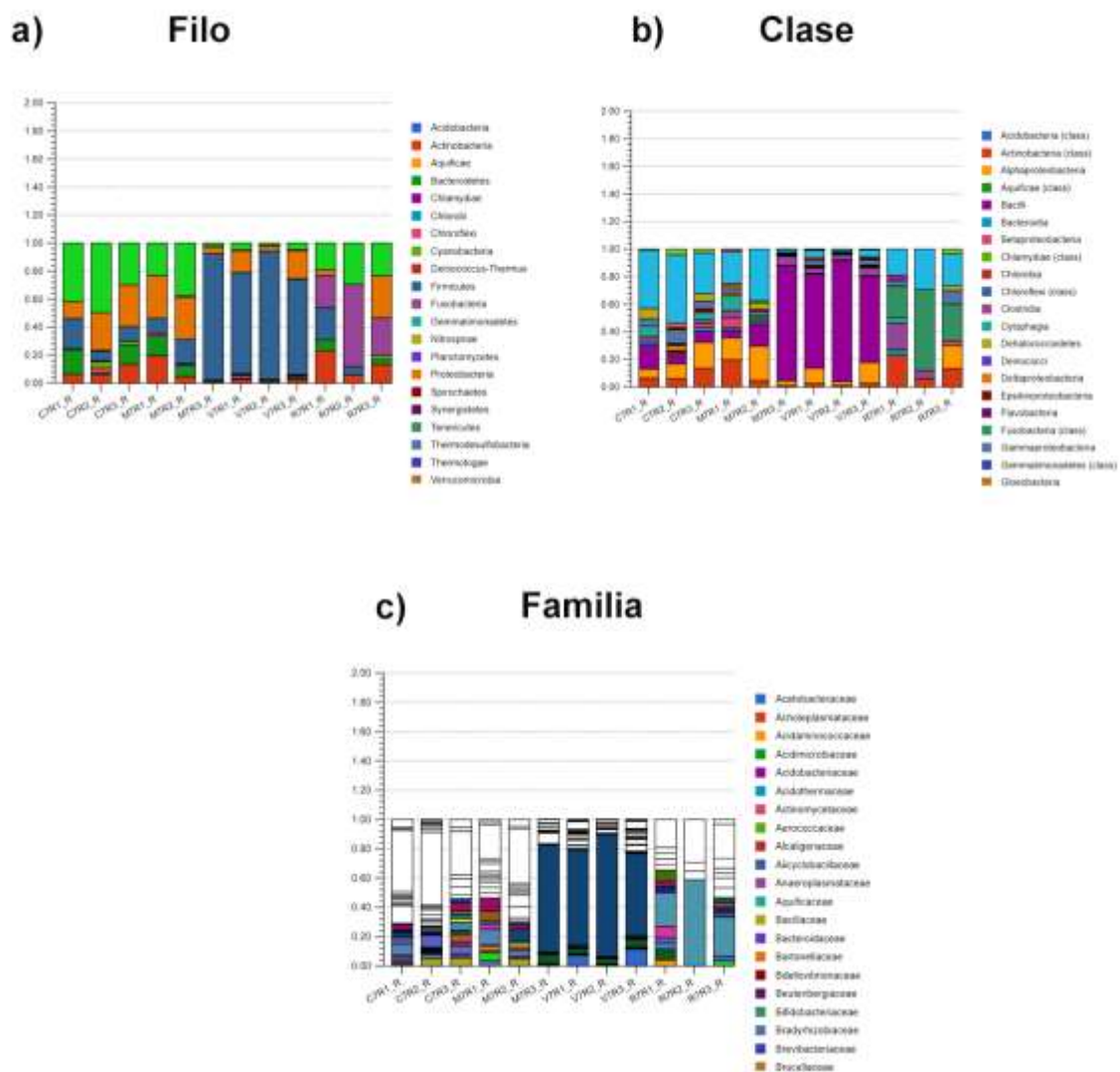


Figura 18. Perfil bacteriano de muestras endofíticas de raíz de *N. benthamiana* a los 7 días después de la inoculación. Se muestran los filos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C7R: Control 7dpi; M7R: Mock 7dpi; V7R: Virus 7dpi; R7R: Rep 7dpi.

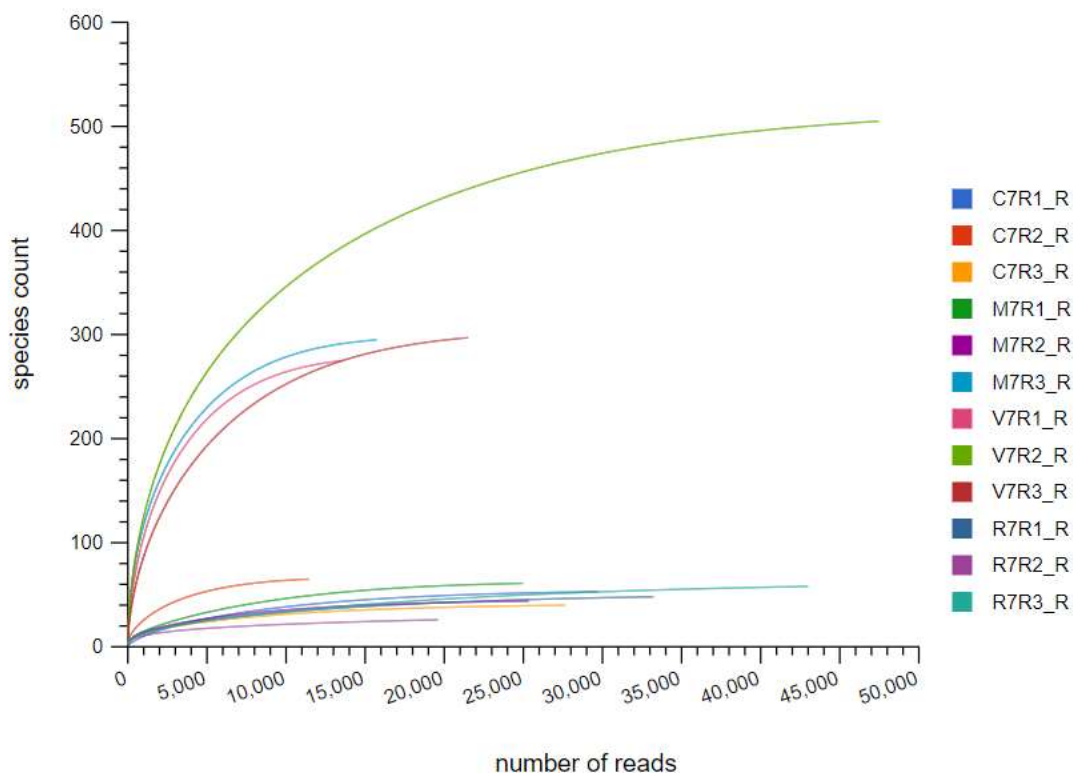


Figura 19. Curva de refacción de abundancia de especies y número de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C7R: Control 7dpi; M7R: Mock 7dpi; V7R: Virus 7dpi, R7R: Rep 7dpi.

Para las muestras de bacterias endofíticas a los 21 días de tratamiento, la composición bacteriana de las muestras tanto infectadas con el PepGMV como las muestras control y mock estaban en su mayoría compuesta por el filo *Firmicutes* (31.6%), seguido del filo *Proteobacteria* (22.58%) y *Actinobacteria* (5.55%) (Fig. 20a), mientras que para Rep la mayor composición fue de *Fusobacteria* (14%), *Proteobacteria* (14%) y *Actinobacterias* (9%). Las clases más abundantes en las muestras tanto infectadas como los controles fueron *Bacilli* (26.15%), *Alphaproteobacteria* (11.65%) y *Actinobacteria* (10.38%). Por otra parte, para la clase de las muestras Rep se destacaron *Fusobacteria* (26%) y *Actinobacteria* (16.6%) (Fig. 20b). Las muestras de Rep mostraron *Fusobacteriaceae* (14%) como la familia más abundante, en cambio para las muestras control, mock y PepGMV fue *Lactobacillaceae* con 35%, 10% y 11.1% respectivamente para cada una (Fig. 20c).

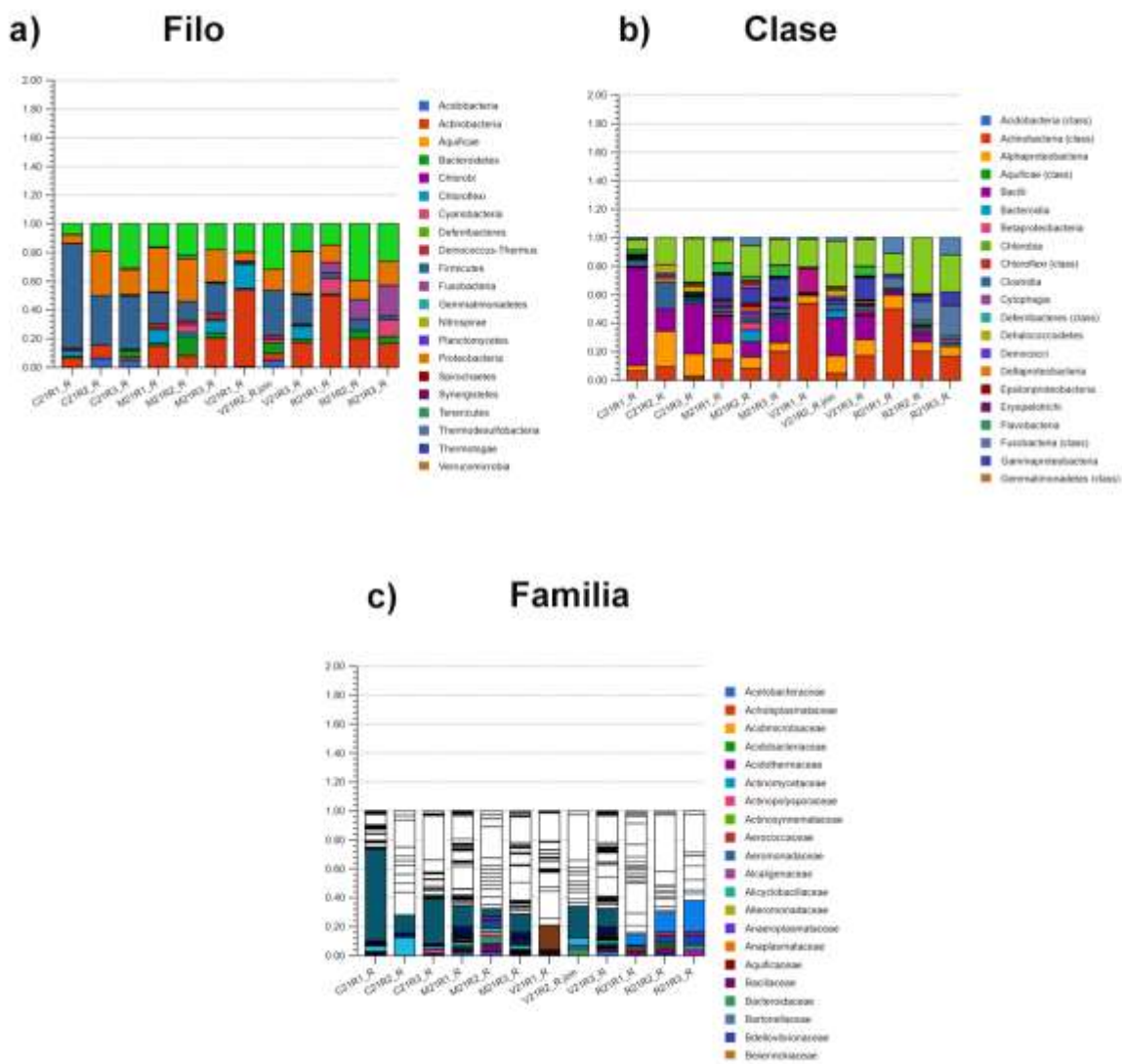


Figura 20. Perfil bacteriano de muestras endofíticas de raíz de *N. benthamiana* a los 21 días después de la inoculación. Se muestran los fillos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C21R: Control 21dpi; M21R: Mock 21dpi; V21R: Virus 21dpi; R21R; Rep 21dpi.

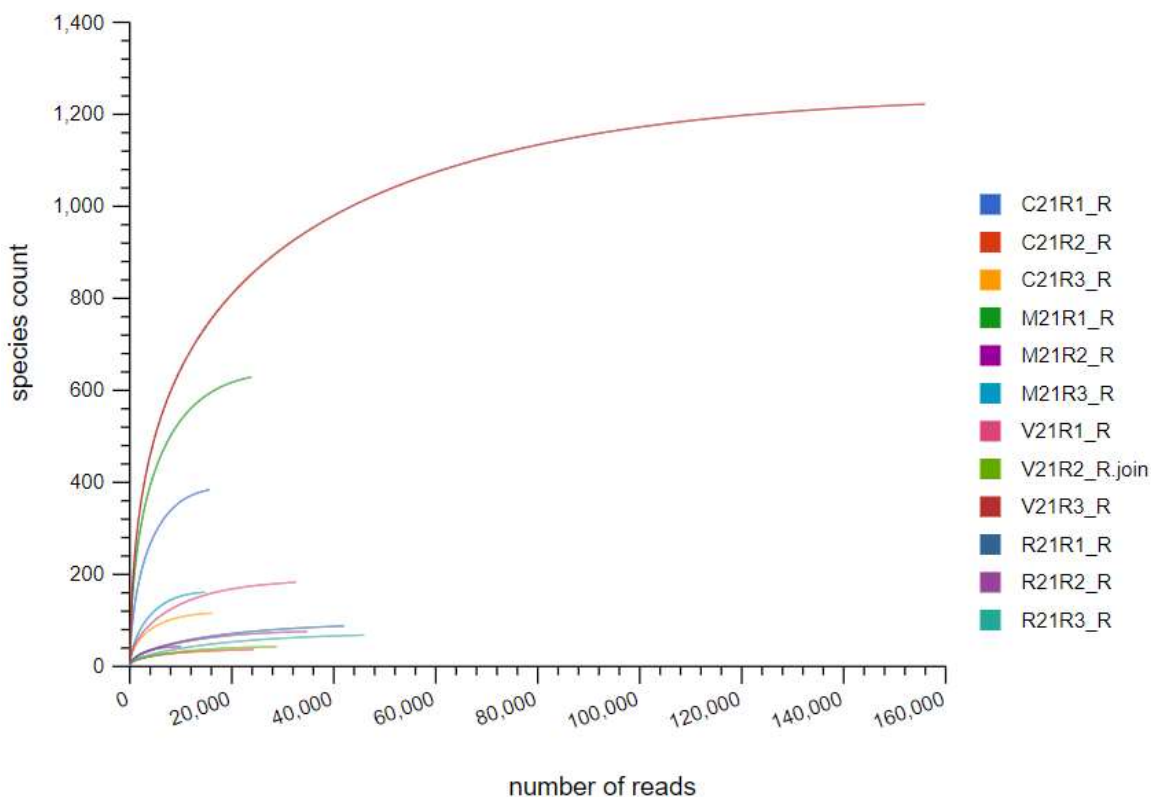


Figura. 21. Curva de refacción de abundancia de especies y número de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C21R: Control 21dpi; M21R: Mock 21dpi; V21R: Virus 21dpi; R21R: Rep 21dpi.

El perfil taxonómico de las bacterias de la rizósfera a los 7 días de tratamiento mostró que tanto muestras infectadas, así como muestras de sustrato, compartieron una composición bacteriana similar, mayormente compuesta por el filo *Firmicutes* (57.7%) y *Proteobacteria* (13.8%), mientras en las muestras control y mock existe una predominancia del filo *Proteobacteria* (22.15%) y *Actinobacteria* (19.57%), seguido de *Firmicutes* (17.1%) (Fig. 22a). En Rep se observó un mayor porcentaje de *Actinobacteria* (39%) seguido de *Proteobacterias* (21.1%) (Fig. 22a). La clase más abundante en las muestras infectadas y sustrato fue *Bacilli* (55.8%), seguido de *Alphaproteobacteria* (12%). Por otra parte, en las muestras control y mock se observaron *Alphaproteobacteria* (13%), *Bacilli* (11.7%) y *Actinobacteria* (22%). En Rep fueron *Actinobacteria* (39%) y *Alphaproteobacterias* (15%) (Fig. 22-b). La familia más abundante en las muestras infectadas, y sustrato fue *Lactobacillaceae* (52.61%), al igual que en las muestras de Rep donde *Lactobacillaceae* predominó (30%), por otra parte, en las muestras control y mock se encontró

una gran variedad de familias, en donde *Lactobacillaceae* tuvo el mayor porcentaje (5.5%) pero menor al encontrado en los otros tratamientos (Fig. 22-c).

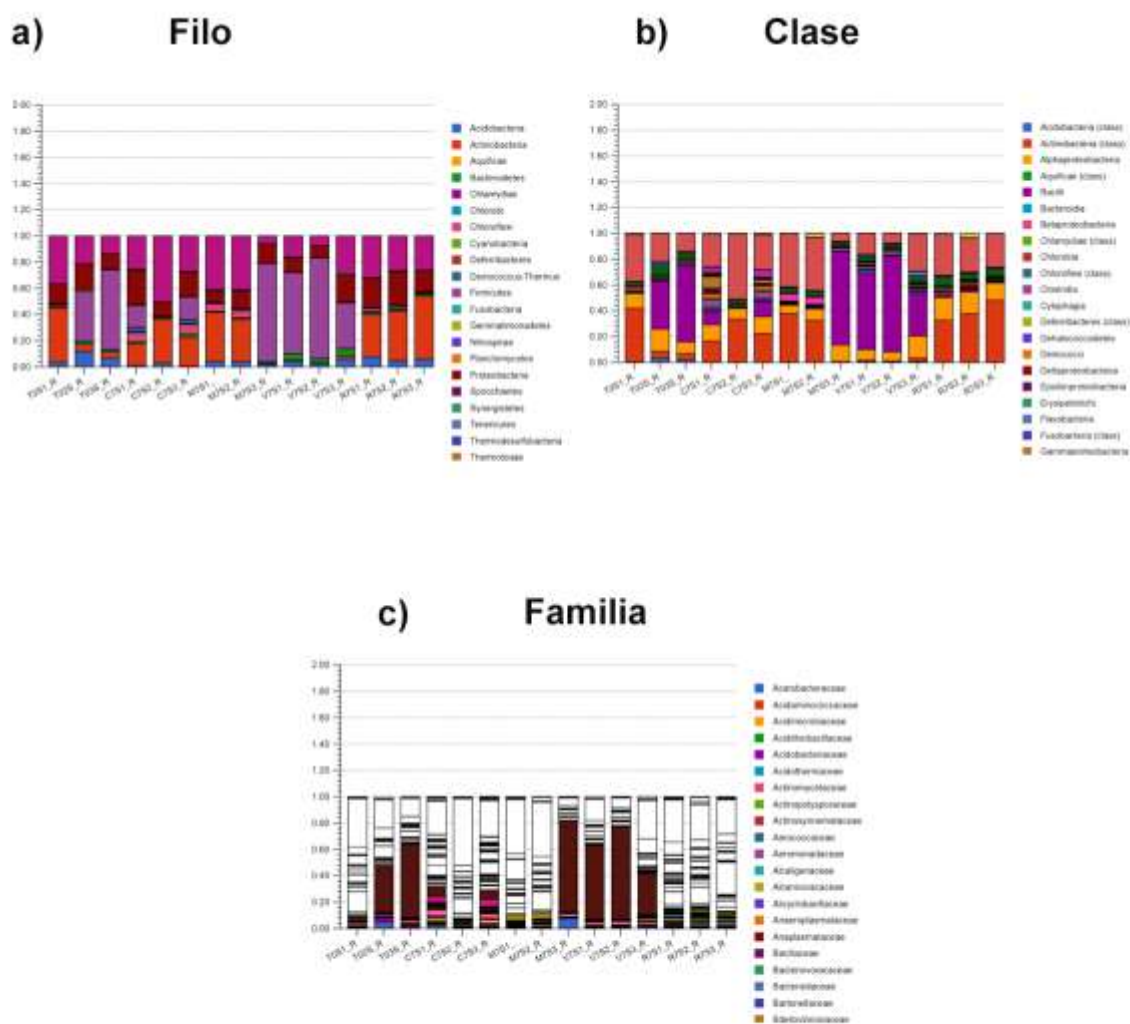


Figura. 22. Perfil bacteriano de muestras de rizósfera de *N. benthamiana* a los 7 días después de la inoculación. Se muestran los fillos (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C7S: Control 7dpi; M7S: Mock 7dpi; V7S: Virus 7dpi; R7S: Rep 7dpi. T0: Muestra de sustrato.

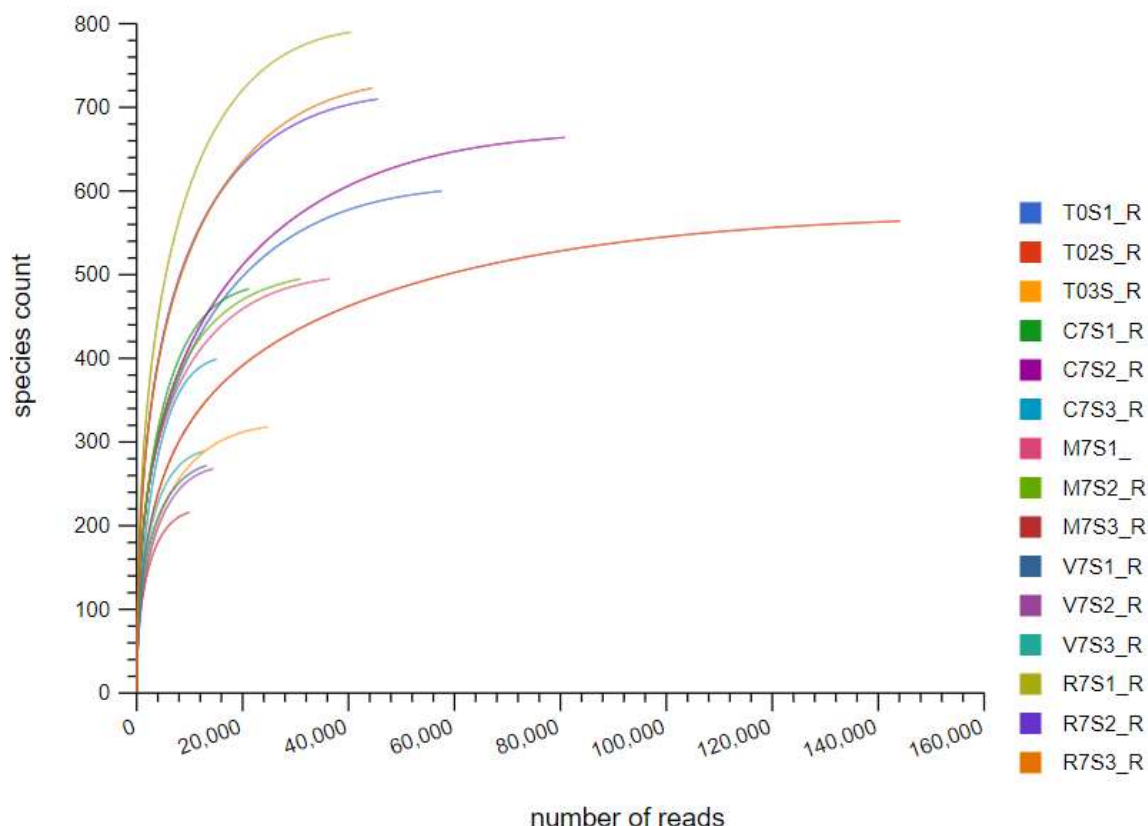


Figura 23. Curva de refacción de abundancia de especies y número de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C7S: Control 7dpi; M7S: Mock 7dpi; V7S: Virus 7dpi, R7S: Rep 7dpi; T0: Sustrato al tiempo 0.

A los 21 días de tratamiento, la composición bacteriana de las muestras de rizósfera infectadas con el PepGMV mostró un mayor porcentaje de *Firmicutes* (72%) similar a las muestras sustrato (33%) y control (48.3%). Por otra parte, el perfil bacteriano de las plantas inoculadas con Rep fue similar al Mock, teniendo mayor cantidad de lecturas en el filo *Actinobacteria* (17% y 19% respectivamente), seguido de *Proteobacterias* (15% Rep y 22% mock) (Fig. 21a). Las bacterias de las plantas infectadas y el sustrato mostraron estar compuestas casi en su totalidad por el filo *Firmicutes* (63.3%), seguido del filo *Proteobacteria* en menor medida (10.1%), mientras que el control y mock presentaron *Firmicutes* (21.93%) y *Proteobacterias* (21.6%) en similares proporciones (Fig. 21a). La clase *Bacilli* destacó como la más abundante en las muestras PepGMV (69%), sustrato (32%) y control (46%). Por otra parte, en las muestras de Rep se observaron las clases *Actinobacteria* (50%) y *Alphaproteobacteria* (9%), mientras el mock donde

la más abundante fue *Alphaproteobacteria* (19%) seguido de *Actinobacteria* (14%) (Fig. 21b). Por último, la familia *Lactobacillaceae* fue más abundantes en las muestras de PepGMV (65%), sustrato (30%) y control (42%), mientras que en Rep fue *Mycobacteriaceae* (14%) y en Mock *Pseudomonadaceae* (5%) (Fig. 21c).

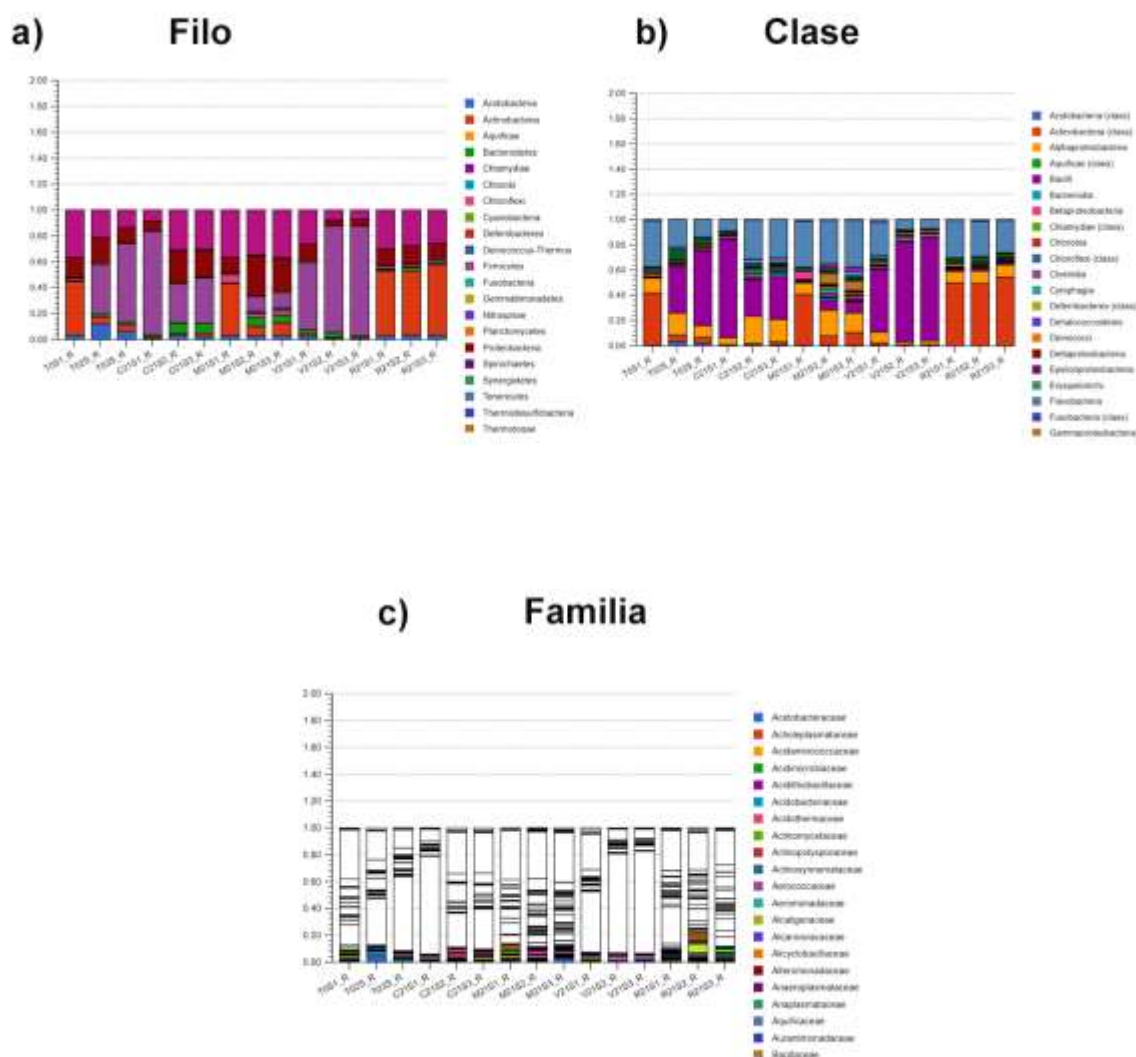


Figura 24. Perfil bacteriano de muestras de rizósfera de *N. benthamiana* a los 21 días después de la inoculación. Se muestran los filios (a), clases (b) y familias (c) dominantes presentes en cada muestra. C21S: Control 21dpi; M21S: Mock 21dpi; V21S: Virus 21dpi; R21S: Rep 21dpi; T0: Muestra de sustrato.

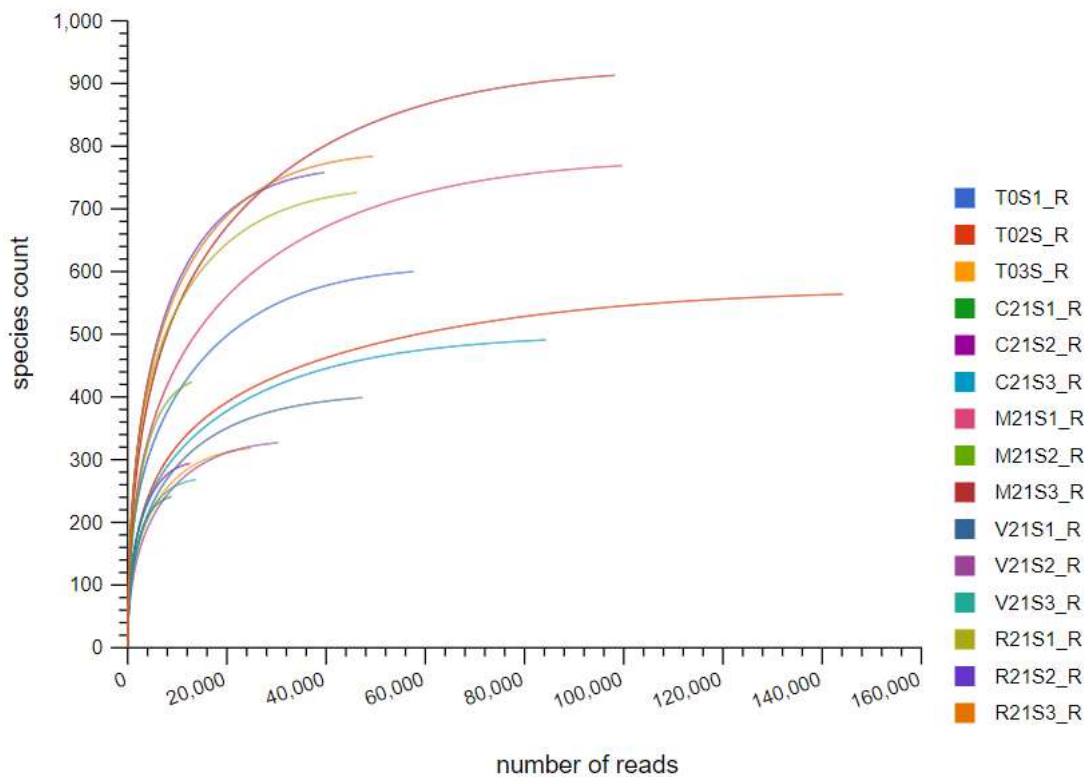


Figura 25. Curva de refacción de abundancia de especies y numero de lecturas. Se muestran los datos de cada muestra. C21S: Control 21dpi; M21S: Mock 21dpi; V21S: Virus 21dpi; R21S: Rep 21dpi; T0: Sustrato al tiempo 0.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó a la proteína viral REP como inductora de la expresión de diferentes genes relacionados a la defensa en plantas, utilizando como modelo de estudio la planta *N. benthamiana* y la proteína REP del begomovirus *Pepper Golden Mosaic Virus*. Así mismo, se llevó a cabo la secuenciación por nueva generación basada en el gen 16S de ARN ribosomal para caracterizar el microbioma presente en la rizósfera y el compartimento endofítico de la raíz de las plantas y los cambios que ocurren en ella al estar presente el virus o inducir la expresión de la proteína REP. El objetivo de este trabajo fue comprobar si una proteína conservada y multifuncional de origen viral, como lo es la proteína de replicación Rep, es capaz de atenuar la enfermedad del Mosaico Dorado del Chile, causada por el PepGMV, inducir la expresión temprana y tardía de genes relacionados a la resistencia tanto inducida como adquirida y alterar la composición del microbioma de la rizósfera. Así mismo, si la presencia de un virus patógeno como el PepGMV es capaz de inducir genes relacionados con la defensa y alterar la conformación de la comunidad microbiana presente en la rizósfera de la planta.

A través de PCR en tiempo real se llevó a cabo el análisis de expresión de genes de defensa en plantas infectadas y la comparación de estos con la expresión de genes en plantas sin tratamiento. Para la ruta de ácido salicílico se eligieron los genes PR1, PR2, NPR1 y ICS1. Para la ruta de etileno los genes ACS6 y EIN2, para jasmonato se eligió COL1 y OPR3. Para la expresión de genes involucrados con el silenciamiento génico se eligieron los genes AGO1, DCLs1, DCLs2, DCLs3 y DCLs4. Por último, para la expresión de genes de distintas rutas relacionadas con la defensa en plantas se eligieron los genes PDF1 y MYB4L.

La resistencia sistémica inducida es independiente del ácido salicílico, pero necesita la señalización del jasmonato y el etileno. Ambas hormonas traducen los estímulos extracelulares y son potenciadas por microorganismos promotores de crecimiento vegetal, sin embargo, no involucran la síntesis de proteínas relacionadas con patogenicidad (Samaniego *et al.*, 2017). Ambas moléculas están relacionadas a la resistencia sistémica inducida, principalmente activada por bacterias (principalmente *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*) u hongos no patogénicos (como *Trichoderma spp.*) que se encuentran en la rizósfera. Estas señales están relacionadas con la expresión de genes como NPR1, con el aumento de los niveles de Aba en raíces (lo que

provoca fortalecimiento en hojas para la restricción de patógenos foliares) y en factores de transcripción como el MYC2 y MYB72 (Vlot *et al.*, 2020). En los resultados de PCR en tiempo real para las muestras infectadas, control y mock no se observaron cambios importantes en los genes relacionados a estas rutas. En la Figura 8 y la Figura 9 se observa que, a pesar de tener cierta diferencia significativa en algunos tiempos del experimento, tanto el tratamiento con virus como el mock mostraron la misma tendencia en la expresión de estos genes. El ácido salicílico está relacionado con la resistencia sistémica adquirida, mecanismo de defensa que se activa por la exposición de la planta con organismos patógenos. En los genes analizados para el ácido salicílico, solo el gen ICS1, el cual está relacionado a la síntesis de esta molécula, tuvo expresión para el tratamiento con Rep, en todos los tiempos seleccionados, pero no se observaron diferencias significativas en las plantas infectadas. Si bien se ha demostrado que el ácido salicílico es una de las principales rutas activadas en las plantas frente a agentes patógenos, es mayormente activada frente a organismos de origen fúngico o bacteriano (Sánchez *et al.*, 2010). Por otra parte, la ruta del silenciamiento génico es el principal mecanismo de defensa de las plantas frente a virus y material genético externo (García *et al.*, 2016) además de ser una de las más estudiadas en Geminivirus dada la interacción de la proteína Rep con las proteínas Argonauta y el complejo de silenciamiento génico inducido RISC (Ruhel y Chakraborty, 2019). El silenciamiento génico es un mecanismo molecular que bloquea la expresión de genes externos que se encuentran dentro de las células de las plantas y juega un rol vital en la defensa detectando ARN y ADN potencialmente dañino. Existen dos mecanismos de silenciamiento en plantas, el transcripcional (TGS) que se localiza en el núcleo de las células y actúa principalmente bloqueando la región promotora de unión a la maquinaria transcripcional, y el post-transcripcional (PTGS) que se localiza en el citoplasma y se encarga de marcar y degradar micro ARN de genes específicos transcritos (Vaucheret, *et al.*, 2001). Como se esperaba, se encontraron diferencias significativas en los genes involucrados en la ruta de silenciamiento génico (Fig. 10) donde se observó que los genes DCL2 y DCL3, principalmente, aumentaron su expresión a los 7 y 1 dpi respectivamente en las plantas infectadas comparados contra el control y el mock. DCL3 es una proteína requerida para la recepción de mRNA de silenciamiento, además de estar involucrada en la generación de ARNs pequeños (Wang *et al.*, 2021). Por otra parte, DCL2 está involucrada en la metilación de ADN y la producción de ARNs

de pequeña interferencia (Taochy *et al.*, 2017) y es una de las principales proteínas relacionadas al ataque de virus, por lo que el aumento en la expresión de ambos genes corresponde con la respuesta de las plantas ante la invasión de un virus como el PepGMV. Sin embargo, las muestras inoculadas con Rep fueron las que presentaron mayor diferencia significativa y un incremento en la expresión de los genes relacionados al silenciamiento. El gen AGO1 que no mostró expresión significativa con el PepGMV, presentó una expresión relativa 50 veces mayor al control en las plantas inoculadas con Rep para los 3 tiempos analizados. Este gen sintetiza la proteína AGO1 que actúa en el silenciamiento génico post-transcripcional como componente principal del complejo RISC. Se ha demostrado que los geminivirus, son capaces de inhibir el PTGS interactuando con las proteínas argonautas hospederas para evitar la unión con este complejo (Ruhel *et al.*, 2019). De igual manera en las muestras con Rep se observó diferencia significativa mayor a la mostrada en las muestras infectadas con PepGMV en los genes DCL1, DCL2 y DCL3. Estos resultados indican que la ruta del silenciamiento génico es activada en los primeros días después de la inoculación del PepGMV, y es la principal encargada de combatir la infección viral en las plantas de *N. benthamiana*. Sin embargo, cuando se inocula el PepGMV completo se ve afectada por la supresión del silenciamiento génico ocasionada por el virus, mientras que al introducir la secuencia de la proteína de replicación Rep la expresión relativa de los genes se da de manera normal para contrarrestar el ADN externo. Dicho de otra forma, al ser infiltrada la secuencia de la Rep de PepGMV, esta es capaz de promover la expresión de genes involucrados en el silenciamiento génico en plantas de *N. benthamiana*.

Además de los organismos patógenos, las plantas se encuentran en constante interacción con una gran cantidad de microorganismos, principalmente asociados a las raíces, y que les benefician, entre otras cosas, en la asimilación de nutrientes del suelo, a la promoción del crecimiento y al aumento en la resistencia ante diversos tipos de estrés (Cordovez, *et al.*, 2019). Durante una enfermedad causada por un agente patógeno, la microbiota asociada tanto a los hospederos como a los patógenos es capaz de regular el curso de la infección (Larousse, *et al.*, 2017). Es por ello por lo que la incidencia que tienen los patógenos de plantas en su comunidad microbiana se encuentra en constante investigación. Sin embargo, muy pocos estudios se han dedicado al análisis de los cambios en las comunidades microbianas de la rizósfera de la planta frente a una enfermedad de origen viral.

En este trabajo, realizamos un primer análisis de las comunidades microbianas a través de la cuantificación absoluta de los genes 16S e ITS para conocer la abundancia de las poblaciones de microorganismos bacterianos, archaeas y fúngicos. Se analizaron dos tipos de muestras, los microorganismos presentes en el compartimento endofítico de raíz y los microorganismos presentes en la rizósfera. Los resultados obtenidos demostraron que en las muestras obtenidas a partir del compartimento endofítico hubo una disminución en la abundancia de los tres tipos de microorganismos en los primeros días después de la inoculación (Fig. 12, 13 y 14). Sin embargo, a los 21 días después de la inoculación la abundancia de las poblaciones sufría una recuperación con respecto al control. Esta mejora coincide con el periodo de recuperación promedio de las plantas después de haber sido infectadas por el PepGMV el cual es a los 21 días después de haber sido infectadas (Rodríguez-Garandilla, *et al.*, 2020) por lo que cuando la planta se está recuperando de la infección viral, puede ser capaz de recuperar la cantidad de microbiota que contenía dentro de su raíz inicialmente. Por el contrario, las muestras de rizósfera mostraron un aumento significativo a través de los 3 tiempos analizados, en bacteria, archaea y fungi (Fig. 15, 16, 17). Este aumento en la abundancia de la rizósfera podría corresponder con el fenómeno de reclutamiento de microorganismos en las plantas, donde se ha demostrado que bacterias benéficas pueden llegar a enriquecer la microbiota de las plantas enfermas debido a diversas señalizaciones moleculares entre la planta y el rizobioma (Gao *et al.*, 2021). Similar a los resultados en rizósfera, en las plantas inoculadas con Rep se observó un aumento de la abundancia de la microbiota endofítica, que correspondería con este fenómeno. Ambos resultados comprueban que las plantas se encuentran en constante interacción con el microbioma presente tanto en la rizósfera como en el compartimento endofítico y que pueden aumentar o disminuir la población de microorganismos durante una enfermedad viral según estas lo requieran. Además, se puede inferir que el virus es capaz de disminuir a la población bacteriana presente dentro de las raíces, lo que impediría la interacción benéfica de la planta con los microorganismos de la rizósfera.

Una vez obtenidos los resultados de abundancia y observando los cambios que generó la interacción con el virus, se decidió realizar también el análisis de los perfiles bacterianos de rizósfera y el compartimento endofítico de la raíz, a través de los distintos tratamientos y tiempos empleados a través de secuenciación de nueva generación. En la figura 18 se observa

una gráfica de barras apiladas con el perfil taxonómico de las bacterias de la rizósfera a los 7 días de tratamiento, donde se observó que en las muestras infectadas los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* son los más abundantes, mientras en las muestras control, mock y Rep tienen predominancia los filos *Proteobacteria* y *Actinobacteria*. Esta tendencia se repite con el análisis en clase y familia, en esta última destacando la familia *Lactobacillaceae* en las plantas infectadas. Por otra parte, en las mismas muestras a los 21 días (Fig. 19) se observan proporciones similares tanto en las infectadas, como mock, Rep y controles. Estos resultados coinciden con el periodo de recuperación de la planta ante la infección de virus, así como con los resultados obtenidos en los análisis de abundancia relativa para las muestras de tejido endofítico. Ambos resultados podrían indicar que las plantas presentan un periodo de escases en cuanto a la cantidad y variedad de microorganismos presentes en su compartimento endofítico durante una enfermedad viral, y a medida que la enfermedad es mitigada por la planta, el perfil bacteriano de dicho compartimento vuelve a recuperar tanto su variabilidad como su abundancia. Por otra parte, se ha demostrado que la disrupción del filo *Firmicutes* y *Actinobacteria* en la rizósfera de plantas de tomate aumenta la incidencia de enfermedades (Lee *et al.*, 2021) por lo que es probable que las plantas sean capaces de reclutar a este tipo de microorganismos para mitigar la enfermedad de alguna manera.

En las muestras de rizósfera ocurre un fenómeno similar. Los filos, clases y familias presentes en las muestras infectadas se caracterizan por estar representados por un solo taxon, mientras que las muestras control demuestran tener mayor diversidad. Por otra parte, en la figura 23 es posible observar que la proporción del filo *Firmicutes*, y en general de otros filos observados en la gráfica, en las plantas infectadas es muy similar a la proporción que existe en las muestras de sustrato a tiempo 0 y a las muestras agroinfiltradas con Rep. Estudios recientes han demostrado que la señalización de hormonas como el ácido salicílico (Lebeis, *et al.*, 2015), etileno (Chen, *et al.*, 2020) y jasmonato (Chen, *et al.*, 2020) pueden mediar o alterar la composición de la comunidad microbiana en plantas. Esto hace posible que ambas plantas, infiltradas con el virus y la proteína, pudieran modificar el rizobioma debido a los cambios en los niveles de dichas moléculas, que también se encuentran involucradas en la expresión de los genes de defensa que se analizaron.

Este resultado es similar al observado en el perfil bacteriano de las muestras de rizósfera a los 21 días, donde tanto en las plantas infectadas como en el sustrato y en Rep existe un taxón predominante (Firmicutes) y se reduce la variedad de taxones bacterianos a comparación con los controles y mock. Ambos resultados pueden indicar que la presencia del virus es capaz de llevar a la microbiota a un perfil taxonómico similar al encontrado en el sustrato previo a la presencia de la planta, pudiendo tratarse de un reclutamiento de bacterias similares a las encontradas en su estado inicial, o una disminución en la variabilidad de especies debido a la enfermedad.

9. CONCLUSIONES

En este estudio, se realizaron los análisis de expresión de genes y análisis metagenómicos del rizobioma de plantas de *N. benthamiana* frente a una infección viral por PepGMV y la expresión de la proteína viral Rep. Se demostró que la presencia del PepGMV induce los mecanismos de defensa en la planta, aumentando la expresión de genes de defensa, como los genes AGO1, DCL2 y DCL3, involucrados en el silenciamiento génico. Por otra parte, se observó que las plantas que fueron agroinfiltradas con Rep presentaron una mayor expresión en los genes AGO1, DCL1, DCL2 y DCL3, en comparación con los controles y con el PepGMV, sugiriendo una supresión de estos mecanismos de defensa en la planta por en presencia de la secuencia del virus completo, y una activación temprana de dichos genes en presencia de la secuencia de la proteína Rep.

Se demostró que la abundancia de las comunidades de microorganismos presentes en el tejido endofítico es afectada por la presencia del virus. Esta disminuye drásticamente los primeros 7 días después de la inoculación de PepGMV y vuelve a la normalidad después de los 21 días de la inoculación, coincidiendo con el periodo de recuperación de la planta frente a la enfermedad. La presencia de PepGMV también reduce el número de especies de bacterias endofíticas y aumenta la presencia de bacterias de la familia *Lactobacillaceae*, mientras que las bacterias de la rizósfera se comportan de manera similar a las bacterias presentes en el sustrato utilizado para cultivar las plantas en presencia del PepGMV. Por último, las plantas inoculadas con Rep mostraron la presencia de los filos *Fusobacteria* y *Firmicutes* en los compartimentos endofíticos de las raíces, y una predominancia en los filos *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* en la rizósfera, similar a lo observado en los controles.

10. LITERATURA CITADA

- Akbergenov R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Grisse, W., Meins, J., Hohn, T., Pooggin, M. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Research*, 34 (2): 462-471.
- Asad, S., Haris, W., Bashir, A., Zafar, Y., Malik, K., Malik, N., Lichtenstein, C. (2003). Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Archives of Virology*, 148 (12): 2341-2352.
- Ascencio, J., Sozzani, R., Lee, T., Chu, T., Wolfinger, R., Cella, R., Hanley, L. (2008). Global análisis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiology*, 148 (1): 436-54.
- Bai, Y., Mueller, D., Srinivas, G., Garrido, R., Potthoff, E., Rott, M. (2015). Functional overlap of the *Arabidopsis* leaf and root microbiota. *Nature*, 528 (7582): 364-9. <https://doi.org/10.1038/nature16192>.
- Berendsen, R., Pieterse, C., Bakker, P. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends In Plant Science*, 17: 478-486.
- Brown, J., Idris, A., Ostrow, K., Goldberg, N., French, R., Stenger, D. (2005). Genetic and Phenotypic Variation of the Pepper Golden mosaic virus Complex. *Phytopathology*, 95: 1217-1224.
- Brown, J., Zerbini, F., Navas, J., Moriones, E., Ramos, R., Silva, J., Fiallo, E., Briddon, R., Hernandez, C., Idris, A., Malathi, V., Martin, D., Rivera, R., Ueda, S., Varsani, A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160 (6): 1593-1619. DOI 10.1007/s00705-015-2398-y
- Burgyan J., Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends In Plant Science*, 16(5): 265-72.
- Castro, A., Fernández, S., Osuna, P. (2011). Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(1): 49-65.
- Chelapan, P., Masona, M, Vanitharani, R. (2004). Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in cassava. *Plant Molecular Biology*, 56: 601-611.
- Chen, X., Marszalkowska, M., Reinhold, B. (2020). Jasmonic acid, not salicylic acid restricts endophytic root colonization of rice. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1758. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01758>
- Chen, Y., Bonkowski, M., Shen, Y., Griffiths, B., Yuji, J., Wang, X. (2020). Root ethylene mediates rhizosphere microbial community reconstruction when chemically detecting cyanide produced by neighbouring plants. *Microbiome*, 8: 4. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0775-6>
- Choudhury, N., Malik, P., Singh, D., Islam, M., Kaliappan, K., Mukherjee, S. (2006). The oligomeric Rep protein of Mungbean yellow Mosaic India virus (MYMIV) is a likely replicative helicase. *Nucleic Acids Research*, 34(21): 62-77.
- Chukwuneme, C., Ayanbero, A., Oluranti, O. (2021). Metagenomic analyses of plant growth-promoting and carbon-cycling genes in maize rhizosphere soils with distinct land-use and management histories. *Genes*, 12, 1431. <https://doi.org/10.3390/genes12091431>

- Czosnek, H., Hariton, A., Sobol, I., Grovits, R., Ghanim, M. (2017). The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, 9, 273; doi:10.3390/v910073
- Ding, S., Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, 130: 413-426.
- Edwards, J. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(2): 911-920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414592112>
- Figueroa, O. (2020). Plant resistance to pathogens: A review describing the vertical and horizontal resistance concepts. *Revista Argentina de Microbiología*, 52: 245-255.
- García, H., García, M., Gabriel, S., Miravel, C. (2007). Mecanismos, aplicaciones y perspectivas del silenciamiento génico de virus en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34: 286-307.
- García, H., Takeda, A., Chapman E., Sullivan, C., Fahlgren, N., Bremmelis, K., Carrington, J. (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell*, 22: 481-496.
- García, S., Tomas, D., Sanchez, S., Navas, J., Moriones, E. (2007). Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology*, 365: 210-219.
- Handley, L., Bejarano, E., Robertson, D., Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews*, 11: 777-788. Doi: 10.1038/nmicro3117
- Hernández, L., Enríquez, I., Melgoza, C., Retes, J., Velarde, S., Linares, P., Garzón, J. (2018). Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(2): 149-157.
- Karran, R., Sanfacon, H. (2014). Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Molecular Plant-Microbiome Interactions*, 27: 933-943.
- Larousse, M., Rancurel, C., Syska, C., Palero, F., Etienne, C., Industri, B., Nesme, X., Bardin, M., Galiana, E. (2017). Tomato root microbiota and *Phytophthora* parasítica-associated disease. *Microbiome*, 5: 56. DOI 10.1186/s40168-017-0273-7
- Lazarowits, S., Shepherd, R. (1992). Geminiviruses: genoma structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11 (4): 327-49.
- Lebeis, S., Herrera, S., Lundberg, D., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., Malfatti, S., Glavina, T., Jones, C., Tringe, S., Dangl, J. (2015) Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Plant Microbiome*, 349: 860-863. <https://doi.org/10.1126/science.aaa8764>
- Li, L., Wang, S., Xang, X., Francis, F., Qiu, D. (2019). Protein elicitor PeaT1 efficiently controlled Barley Yellow Dwarf Virus in wheat. *Agriculture*, 9: 193. doi:10.3390/agricultura9090193
- Lucioli, A., Noris, E., Brunetti, A., Tavazza, R., Ruzza, V., Castillo, A., Bejarano, E., Accotto, P., Tavazza, M. (2003). Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus Rep-Derived resistance to homologous and heterologous geminiviruses occurs by different mechanisms and is overcome if virus-mediated Transgene Silencing Is Activated. *Journal of Virology*, 77(12): 6785-6798.
- Luna, A., Lozano, R. (2020). Geminivirus-encoded proteins: Not all positional homologs are made equal. *Frontiers in Microbiology*, 11: 878. doi: 10.3389/fmicb.2020.00878
- Molnar, A., Melnyk, C., Bassett A., Hardcastle, T., Dunn, D. (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328: 872-875.

- Morella, N., Gomez, A., Wang, G., Leung, M., Koskella, B. (2018). The impact of bacteriophages on phyllosphere bacterial abundance and composition. *Molecular Ecology*, 27: 2025-2038.
- Newton, A., Fitt, B., Atkins, S., Walters, D., Daniel, T. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18(8): 365-73.
- Noris, E., Noris, E., Accotto, P., Tavazza, R., Brunnetti, A., Crespi, S., Tavazza, M. (1996). Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology*, 224 (1): 130-138.
- Poland, J., Balint, P., Wisser, R., Prat, R., Nelson, R. (2009). Shades of gray. The world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*, 14 (1): 21-29.
- Pumplin, N., Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews*, 11: 754-760.
- Ramírez, M., Rodríguez, A. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1): 271-284.
- Robles, L., González, A., Gill, M., Pérez, L., López, J. (2010). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *Tecnociencia*, 4(2): 72-86.
- Ruhel, R., Chakraborty, S. (2019). Multifunctional roles of geminivirus encoded replication initiator protein. *Virus Disease*, 30(1): 66-73. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0458-0>
- Samaniego, B., Reyes, A., Moreno, O., Tun, J. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32: 10-22.
- Sanchez, G., Castro, E., Beltran, E., Reyes, H., García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en las plantas. *Biológicas*, 12(2): 90-95.
- Taochy, C., Gursansky, N., Cao, J., Fletcher, S., Dressel, U., Mitter, N., Tucker, M., Koltunow, A., Bowman, J., Vaucheret, H., Carroll, B. (2017). A genetic screen for impaired systemic RNAi highlights the crucial role of DICER-LIKE 2. *Plant Physiology*, 175(3): 1424-1437.
- Tian, B., Cao, Y., Zhang, K. (2015). Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incógnita* in tomato roots. *Scientific Reports*, 5: 17087. DOI: 10.1038/srep17087.
- Torres-Pacheco, I., Garzón, J., Brown, J., Becerra, A., Rivera, R. (1996). Detection and Distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, 86: 1186-1192.
- Wang, Q., Xue, Y., Zhang, L., Zhong, Z., Feng, S., Wang, C., Xiao, L., Yang, Z., Harris, J., Wu, Z., Zhai, J., Yang, M., Li, S., Jacobsen, S., Du, J. (2021). Mechanism of siRNA production by a plant Dicer-RNA complex in dicing-competent conformation. *Science*, 374(6571): 1152-1157.
- Yu, W., Mijiti, G., Huang, Y., Fan, H., Wang, Y., Liu, Z. (2018). Functional analysis of eliciting plant response protein Epl1-Tas from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Scientific Reports*, 8: 7974. DOI: 10.1038/s41598-018-26328-1
- Zhang, X., Yuan, Y., Pei, Y., Lin, S., Tuschl, T., Patel, D., Chua, N. (2006). Cucumber Mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development*, 20: 3255-3268. DOI: [10.3389/fmicb.2018.00700](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00700)

11. ANEXOS

ANEXO A: Tabla de OTUs para muestras endofíticas 7dpi.

Dominio	Filo	C7R1_R	C7R2_R	C7R3_R	M7R1_R	M7R2_R	M7R3_R	V7R1_R	V7R2_R	V7R3_R	R7R1_R	R7R2_R	R7R3_R
Bacteria	Acidobacteria	0	0	0	0	0	5	2	5	4	0	0	0
Bacteria	Actinobacteria	6	9	5	11	3	130	107	500	94	6	1	4
Bacteria	Aquificae	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidetes	16	2	5	8	5	120	32	437	37	2	0	1
Bacteria	Chlamydiae	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Chlorobi	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Bacteria	Chloroflexi	0	5	0	1	0	47	90	123	47	0	0	0
Bacteria	Cyanobacteria	1	7	1	0	0	0	36	65	23	0	0	1
Bacteria	Deinococcus-Thermus	0	1	0	0	0	5	18	44	17	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	20	10	4	6	11	11471	3058	40714	2504	6	1	0
Bacteria	Fusobacteria	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	10	8
Bacteria	Gemmatimonadetes	0	0	0	0	0	5	2	10	5	0	0	0
Bacteria	Nitrospirae	0	0	0	0	0	6	1	3	7	0	0	0
Bacteria	Planctomyces	0	0	0	0	0	1	0	2	4	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	11	40	11	17	19	605	657	1579	732	1	0	9
Bacteria	Spirochaetes	0	0	0	0	0	2	7	20	5	0	0	0
Bacteria	Synergistetes	0	0	0	0	0	31	6	81	12	0	0	0
Bacteria	Tenericutes	0	0	0	0	0	4	2	3	1	0	0	0
Bacteria	Thermodesulfobacteria	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bacteria	Thermotoga	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Bacteria	Verrucomicrobia	0	0	0	0	1	2	1	5	0	0	0	0
Bacteria	unclassified (derived from Bacteria)	40	74	11	13	24	301	215	818	183	5	5	7

ANEXO B: Tabla de OTUs para muestras endofíticas 7dpi.

Dominio	Filo	C21R1_R	C21R2_R	C21R3_R	M21R1_R	M21R2_R	M21R3_R	V21R1_R	V21R2_R, n	V21R3_R	R21R1_R	R21R2_R	R21R3_R
Bacteria	Acidobacteria	4	2	45	17	0	2	8	2	219	0	0	0
Bacteria	Actinobacteria	395	3	20	1590	3	123	662	2	15348	41	15	7
Bacteria	Aquificae	0	0	0	6	0	1	0	0	15	0	0	0
Bacteria	Bacteroidetes	66	0	40	227	5	21	7	3	1863	1	4	2
Bacteria	Chlorobi	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0
Bacteria	Chloroflexi	213	0	1	996	1	52	209	0	8110	0	0	0
Bacteria	Cyanobacteria	73	0	5	174	2	7	11	1	635	9	0	5
Bacteria	Deferribacteres	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Deinococcus-Thermus	49	0	1	283	1	25	0	1	886	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	4372	11	332	2389	5	127	13	13	18182	3	6	1
Bacteria	Fusobacteria	0	0	0	2	0	0	2	0	1	6	10	9
Bacteria	Gemmatimonadetes	3	0	4	28	0	2	0	0	332	0	0	0
Bacteria	Nitrospirae	1	0	0	16	0	2	0	0	379	0	0	0
Bacteria	Planctomycetes	7	0	3	9	0	2	1	0	79	0	0	0
Bacteria	Proteobacteria	366	10	154	3356	11	137	71	6	26226	10	11	7
Bacteria	Spirochaetes	2	0	0	10	0	0	0	0	89	0	0	0
Bacteria	Synergistetes	7	0	0	29	0	0	0	0	28	0	0	0
Bacteria	Tenericutes	0	0	0	0	1	0	0	0	12	0	0	0
Bacteria	Thermodesulfobacteria	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0	0
Bacteria	Thermotoga	3	0	0	5	0	0	0	0	73	0	0	0
Bacteria	Verrucomicrobia	1	0	12	3	0	0	2	0	40	0	0	0
Bacteria	Sin clasificar	440	6	273	1743	8	110	247	13	16936	12	29	11

ANEXO C: Tabla de OTUs para muestras rizósfera 7dpi.

Dominio	Filo	T051_R	T025_R	T035_R	C751_R	C752_R	C753_R	M751_R	M752_R	M753_R	V751_R	V752_R	V753_R	R751_R	R752_R	R753_R
Bacteria	Acidobacteri a	1709	18180	1283	100	2042	15	1196	1056	242	580	322	631	2468	1578	2092
Bacteria	Actinobacter ia	21578	8086	897	1457	22490	792	11263	8653	68	178	101	272	10866	12908	16900
Bacteria	Aquificae	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Bacteroidete s	214	3372	353	158	778	77	239	231	208	630	398	551	433	426	572
Bacteria	Chlamydiae	1	1	0	0	1	0	2	2	0	1	0	0	9	6	4
Bacteria	Chlorobi	1	0	0	1	3	0	1	0	0	0	1	0	2	4	1
Bacteria	Chloroflexi	922	104	19	608	282	261	1672	1482	5	4	8	10	165	318	160
Bacteria	Cyanobacter ia	60	16	1	54	20	27	28	11	4	1	3	1	28	28	29
Bacteria	Deferribacte res	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Bacteria	Deinococcus -Thermus	1	0	0	313	0	109	1	0	2	0	1	1	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	431	58549	11808	1504	320	608	295	326	9519	8656	10147	3667	885	674	171
Bacteria	Fusobacteria	0	9	1	0	25	0	0	0	0	2	0	0	5	8	1
Bacteria	Gemmatimo nadetes	158	1702	120	41	32	14	56	139	32	69	25	88	145	268	143
Bacteria	Nitrospirae	0	0	3	8	1	2	0	0	0	0	3	0	1	0	1
Bacteria	Planctomyce tes	98	194	23	2	49	2	57	32	11	15	1	19	18	17	25
Bacteria	Proteobacter ia	7727	29047	2175	2318	7178	651	2503	3485	1969	1481	1130	2090	7512	8653	5567
Bacteria	Spirochaetes	0	0	1	8	0	3	0	0	1	1	0	0	2	0	2
Bacteria	Synergistete s	0	22	0	80	0	20	1	0	1	0	1	0	0	0	0
Bacteria	Tenericutes	0	2	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Thermodesu fobacteria	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Thermotoga e	0	1	0	2	6	0	0	1	0	0	1	2	1	6	1
Bacteria	Verrucomicr obia	91	309	21	4	129	1	279	211	36	111	52	112	147	284	340
Bacteria	Sin clasificar	19026	32396	2653	2251	33989	961	12316	10954	779	2227	994	3045	10654	9081	9172

ANEXO D: Tabla de OTUs para muestras rizósfera 21dpi.

Dominio	Filo	T051_R	T025_R	T035_R	C2151_R	C2152_R	C2153_R	M2151_R	M2152_R	M2153_R	V2151_R	V2152_R	V2153_R	R2151_R	R2152_R	R2153_R
Bacteria	Acidobacteria	1709	18180	1283	55	336	1952	2719	143	1660	933	173	22	1090	1102	1423
Bacteria	Actinobacteria	21578	8086	897	90	176	2072	34602	419	5569	726	174	130	18483	15307	23222
Bacteria	Aquificae	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0	1	0	1	0	1
Bacteria	Bacteroidetes	214	3372	353	216	951	6523	302	398	3293	1227	908	232	479	847	700
Bacteria	Chlamydiae	1	1	0	1	0	2	0	0	0	0	2	0	3	2	9
Bacteria	Chlorobi	1	0	0	0	1	0	4	0	1	0	1	0	1	0	2
Bacteria	Chloroflexi	922	104	19	10	3	32	5604	165	2074	28	5	6	185	141	122
Bacteria	Cyanobacteria	60	16	1	1	1	14	17	16	198	13	0	3	2	6	2
Bacteria	Deferribacteres	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Deinococcus-Thermus	1	0	0	2	2	0	1	103	968	6	0	2	0	0	0
Bacteria	Firmicutes	431	58549	11808	8280	3453	29802	1033	621	6431	20223	18581	12332	839	646	956
Bacteria	Fusobacteria	0	9	1	4	0	27	0	0	1	15	4	7	1	3	9
Bacteria	Gemmatimonadetes	158	1702	120	23	106	494	251	20	724	453	43	8	73	69	84
Bacteria	Nitrospirae	0	0	3	0	0	9	0	0	40	0	0	1	0	10	9
Bacteria	Planctomyces	98	194	23	7	11	87	101	4	71	39	3	1	5	7	7
Bacteria	Proteobacteria	7727	29047	2175	747	2806	17371	9846	1764	14026	4920	961	766	4801	4265	5197
Bacteria	Spirochaetes	0	0	1	0	0	1	0	3	53	1	2	3	0	0	0
Bacteria	Synergistetes	0	22	0	0	0	5	0	9	109	0	0	6	0	1	0
Bacteria	Tenericutes	0	2	2	0	0	12	0	0	21	14	2	1	1	4	1
Bacteria	Thermodesulfobacteria	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Bacteria	Thermotogae	0	1	0	0	0	0	2	0	18	0	0	0	0	2	1
Bacteria	Verrucomicrobia	91	309	21	12	61	717	33	33	231	72	40	7	35	42	39
Bacteria	Sin clasificar	19026	32396	2653	896	3541	25677	31452	1944	20810	10273	1775	1023	11151	8632	10927

