



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Papel de compuestos promotores de crecimiento vegetal
sobre plantas infectadas con virus

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA



PRESENTA:

Iván Alexander Santos Cabrera

Tutor: Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes.

Cotutor: Dr. Jesús Sandoval Ramírez.



Puebla de Zaragoza Enero 2019



Agradecimientos.

Al Doctor Jesús Sandoval Ramírez por el apoyo en la obtención de los compuestos utilizados en esta investigación, así como la postulación para el programa de “Ayudante de Investigador Nacional Nivel III o émerito”, con número de ayudante 14107, sin su apoyo y cooperación, esta investigación no podría haber realizado.

Al Doctor Carlos Alberto Contreras-Paredes quién me asesoró durante las experimentaciones y me ayudó a desarrollarme en la investigación científica.

Al Fondo PRODEP Nptc-390 a cargo del Dr. Contreras-Paredes que permitió adquirir materiales y reactivos necesarios durante la experimentación.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme y asistirme, así como de su amistad. Al Centro de Detección Biomolecular (CDB) de la BUAP asesorado por el Mtro. Sergio Tecpanecatí y Mtra. Elda Carreón Castillo por el apoyo y asesoría para la cuantificación de los ácidos nucleicos y la realización de los qPCRs.

Dedicatoria

A mis padres por ser el pilar fundamental en mi desarrollo. Sus enseñanzas y sobre todo la inspiración que sirvieron para motivarme a seguir adelante y cumplir con mis metas. Por la paciencia que tuvieron, pero del mismo modo por todo el amor que regalan a mi hermano y a mí.

A mi hermano quién me enseñó a enfrentar los retos e influyó directamente en todo mi desarrollo personal.

A toda mi familia, por darme esa energía de poner en alto mis apellidos y siempre ir de la mano de la humildad.

A todas las personas que estuvieron conmigo durante mi educación superior, quienes me regalaron su amistad, conocimiento y tiempo. Gracias a mis asesores por compartir su conocimiento, su respaldo y su amistad.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Índice

Agradecimientos.....	3
Dedicatoria.....	5
Abreviaturas	11
Introducción	15
1. Historia de los virus fitopatógenos.	17
1.1 Clasificación de los virus.	18
1.2 Características generales de los virus.....	19
1.3 Género <i>Potyvirus</i>	20
1.4 El <i>Virus del Jaspeado del Tabaco</i> (TEV).	22
2. Respuesta de las plantas frente a infecciones virales.	26
2.1 Control actual de los virus en plantas.....	27
3. Fitohormonas como biomoléculas implicadas en el sistema de respuesta frente a patógenos...29	
3.1 Clasificación de las fitohormonas.....	29
3.2 Brasinoesteroides; hormonas esteroideas.....	32
3.3 Compuestos promotores del crecimiento vegetal y su relevancia como fitohormonas.	35
Justificación	37
Hipótesis	39
Objetivos	39
General.....	39
Específicos:	39
Materiales y métodos.....	41
1. Siembra y germinación.....	41
2. Aplicación de los compuestos promotores de crecimiento vegetal aBSS4 y aBBSS18.	41
3. Inoculación TEV.....	42
4. Extracción de RNA total.	42
4.1 Extracción de RNA a partir de plantas de tabaco	42
4.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante reacciones de transcripción reversa (RT).....	42
4.3 Diseño de oligonucleótidos de transcritos relacionados con la respuesta viral.	43
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....	44
4.5 Análisis cuantitativo de la presencia de TEV y expresión de mRNAs.....	45
Resultados.....	47
1. Efecto de los compuestos aBSS4 y aBSS18 durante la infección por TEV en <i>N. tabacum</i>	47
2. Efecto de los CPCV aBSS4 y aBSS18 en la carga viral.	48
3. Cuantificación de los niveles de expresión de genes asociados a la infección y viral.....	49

Discusión de resultados.	53
1. Desarrollo de la infección por TEV y el efecto de los CPCV.....	53
2. Efecto de los CPCV en los niveles de mensajero viral.	54
3. Estimulo molecular inducido por los CPCV durante la infección por TEV-TAMPS	55
Conclusiones y perspectivas	59
Referencias	61

Índice de Figuras

Figura 1. Micrografía del Virus del Jaspeado del Tabaco desde microscopio electrónico de transmisión (MET).....	223
Figura 2. Ciclo de transmisión de TEV por <i>Myzus persicae</i>	256
Figura 3. Estructura de la brasinólida, aislada de <i>Brassica napus</i> (Grove <i>et al.</i> , 1979) ... ¡Error! Marcador no definido.	4
Figura 4. Efectos fisiológicos de Brasinoesteroides..... ¡Error! Marcador no definido.	5
Figura 5. Interacciones de los BRs con algunas fitohormonas.	37
Figura 6. Plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> con aplicación de los CPCV aBSS4 o aBSS18 inoculadas con TEV.	49
Figura 7. Acumulación de RNA viral y síntomas de la infección por TEV en hojas jóvenes de plantas de tabaco.	51
Figura 8. Acumulación de transcritos de genes asociados a la infección viral.	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Descripción general del género Potyvirus.....	21
Tabla 2. Funciones y características generales de las fitohormonas.	31
Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para amplificar cDNA de genes diana relacionados con la respuesta viral en plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> (Nt) y de la región CP a 3' de del genoma de TEV.	46

Índice de Esquemas

Esquema 1. Estructura del genoma del Virus del Jaspeado del Tabaco, se describen las funciones de las proteínas virales.	24
Esquema 2. Ejemplos de plantas de interés económico afectadas por TEV.	25

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
BRs	Brasinoesteroides
BUAP	Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
CE	Control experimental
CMV	Virus del Mosaico del Pepino por Cucumber Mosaic Virus
CN	Cianuro
CPCV	Compuestos Promotores de Crecimiento Vegetal
CV	Control viral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	deoxiribonucleótidos trifosfato
eEF1α	Factor de elongación eucariótico 1 α (Eukaryotic Elongation Factor 1 α)
EpYVV	Virus de la Vena Amarilla de la Papa (Potato yellow vein virus)
ERF	Factor de respuesta a etileno
ET	Etileno
GA	Giberelina
HC-Pro	Componente ayudador de la proteinasa (Helper Component-Proteinase)
HR	Respuesta hipersensible
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité internacional de Taxonomía de virus)
JA	Ácido Jasmonico
MET	Microscopio Electronico de Transmisión
M-MLV	Transcriptasa inversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney
Nm	Nanómetros
ORF	Marco abierto de lectura por Open Reading Frame
P04	Pretratamiento aBSS4
P18	Pretratamiento aBSS18
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDR	Resistencia Derivada de Patógenos
PIPO	Pretty Interesting Potyviridae ORF
PMMoV	Virus del moteado leve de los pimientos por Pepper mild mottle virus
PR	Proteínas relacionadas a la patogénesis
PVY	Virus Y de la Papa por Potato virus Y
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (tiempo real)
ROS	Especies reactivas de Oxígeno (Reactive oxygen species)
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RT	Reversotranscriptasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversotranscriptasa
SA	Ácido salicílico
TEV	Virus del Jaspeado del Tabaco por Tobacco etch virus
TMV	Virus del Mosaico de Tabaco por Tobacco Mosaic Virus
TNV	Virus de la Necrosis del Tabaco por Tobacco Necrotic Virus
ToMV	Virus del Mosaico del Tomate por Tomato Mosaic Virus
TuMV	Virus del Mosaico De Nabo por Turnip Mosaic Virus
TVCT	Virus del Aclaramiento de las Nervaduras del Nabo
TVCT	Virus del Aclaramiento de las Nervaduras del Nabo
VPg	Proteína Viral ligada al Genoma
X04	Postratamiento aBSS4
X18	Postratamiento aBSS18

Resumen

En el laboratorio de síntesis química de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) se ha desarrollado una familia de compuestos promotores de crecimiento vegetal que tienen una estructura similar a la de los Brasinoesteroides (BRs), estos compuestos inducen efectos en el desarrollo, crecimiento y resistencia a estrés en plantas superiores. En este trabajo se estudiaron los efectos de dos compuestos promotores de crecimiento nombrados: aBSS4 y aBSS18, durante la infección por el *Virus del Jaspeado del Tabaco* (TEV) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), además se evaluó la expresión de genes implicados en la respuesta de las plantas durante el proceso de infección viral.

Las plantas a las que se les aplicaron los compuestos mostraron síntomas con un menor grado de severidad en las hojas jóvenes, y una menor acumulación de transcritos virales, con excepción de las plantas que recibieron el tratamiento con el compuesto aBSS4 posterior a la inoculación. Adicionalmente, se realizó la evaluación de los niveles de expresión de genes asociados a la infección viral, y se observaron cambios significativos al comparar entre plantas infectadas no tratadas y las plantas que recibieron el tratamiento.

Aunque se desconoce el mecanismo que inducen los compuestos promotores de crecimiento vegetal durante la infección viral, los resultados obtenidos sugieren que ambos compuestos podrían actuar como preventivos de la infección viral.

Introducción

Los virus se han presentado a lo largo de la historia como agentes capaces de provocar infecciones en animales, plantas, y por consecuencia, pérdidas en cultivos de importancia económica (Pérez, 2004). Su estudio fue relevante hasta que las explicaciones a las enfermedades observadas durante el siglo XIX no pudieron ser argumentadas como consecuencias de la infección por bacterias u hongos. A finales del siglo XIX, se realizaron los primeros experimentos, donde se consideró la presencia de microorganismos más pequeños que una bacteria con la capacidad de provocar enfermedades (Zaitlin, M. 1998), pero fue hasta 1935 cuando se descubrió y observó por primera vez al *Virus del Mosaico de Tabaco* (TMV por Tobacco Mosaic Virus) (Lodish, et al., 2000).

A partir del siglo XX el desarrollo tecnológico permitió explorar un campo que para ese entonces comenzaba a surgir, la virología (Hull, 2009). Las investigaciones dieron amplios conocimientos sobre el comportamiento, taxonomía y estructura molecular de los virus. Actualmente, a pesar de los amplios descubrimientos hechos en el área de la virología, se siguen encontrando nuevos especímenes que son clasificados por el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV por International Committee on Taxonomy of Viruses) (ICTV, 2013), además de mecanismos fascinantes que permiten entender la relación que guardan con otros organismo, por ejemplo, se ha sugerido que virus que infectan a hongos entomopatógenos están vinculados con el control neuronal que el hongo ejerce sobre algunos insectos (Elya et al., 2017), o virus que pueden replicar su propio genoma a partir de RNA sin la necesidad de pasar por intermediario de DNA, a través de una enzima RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp por RNA dependent RNA polymerase) (Li et al., 1997).

En la actualidad es de gran importancia el estudio de los virus causantes de enfermedades, los mecanismos que desarrollan, métodos de detección, diagnóstico y el desarrollo de terapias para contrarrestar las infecciones (Valle, B. B, et al., 2018; Gaglia, M. M. y Munger, K. 2018; Bailey, J.R., et al., 2018), no menos relevante ha sido el estudio de los virus que infectan plantas y que son causantes de pérdidas en los cultivos (Ruiz, L., et al., 2018; Pallás, V., et al., 2018). Uno de los virus que tiene presencia en México es el *Virus del Jaspeado del Tabaco* (TEV por Tobacco Etch Virus), este es capaz de infectar más de 120 especies de plantas pertenecientes a 19 familias taxonómicas de dicotiledóneas, dado que algunas especies son de gran valor como fuente de alimento, o materia prima, el TEV es un patógeno causante de pérdidas importantes. Los daños causados por TEV en cultivos

de importancia en el país no han sido estudiados de manera minuciosa, sin embargo, en 1976 se registró en Venezuela la reducción en el rendimiento del tomate de hasta un 25%, además de afectar a diferentes especies de pimientos (Debrot, 1976).

La preocupación por la presencia del TEV en cultivos de importancia económica ha despertado el interés para desarrollar mecanismos de control y disminución en la propagación de las infecciones. La mayoría de las estrategias que se han planteado son preventivas y en algunos casos promueven la destrucción total de las plantas infectadas, algunas otras se basan en el uso de plantas en las que se ha encontrado resistencia recesiva o bien plantas transgénicas resistentes a infecciones virales (Crespo, 2010). Se ha vinculado que la aplicación de algunos compuestos puede tener efectos positivos durante la presencia de diferentes tipos de patógenos (Siegien y Bogatek, 2006). Ejemplo de dichos compuestos son las fitohormonas, compuestos que de manera natural las plantas producen y tienen efectos en el desarrollo y crecimiento, además de que pueden estimular la respuesta durante diferentes tipos de estrés abiótico y biótico.

Una de las familias de compuestos relevantes y que se ha asociado entre otras cosas a la inducción de resistencia a estrés biótico y abiótico son los brasinoesteroides (BRs); los cuales fueron descubiertos relativamente hace poco tiempo (Grove, M. D., *et al.*, 1979). Los efectos que producen en plantas son: crecimiento y respuesta gravitrópica de la raíz (Wei, 2016), elongación y división celular (Gudesblat y Russinova, 2011), metabolismo de radicales de oxígeno, respuesta a estrés abiótico y biótico (Bajguz y Hayat 2009). Su estructura esteroideal los hace ser diferentes a otras fitohormonas como las auxinas, las giberelinas, el etileno, el ácido abscísico o las citosininas, además, la concentración a través de la cual inducen efectos en las plantas es mucho menor (González-García *et al.*, 2011).

En el laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) se han desarrollado moléculas promotoras del crecimiento vegetal que tienen una estructura esteroideal similar a los BRs. Los compuestos promotores de crecimiento vegetal (CPCV) sintetizados han mostrado tener efectos positivos en plantas sometidas a estrés abiótico (Zeferino-Díaz *et al.*, 2015) aunque no se ha esclarecido el mecanismo a través del cual actúan. En este trabajo se estudiaron los efectos de dos CPCV denominados aBSS18 y aBSS4 en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), que fueron sometidas a la infección con un aislamiento del TEV (TEV-TAMPS). Se analizó el desarrollo de síntomas, la carga viral y la expresión de genes relacionados a la respuesta endógena de la planta contra TEV.

Antecedentes

1. Historia de los virus fitopatógenos.

La primera referencia a la presencia de virus en plantas fue mencionada en el poema escrito por la emperatriz *Koken* de Japón, en el año 752 A.C. Ella describió el cambio de coloración verde a tonos amarillos relucientes de la planta *Eupatorium perfoliatum*. Esta fue la primera descripción de *Virus de la Vena amarilla de Eupatorium* (EpYVV por Potato Yellow Vein Virus) (Agrios, 2005b).

Durante la edad media, las grandes epidemias de viruela promovieron el desarrollo de las investigaciones de patógenos para desarrollar tratamientos que contrarrestaran las enfermedades. A finales del siglo XIX, Luis Pasteur había descubierto que las infecciones podían contagiarse de un tejido enfermo a otro tejido sano por medio de bacterias (Smith, 2012).

Los conocimientos de la microbiología durante el siglo XIX permitieron conocer algunos de los microorganismos causantes de enfermedades. Diversos experimentos se enfocaron al cultivo y aislamiento por medio de filtros muy finos capaces de retener dichos microorganismos. Fue en 1892 cuando el ruso Dimitri Ivanovski demostró que el agente causal de la enfermedad del mosaico del tabaco era capaz de pasar a través de los filtros a prueba de bacterias y no podía ser observado bajo el microscopio, ni cultivado en medios artificiales. Estos resultados hicieron al científico especular que el mosaico del tabaco era causado por una toxina producida por un microorganismo. En 1898, el holandés Martinus Beijerinck demostró que el agente del mosaico del tabaco era capaz de multiplicarse en las plantas infectadas además de pasar a través de filtros de porcelana, hecho que descartaba la posibilidad de que se tratara de una toxina. A esto lo denominó como *Contagium vivum fluidum* (Zaitlin, 1998). En aquel entonces, el concepto de macromolécula no existía todavía, y las sustancias eran divididas básicamente en dos grupos; las sustancias suspendidas en los fluidos circundantes, como las bacterias y los glóbulos rojos, y las sustancias disueltas o solubles, moléculas de bajo peso molecular (Want y Dijkstra, 2006), fue hasta 1935 cuando Wendell Stanley purificó y cristalizó parcialmente TMV, fue la primera vez que se pudo visualizar la estructura de un virus (Lodish, et al., 2000)

La palabra “*virus*” tiene su origen en el latín y significa toxina o veneno, su definición actual es “un conjunto de una o más moléculas de ácido nucleico, normalmente encerradas en

una capa protectora o capas de proteína o lipoproteína, y es capaz de organizar su replicación dentro de células hospederas (Hull, 2009).

Actualmente su definición sigue en discusión, se manifiestan como parásitos microscópicos obligados. Pueden infectar y multiplicarse dentro de las células (hospederos) de seres humanos, animales, plantas u otros organismos y generalmente causan enfermedades.

1.1 Clasificación de los virus.

La primera iniciativa para la clasificación de los virus fue desarrollada por Johnson en 1927 (Johnson, 1997). Su nomenclatura se basó en el rango ecológico y criterios biológicos, incluyendo la patogenicidad para el caso de virus en animales y los síntomas generados por virus en plantas. Por ejemplo, los virus de la fiebre amarilla, de la Hepatitis A y B, y los que compartían sintomatología se agrupaban en los virus de la hepatitis (Claude M., 1999). Con el desarrollo sustancial de la virología en la década de 1930 la clasificación de los virus reflejó avances, sin embargo, dicha clasificación resultaba ambigua debido a la falta de criterios sólidos y al descubrimiento de nuevos virus, por ello, durante el Congreso Internacional de Microbiología realizado en Moscú, Rusia en 1966, se decidió crear el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus, conformado por 43 virólogos. Años más tarde se modificó el nombre por Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés: International Committee on Taxonomy of Viruses), actualmente considerado como la única organización oficial para todos los asuntos relacionados con la taxonomía y nomenclatura de virus (Claude M., 1999). En los años 70's el virólogo y premio nobel David Baltimore desarrolló un sistema de clasificación para virus que se basó en la naturaleza del genoma presente en los viriones, argumentando que "todos los virus deben sintetizar los mRNA a partir de sus genomas para producir las proteínas necesarias para su replicación", aunque los mecanismos precisos por los cuales se logra esto difieren para cada familia de virus (Baltimore, 1971). Con base en lo anterior, los genomas virales se pueden clasificar en siete grupos diferentes, acorde a la naturaleza de su genoma y las estrategias básicas para su replicación. Cuando se concibió originalmente el esquema de Baltimore abarcaba seis clases de genomas virales, posteriormente se descubrió el genoma circular de cadena doble y parcialmente se descubrió el de cadena sencilla de la familia *hepadnavirus* y se incorporó en un nuevo esquema (Yu *et al.*, 2013).

Actualmente la clasificación de Baltimore y del ICTV, son aceptadas. La clasificación propuesta por el comité se ha logrado mediante el análisis de la estructura del genoma viral y otros 60 criterios. En la actualidad, junto con el desarrollo de técnicas de secuenciación y análisis filogenéticos se han podido clasificar órdenes, familias, subfamilias, géneros y especies.

En el caso particular de los virus de plantas, las aproximadamente 4,400 especies conocidas hasta el año 2017 se han agrupado en 9 órdenes, 134 familias y 735 géneros, (ICTV-b, 2017), aunque existen niveles taxonómicos que no han podido ser incluidos en alguna categoría taxonómica.

1.2 Características generales de los virus.

Los virus tienen diferentes formas, desde icosaédricas o esféricas hasta varillas, filamentosas rígidas o flexibles; dentro de la cápside se encuentra el genoma viral que puede ser de DNA o RNA con sentido positivo o negativo y ser de cadena sencilla o doble. El ácido nucleico está rodeado por una capa llamada cápside que consiste en uno o más tipos de proteínas llamadas capsómeros, los cuales ejercen una función protectora, de anclaje y propagación. Existen virus que además de cápsides presentan cápsulas que contienen lípidos, proteínas y carbohidratos que ayudan a estabilizar la partícula viral, el movimiento viral y el proceso de infección en la célula hospedadora (Acheson, 2007).

Los mecanismos que se desarrollan difieren en la especie viral y en el hospedero, sin embargo, la replicación viral puede describirse en el contexto de tres propiedades fundamentales:

1. Todos los genomas virales están empaquetados en partículas que median la transmisión entre hospederos.
2. El genoma contiene la información para iniciar y completar un ciclo infectivo en una célula susceptible y permisiva. El ciclo infectivo incluye adsorción y entrada, decodificación de la información del genoma, replicación del genoma, ensamblado y liberación de la progenie viral.
3. La infección viral de un hospedero se establece de manera tal que asegura la propagación en la población (Fermin y Tennant, 2018).

A pesar de que la diversidad de virus es muy grande, algunos mecanismos y características se conservan entre algunas especies, lo que permite su multiplicación y ensamblaje, sin embargo, existen particularidades en el desarrollo del proceso de infección viral que depende de cada especie (Reese *et al.*, 2011).

1.3 Género *Potyvirus*.

Dentro de las 134 familias de virus conocidas (ICTV-b, 2013), se encuentra la familia Potyviridae, esta agrupa los géneros: *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus*, *Bymovirus*, *Brambyvirus*, *Poacevirus* y el más representativo, *Potyvirus*, este género viral agrupa aproximadamente 200 especies virales descritas que infectan plantas (Hull, 2009; Agrios, 2005a, ICTV-b).

Los miembros del género *Potyvirus*, tienen un genoma monopartita o bipartita de RNA de sentido positivo monocatenario y las partículas virales son flexibles y filamentosas. Los genomas tienen una proteína viral, unida covalentemente en el extremo 5' (VPg por Viral Protein genome-linked), y el extremo 3' está poliadenilado similar a un RNA mensajero celular. Los genomas de estos virus codifican una poliproteína que es autoprocesada posterior a la traducción en un conjunto de proteínas multifuncionales. La estructura genómica generalmente se conserva en todo el género (Tabla 1) (Adams *et al.*, 2005).

Si bien hay excepciones señaladas en las descripciones de los géneros relevantes, la poliproteína de la mayoría de los virus monopartitas de la familia Potyviridae es autoprocesada en diez productos, esta es una característica altamente conservada a nivel de secuencia y organización genómica (Kekarainen *et al.*, 2002).

Tabla 1. Descripción general del género Potyvirus.

Características	Descripción
Virión	Partículas flexibles no envueltas, alrededor de 720-850 nm de largo y con un diámetro entre 12-15 nm además esta compuesto de 5 % de ácidos nucleicos y 95% de proteínas.
Genoma	Principalmente una cadena lineal de RNA (monopartita), de sentido positivo. Con un tamaño aproximado de 10 000 pb. Extremo 3' lleva una secuencia poli (A) y el extremo 5' una proteína ligada a genoma (VPg) para su traducción.
Replicación	La replicación se lleva a cabo en el citoplasma. Iniciando en vesículas originarias del retículo endoplásmico inducidas por 6K2.
Traducción	Directamente de la cadena de RNA, traducido en una poliproteína que posteriormente sufre el rompimiento de las uniones peptídicas mediante proteínasas virales.
Rango de hospederos	Alrededor de 30 familias de plantas. Insectos vector pueden ser una fuente de transmisión.
Taxonomía	8 géneros, existen 200 especies conocidas de la familia Potyviridae.

Nota: Obtenido y modificado de International Committee on Taxonomy of Viruses (2017).

1.4 El *Virus del Jaspeado del Tabaco* (TEV).

Una de las especies virales más representativas del género *Potyvirus* es el *virus del jaspeado del tabaco*. Su estructura es una partícula filamentosa flexible que mide aproximadamente 730 nm de longitud (Figura 1).

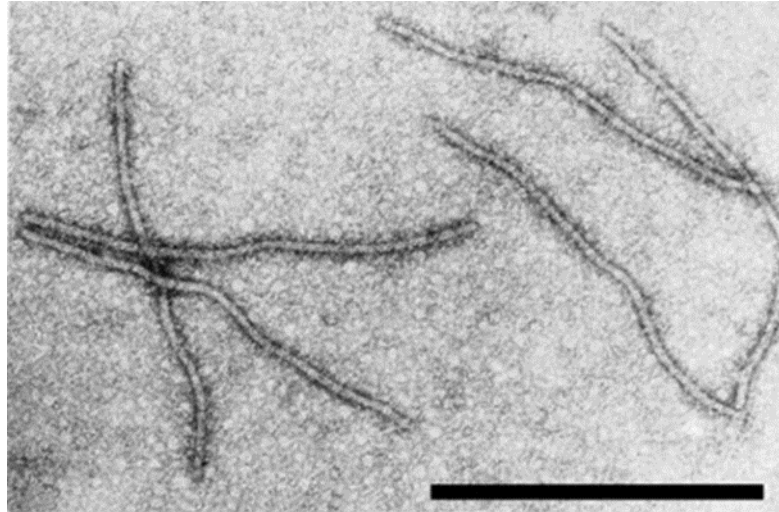
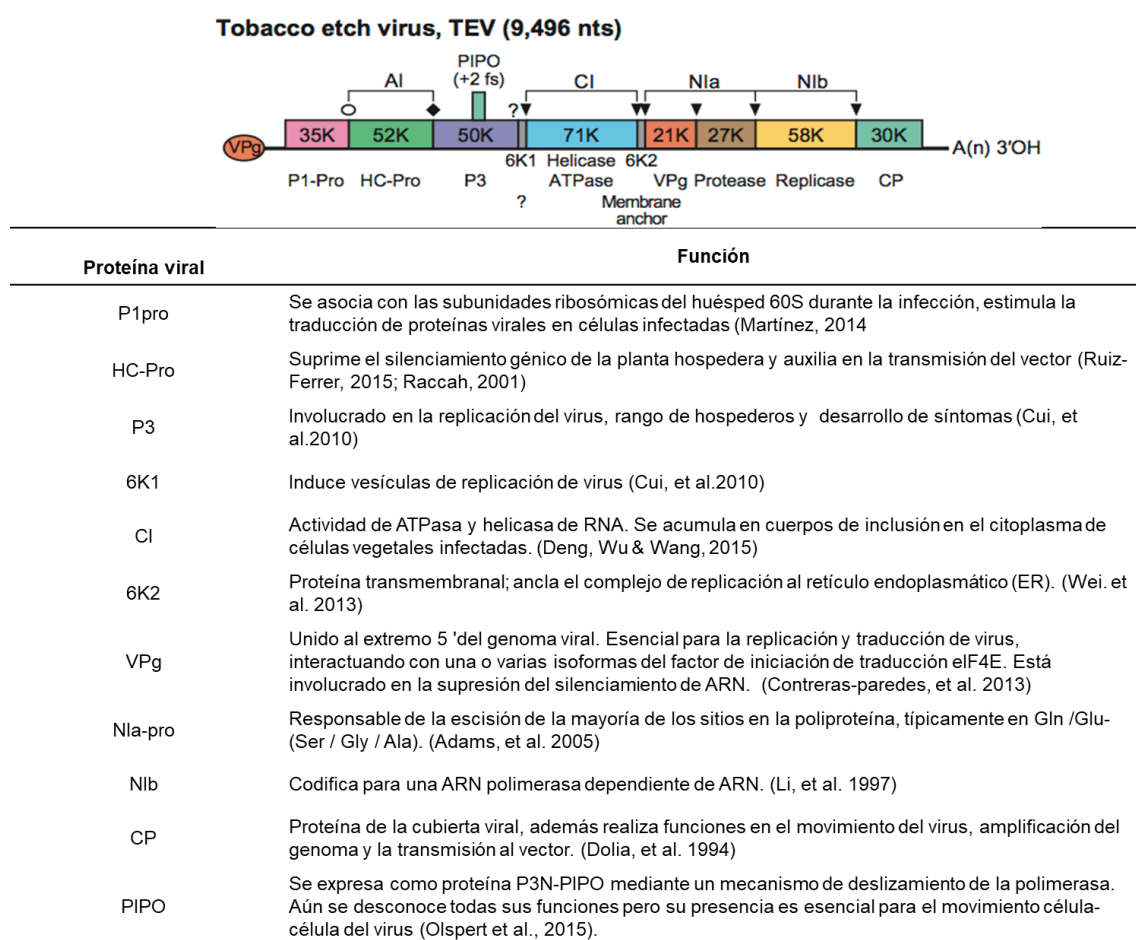


Figura 1. Micrografía del *Virus del Jaspeado del Tabaco* visto al microscopio electrónico de transmisión.

Imagen tomada de: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=258yfigno=07>, 2018.

Tiene una estructura génica de cadena simple de RNA de sentido positivo unida covalentemente a la proteína VPg de aproximadamente 24 kDa a través de un residuo de tirosina; posee una región 5' no codificadora de aproximadamente 144 nucleótidos donde se ha encontrado una secuencia altamente estructurada que forma dos dominios compuestos por los pseudonudos PK1, PK2 y PK3 que permite la traducción *cap* independiente del RNA viral. El genoma viral tiene un único marco de lectura abierto de 9161 nucleótidos y un extremo 3' no traducible de aproximadamente 190 bases que termina en una cola de Poli(A)⁻; la cápside viral está formada por aproximadamente 2000 monómeros de la proteína de la cápside de 30 kDa. El genoma de TEV codifica una poliproteína de 3000 aminoácidos (340 kDa), que posteriormente es sometida a un autoprocesamiento proteolítico por tres proteinasas codificadas por el virus para formar las proteínas maduras, dando origen a diez proteínas virales multifuncionales, además, posee un marco de lectura alterno (+2) que se ha denominado como PIPO (por *Pretty Interesting Potyviridae ORF*) (Esquema 1), cuyo producto se ha implicado en el movimiento viral (Carrington y Freed, 1990; Zeenko y Gallie, 2005; Susaimuthu, *et al.*, 2008; Dolja, *et al.*, 1994; Kelloniemi *et al.*, 2008; Chung, M., *et al.*, 2008; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

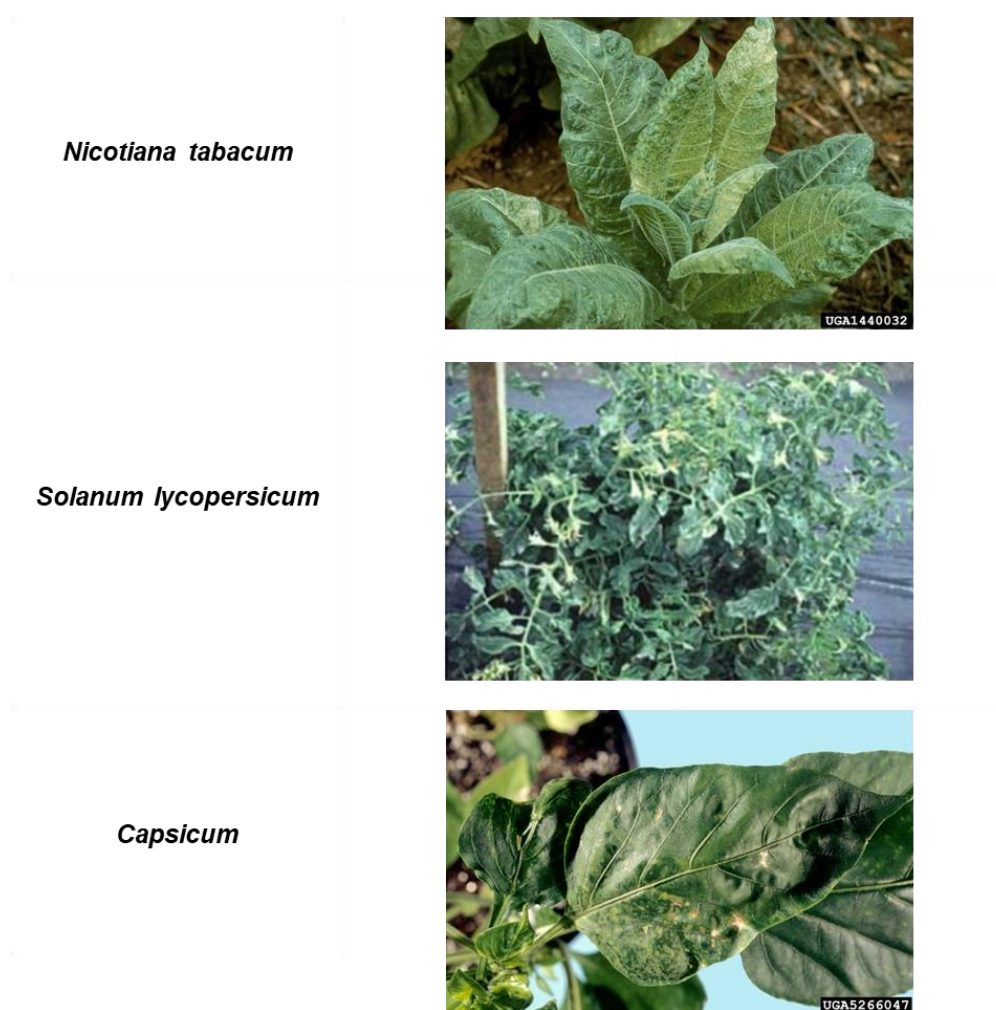
Similar a otros virus de RNA, el genoma de TEV se replica mediante la producción de un RNA de doble cadena (Valverde, R.A., *et al.*, 1990), asociándose a estructuras formadas por membranas intracelulares donde se encuentran algunas proteínas virales no estructurales tal como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp por RNA-dependent RNA polymerase), proteínas virales accesorias y factores celulares, estos elementos son conocidos como complejo de replicación viral (Cotton, S., *et al.*, 2009).



Esquema 1. Estructura del genoma del Virus del Jaspeado del Tabaco, se describen las funciones de las proteínas virales. Tomado y modificado de International Committee on Taxonomy of Viruses (2017).

1.4.1 Sintomatología.

Las hojas de plantas infectadas por TEV pueden mostrar moteado suave, arrugas, malformación y reducción de tamaño. Las infecciones en plántulas provocan entrenudos acortados y atrofiados; los frutos presentan moteado y tamaño reducido. El tomate, el tabaco y otras solanáceas además de plantas de otras familias taxonómicas como la pimienta, son las principales plantas hospederas de TEV (Esquema 2). Los síntomas pueden confundirse con otros virus como el *Virus de la Papa Y* (PVY por Potato Y Virus), el *Virus del Mosaico del Tomate* (ToMV por Tomato Mosaic Virus) e incluso con el TMV (Cerkauskas, 2005).



Esquema 2. Ejemplos de plantas de interés económico afectadas por TEV. Se muestra el desarrollo de jaspeado y deformación foliar.

1.4.2 Transmisión de TEV.

Los virus del género Potyvirus son transmitidos de manera no persistente por más de 25 especies de áfidos pertenecientes a la familia de insectos homópteros que se alimentan de materias vegetales y pueden desarrollar plagas perjudiciales (Hull, 2009).

La transmisión de TEV desde el áfido a la planta ocurre en menos de 10 segundos, y estos pueden mantenerse virulíferos por 1 a 4 horas. Se han registrado alrededor de 10 especies capaces de transmitir TEV, incluyendo *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis fabae* y *Myzus persicae*, siendo este último el vector más frecuente y más común en regiones templadas y tropicales (Figura 2). La transmisión por semilla de TEV no se ha reportado (Pernezny, et al., 2003; Cerkaskas, 2005; Roberts et al., 2004; Koike et al., 2006). Dado que los pulgones son los vectores que tienen una presencia altamente representativa en cultivos, son una vía importante para la diseminación de TEV (Dáder et al., 2017). Cuando el estilete del vector penetra el tejido vegetal infectado, el virus es rápidamente adquirido por el insecto (Blanc, 1997), se presume que la proteína auxiliar con actividad de proteasa codificada por virus (HC-Pro) actúa como puente molecular, mediando la retención reversible de viriones a sitios de unión en las partes bucales de los áfidos (Fernández-Calvino et al., 2010). Una pequeña cantidad de partículas virales son suficientes para permitir una transmisión eficiente. Adicionalmente, TEV también se transmite mecánicamente y mediante injertos, pero no mediante semillas (Cerkaskas, 2005; Lai et al., 2011).

Debido a los mecanismos de infección mecánica y biológica, TEV es responsable de pérdidas económicas en cultivos de interés agrícola. Actualmente las investigaciones se han enfocado en establecer estrategias de detección, control y erradicación de las infecciones virales en plantas infectadas (Wilfert Eckel y Lampert, 1993; Chen et al., 2014).

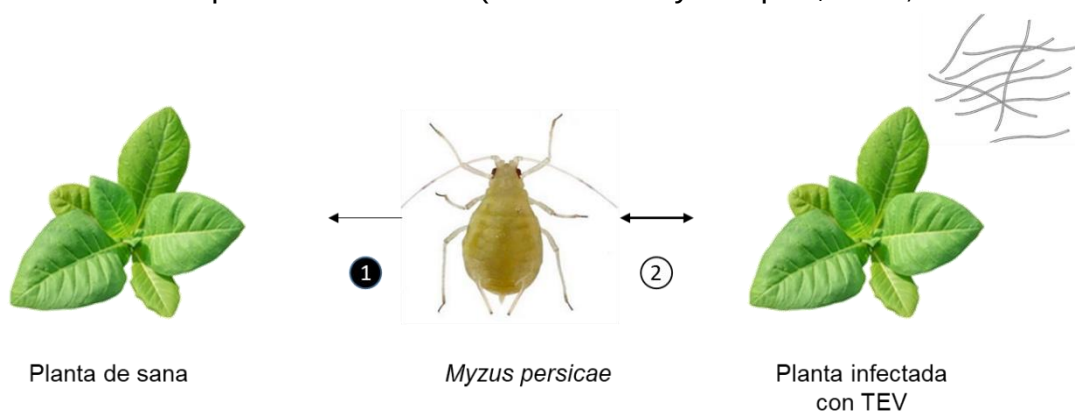


Figura 2. Ciclo de transmisión de TEV por *Myzus persicae*. Los áfidos se alimentan de tejido epidérmico de las plantas (1). Cuando se alimentan de una planta infectada (2), partículas virales se adhieren al aparato bucal del insecto. TEV persiste de manera no prolongada en el tejido bucal, cuando el áfido se alimenta de una planta no infectada el virus puede propagarse mediante la saliva del áfido e infectar células vegetales adyacentes, dando inicio al proceso de infección viral (Fernández-Calvino et al., 2010).

2. Respuesta de las plantas frente a infecciones virales.

Durante los procesos infecciosos asociados a patógenos en plantas, las maquinarias moleculares como la respuesta de hipersensibilidad (HR) y necrótica se activan, proporcionando a las plantas resistencia contra diversos patógenos como hongos, bacterias virus y posiblemente otros agentes infecciosos (Gómez, *et al.*, 2011).

Se ha observado que, durante las infecciones virales, la HR es iniciada por la proteína Avr/R, sus interacciones provocan cambios en las cantidades de hormonas como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET), así como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), estos cambios ocurren en tejidos infectados y adyacentes (Culver y Padmanabhan, 2007; Carret *et al.*, 2010; Pallas, V. y García, 2011; Mandadi y Scholthof, 2012). La HR afecta la homeostasis de Ca^{2+} , modifica la permeabilidad y potencial de la membrana celular, además de activar varias proteasas tipo caspasa, tales como las enzimas de procesamiento vacuolar que actúan principalmente como efectores de muerte celular o necrosis, también se ha descubierto la implicación en la activación de varias cascadas de señalización para inducir la expresión de múltiples genes, como aquellos que codifican a quinasas activadas por mitógenos, otros relacionados con la defensa de las plantas, tales como glucanasas y quitinasas, vinculados con proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Mur, *et al.*, 2007; Lawton, *et al.*, 1996). Los virus utilizan energía y proteínas de la célula hospedera. Durante cada etapa del ciclo viral se generan distintas interacciones entre la planta hospedera y el virus, si la planta desconoce la partícula viral como un agente patogénico, se establece una interacción compatible entre la planta hospedera y el virus, siendo estas interacciones favorables para el virus. Por el contrario, si la planta reconoce la partícula viral como agente patogénico, se establece una interacción incompatible, desfavorable para el virus. En estas condiciones, la planta desencadena respuestas de defensa que pueden limitar la replicación y/o el movimiento del virus (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

2.1 Control actual de los virus en plantas.

Debido al amplio número de hospederos que tienen los virus, además de la presencia de vectores de transmisión, ha dificultado el correcto diagnóstico por la similitud de síntomas generados por virus y otros organismos fitopatógenos. En la actualidad la falta de compuestos antivirales accesibles comercialmente, ha complicado el manejo de las enfermedades. Para poder realizar un adecuado manejo de enfermedades virales, el primer paso requerido es la identificación correcta del virus. Esto permitirá desarrollar estrategias de manejo, que dependerán de la forma por la cual un virus ingresa al cultivo, el mecanismo de transmisión viral entre plantas y el mecanismo de sobrevivencia en ausencia del cultivo (Haddidi *et al.*, 1998)

La búsqueda de fenotipos vegetales resistentes a virus ha permitido: además del uso de estrategias de control de vectores, la disminución en la pérdida de cultivos (Gómez y Hernández, 2013).

En México, la norma NOM-081-FITO-2001, sobre el *Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas*, establece los criterios que regulan el control y manejo de plantas infectadas con virus, en ella se mencionan las especificaciones para el manejo de cultivos afectados, además de las prácticas adecuadas para la destrucción de material vegetal infectado y métodos de control cuarentenario (SAGARPA, 2002).

Otros métodos para el manejo de virus en plantas han sido desarrollados y han generado resultados exitosos; algunas de las estrategias generadas son:

Termoterapia: El manejo de temperatura, ha mostrado ser eficiente para la degradación de virus y la supervivencia de la planta, ya que el umbral de sensibilidad térmica de algunos virus es menor que el de las células de la planta y el daño causado a los tejidos por el estrés térmico puede ser reversible, pero el daño al patógeno viral no (Spiegel *et al.*, 1993; Nukari *et al.*, 2009).

Quimioterapia: Ésta se basa en la aplicación de compuestos exógenos para disminuir la replicación o promover alguna respuesta endógena de las plantas (Panattoni y Triolo, 2013; Sidwell *et al.*, 1972).

La inhibición de la replicación del TMV en tabaco se ha logrado aplicando compuestos como el bitriazolilo, tyloforina B y porbitriazolilo (Xia *et al.*, 2006), derivados de cianoacrilato (Chen

et al., 2008) y derivados de la tiadiazoleacetamida (Zhao *et al.*, 2006). La aplicación foliar de cianuro estimula la respuesta de *Nicotiana benthamiana* contra el TMV (Liu *et al.*, 2015).

Cultivo de tejidos: Se basa en el aislamiento de pequeñas partes de plantas (puntas, meristemas y embriones somáticos) y su cultivo en medios artificiales en condiciones adecuadas para que las partes de las plantas puedan crecer y desarrollarse libres de patógenos como los virus (Hollings, 1965; Panattoni y Triolo, 2013). El tamaño del explante a utilizar como la punta del brote (5.0-10.0 mm) o la porción meristemática (0.2-0.7 mm) es un punto crítico para el logro de la erradicación del virus. Se debe considerar que cuanto más pequeña sea la porción de tejido, la concentración del virus puede ser más baja, debido a la poca irrigación por haces vasculares, no obstante, el tamaño de la cúpula meristemática determina la capacidad del explante para sobrevivir en un medio nutritivo específico y el tiempo requerido para establecer una nueva planta. Si el meristemo es pequeño, se necesitarán varios meses para obtener las plántulas nuevas (Faccioli, 2001).

Plantas transgénicas: El desarrollo de líneas de plantas transgénicas ha mostrado obtener resultados prometedores contra virus. Las investigaciones sobre la resistencia derivada de patógenos (PDR, por sus siglas en inglés) mediada por RNA de interferencia (RNAi) ha permitido el desarrollo de fenotipos transgénicos que permiten y estimulan la respuesta de las plantas contra las infecciones virales (Prins *et al.*, 2008; Kreuze y Valkonen, 2017).

3. Fitohormonas como biomoléculas implicadas en el sistema de respuesta frente a patógenos.

Las fitohormonas son un grupo de moléculas orgánicas que se encuentran en cantidades pequeñas en las células vegetales y están implicadas en la señalización de diferentes procesos fisiológicos (Davies, 2014). Estas moléculas estimulan respuestas en diversas etapas de desarrollo de la planta, como son la división celular, la diferenciación, la senescencia de las hojas y la apertura o cierre de los estomas, además de las respuestas a patógenos (hongos, bacterias, virus, nemaátodos, insectos, entre otros). Los efectos y concentraciones endógenas de las fitohormonas dependen de la especie vegetal, el estado de desarrollo de la planta, las interacciones y cantidades de otras hormonas y los factores ambientales (Gray, 2004). Algunas hormonas pueden regularse entre sí (Zhang, 2009).

Existen investigaciones que se han enfocado en analizar el efecto que tienen diferentes familias de hormonas durante las infecciones fitopatógenas, empleándose como moléculas para favorecer la respuesta contra estrés biótico (Zeevaart, 1988; Lee y Luan, 2012; Browse, 2009). La aplicación de fitohormonas ha sido usada para promover respuestas en las plantas contra infecciones virales. Por ejemplo, la aplicación exógena de JA en *Arabidopsis thaliana*, irrumpe la infección por geminivirus (Lozano-Durán, *et al.*, 2011), en otros casos la aplicación de ácido abscísico (ABA) y metil jasmonato, limita el movimiento del *Virus de la Necrosis del Tabaco* (TNV por Tobacco Necrotic Virus) y de TMV (Lozano-Durán *et al.*, 2011; Fraser y Whenham, 1989; Iriti y Faoro, 2008; Oka *et al.*, 2013). Usando la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se observó que la cantidad de brasinoesteroides (BRs) correlaciona con la tolerancia al *Virus del Mosaico del Pepino* (CMV por Cucumber Mosaic Virus), además de incrementar respuestas contra el estrés oxidativo y evitar daño en el fotosistema durante la infección viral (Zhang, D.-W., *et al.*, 2014).

3.1 Clasificación de las fitohormonas

Actualmente se conocen 6 familias de fitohormonas que juegan papeles importantes en el desarrollo y crecimiento de la planta (Tabla 2) además de otras moléculas que debido a su efecto también son consideradas como fitohormonas. El interés hacia estas moléculas se debe a que su aplicación ha sido asociada al aumento de la producción de diversos cultivos, así como la propagación de especímenes vegetales (Su *et al.*, 2017).

Tabla 2. Funciones y características generales de las fitohormonas.

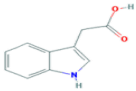
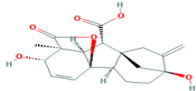
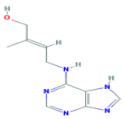
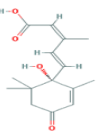
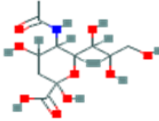
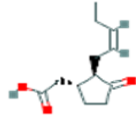
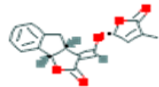
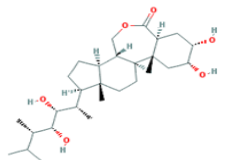
				as
Auxinas	 IAA	- Dependiente de Triptófano: (i) ruta indol-3-acetamida (IAM); (ii) vía ácido indol-3-pirúvico (IPA); (iii) vía triptamina (TAM); y (iv) vía indol-3-acetaldoxima (IAOX). [1] - No dependiente de triptófano.	- Diferenciación, división y elongación celular - Desarrollo de raíz, gravitropismo y respuesta fototrópica - Floración . Maduración y senescencia de frutos. - Retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes. - Dominancia apical.	Mano & Keiichiru, 2012 Woodward & Bartel, 2005
Giberelinas	 A3	- Vía temprana de no hidroxilación - Vía temprana 3-hidroxilación - Vía temprana 13-hidroxilación	- Alargamiento de tallo estimulando la división y elongación celular - Interrupción de la latencia de semillas - Indicación de masculinidad en flores dioicas - Desarrollo de frutos partenocárpico (sin semillas) - Retraso de la senescencia de hojas y frutos cítricos.	Sponsel & Hedden, 2004
Citoquininas	 Zeatina	- Vía de cis-zeatina (biosíntesis de cis-citoquininas) - Vía 7-N-glucósido - Vía 9-N-glucósido	- Promueve división celular, formación de callos en presencia de auxinas - Actúan en general junto con auxinas - Retrasa senescencia - Inhibe la dominancia apical	Frébor et al. 2011
Ácido abscísico	 Ácido abscísico	- Vía : 2-C metil-D-eritritol-4-fosfato. - Vía dependiente ácido mevalónico	- Dormancia de semillas. - Apertura y cierre estomático. - Morfogénesis embrional. - Síntesis de proteínas y lípidos . - Tolerancia a estrés abiótico: regula la expresión de genes sensibles a estrés y a la síntesis de proteínas LEA , además de enzimas antioxidantes y osmoprotectoras.	Hirai et al. 2000 Davies, 2010
Etileno	 Etileno	Vía ciclo de Yang: Conversión del aminoácido metionina en S-adenosil-L-metionina	- Maduración de frutos - Senescencia y abscisión de hojas, frutos y flores -Supresión de crecimiento de yemas - Dormancia de semillas	Iqbal, et al., 2017

Tabla 2 (Continuación...)

Ácido salicílico		• Vía de síntesis de los salicilatos	• Señalización e Inducción de la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis • Mejora la longevidad de las flores, inhibe la biosíntesis de etileno y la germinación de las semillas, bloquea la respuesta de la herida y revierte los efectos de ABA	Davies, 2010
Ácido salicílico				
Ácido jasmónico		• Vía de síntesis de los jasmonatos: a partir de alpha-linolenato. • Vía jasmonil-aminoácido conjugados	▪ Determinación de sexo, elongación de raíz y maduración de frutas. ▪ Respuesta de plantas frente a estrés biótico y abiótico.	Fonseca et al, 2009
Ácido jasmónico				
7-epi-Jasmonato				
Etringolactonas		• Vía dependiente de beta-caroteno mediada por caroteno isomerasa.	▪ Estimulan la ramificación y crecimiento de hongos micorrizicos. ▪ Promueve la simbiosis planta-hongos. ▪ Inhibe yemas apicales.	Akiyama, 2006 Alder et al. 2012
Etringolactona				
Brasinoesteroides		• Ruta de la síntesis de los esteroides: oxidación temprana y tardía del C6 y oxidación temprana del C22.	▪ División y elongación celular ▪ Diferenciación vascular ▪ Fertilidad ▪ Inhibición del crecimiento y desarrollo de la raíz ▪ Estimula la producción y biosíntesis de Etileno ▪ Respuesta a estrés biótico y abiótico. ▪ Fotomorfogénesis. ▪ Diferenciación vascular y estomática. ▪ Metabolismo de radicales de oxígeno.	Davies, 2010 Baiguz 2009
Brasinoesteroides				
Epibrasinolida				

3.2 Brasinoesteroides; hormonas esteroidales.

Los BRs son una familia de fitohormonas con una estructura esteroide polihidroxiada (Figura 3), estos compuestos fueron aislados en 1979 a partir de polen de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979), planta de la cual deriva el nombre. Fue hasta inicios de 1990 cuando el estudio de los efectos del silenciamiento de genes implicados en la biosíntesis y percepción de BRs se intensificó, observándose efectos como el desarrollo de hipocótilos cortos, deformación en semillas y plantas maduras, retraso en la floración, producción de peciolo corto y reducción en la fertilidad de los gametos masculinos (Li *et al.*, 1996; Szekeres *et al.*, 1996; Lia y Chory, 1997).

La primera ruta biosintética que se había establecido para la producción de BRs se basaba en dos vías paralelas: la vía de oxidación temprana del carbono 6 (C6) y la vía de oxidación tardía del C6 de la estructura esteroide (Fujioka *et al.*, 1998). Más tarde, con base en el hallazgo de la enzima hidroxilasa “DWF4” se dilucidó la vía de hidroxilación temprana del carbono 22 (C22) la cual es independiente de la molécula precursora de las rutas de C6 (Choe *et al.*, 1998, 2001).

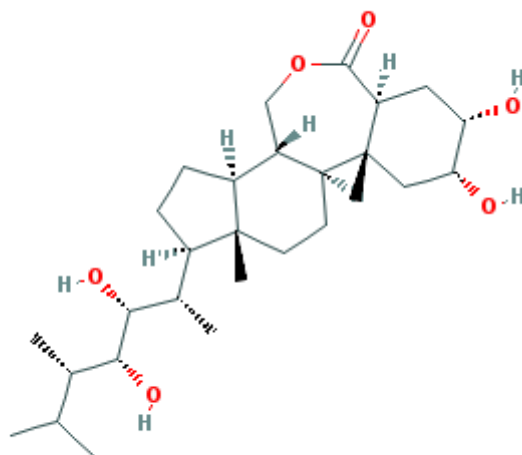


Figura 3. Estructura de la brasinólida, aislada de *Brassica napus* (Grove *et al.*, 1979).

3.2.1. Efectos fisiológicos de los brasinoesteroides.

Los BRs han sido hallados en varias especies de plantas, además, se han aislado en algas de agua dulce y algas pardas (Bajguz, 2009), lo que indica que son una familia de hormonas ampliamente extendida.

Esta familia de hormonas regula una amplia gama de procesos en el desarrollo de las plantas, así como la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (Bajguz y Hayat, 2009; Li *et al.*, 1996; Zhang, 2009) (Figura 4).

Se ha demostrado que moléculas análogas sintetizadas en laboratorio producen aumentos sustanciales en el rendimiento de grano, dependiendo del estado de crecimiento (Peña, 2012).

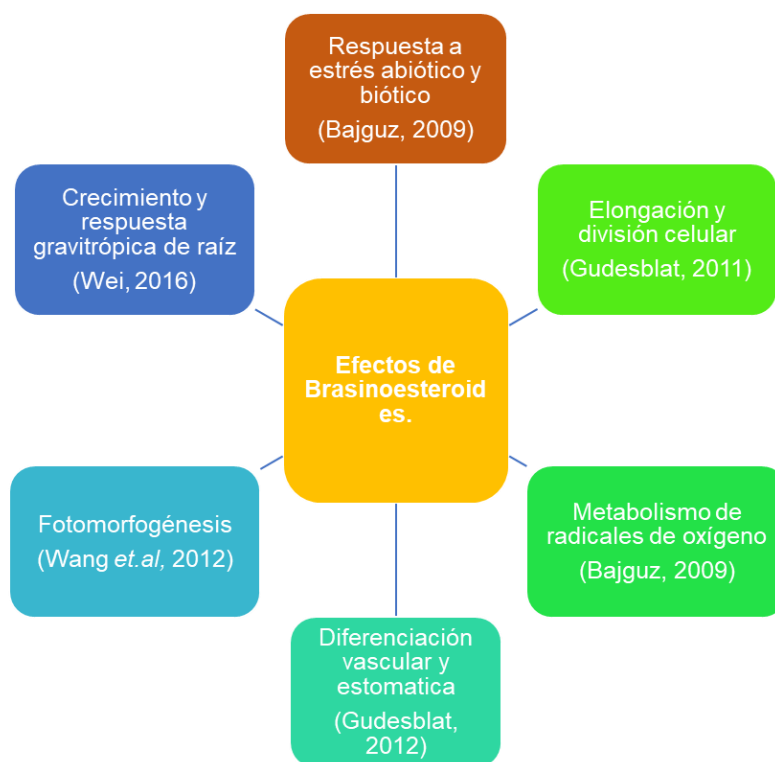


Figura 4. Efectos fisiológicos de Brasinoesteroides.

Se ha descubierto que los BRs pueden actuar en sinergismo o antagonismo sobre otras hormonas en la regulación de procesos de desarrollo en las plantas. Por ejemplo, se sabe que el ABA es necesario para establecer la latencia de la semilla durante la maduración del embrión e inhibir la germinación de la semilla (Finkelstein *et al.*, 2008), mientras que los BRs promueven la germinación de la semilla, posiblemente mediante un proceso de antagonismo que estimula el aumento del potencial de crecimiento del embrión (Steber y McCourt, 2001; Leubner-Metzger, 2001).

Se ha sugerido que los BRs actúan sinérgicamente con las auxinas para promover el alargamiento de las células. Plantas mutantes en la vía de síntesis de auxinas o BRs han mostrado defectos de desarrollo, incluido el fenotipo enano (Teale *et al.*, 2008; Halliday, 2004). Por otra parte, se ha demostrado que el componente de señalización de los BRs puede interactuar directamente con un componente de señalización de las auxinas (Vert *et al.*, 2008).

Algunos estudios fisiológicos han señalado que los BRs y las giberelinas (GA) aumentan el crecimiento de las plantas de manera aditiva, lo que sugiere que las dos hormonas pueden actuar de manera independiente a nivel celular sobre un mismo mecanismo (Gregory, 1982).

Otros efectos que se han observado tras la aplicación de BRs es la regulación de la biosíntesis de etileno a través de la ruta ACC sintasa (Hansen y Chae, 2009) así como del jasmononato (Figura 5) (Müssig *et al.*, 2000; Zhang, 2009). La biogénesis de etileno inducida por BRs resulta en la expresión de genes codificantes para PR, mismos que están implicados en la respuesta de la planta frente a patógenos como hongos, virus y bacterias (Belkhadir, 2012; Kombrink *et al.*, 1997; Neuhaus, 1999; Ebrahim y Singh, 2011).

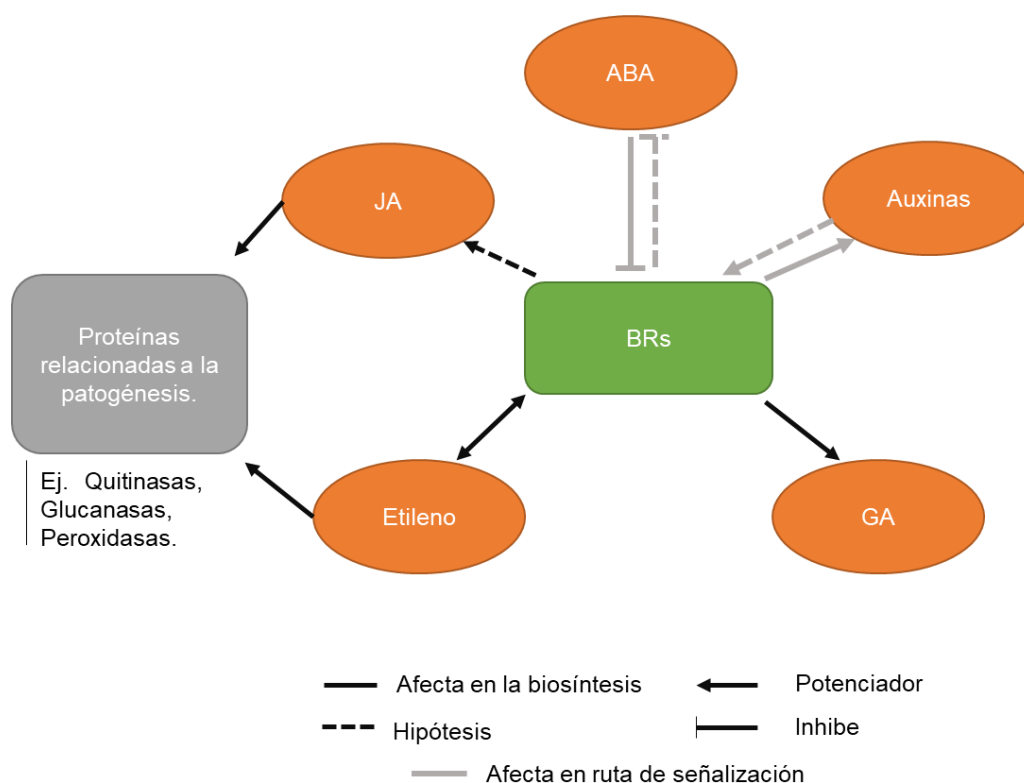


Figura 5. Interacciones de los BRs con algunas fitohormonas.
Tomado y modificado de Zhang, 2009.

Algunos compuestos análogos a brasinoesteroides han sido una alternativa para inducir en las plantas un mayor crecimiento, inducir mecanismos para incrementar la producción de biomasa o la resistencia a condiciones de estrés (Ramakrishna, y Rao, 2014; Jin *et al.*, 2015).

3.3 Compuestos promotores del crecimiento vegetal y su relevancia como fitohormonas.

En el laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP se han desarrollado compuestos promotores del crecimiento vegetal derivados de 22-Oxocholestanos producidos a partir de cadenas laterales esteroidales de diosgenina y hecogenina, con actividad similar e incluso superior a la de los BRs. Los resultados de su aplicación en cultivos como el arroz han mostrado que promueven el desarrollo (Zeferino-Díaz *et al.*, 2015), también se ha observado aumento en la biomasa de plantas de frijol además de inducir resistencia a estrés hídrico (Andrade, 2013; Peña, 2012), mientras que en plantas de variedades nativas de maíz, fue notorio un aumento en la acumulación de biomasa e inducción de respuestas de resistencia a estrés abiótico (Moreno, 2009; Zurita, 2011), no obstante, no se ha probado su efecto en plantas infectadas con algún patógeno.

Justificación

Hasta el momento se conocen 120 especies de plantas que pertenecientes a 19 familias vegetales que son hospederas de TEV, algunas de estas plantas poseen una gran importancia económica y alimenticia, tal como el tomate (*Solanum esculentum*), varias especies del género *Capsicum* (pimiento, chile), tomatillo (*Physalis ixocarpa*), ajo (*Allium sativum*) y tabaco (*Nicotiana spp.*) (Velasquez-Valle et al., 2010; Garzón, 2012).

El TEV se ha reportado en México desde 1971 en parcelas de chile en los estados de Guanajuato, Tamaulipas y Sinaloa (Pérez, 2004); otros reportes ubican a este virus en parcelas de los estados de Yucatán, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí (Pérez, 2004; Chew, 2007) y en la Región Lagunera que va de Coahuila a Durango (Kuhn, 1989). No existe información sobre las pérdidas provocadas por este virus en la República Mexicana, sin embargo, en el estado de Georgia en EEUU el promedio de incidencia de este patógeno durante un periodo de cinco años fue de 90% hasta 100% mientras que las pérdidas en ese mismo periodo variaron entre 15% y 50% (Saunders, 2003).

En México no se han realizado investigaciones sobre compuestos que prevengan o alivien las infecciones virales en plantas, aunque sí se usan algunos análogos de BRs para mejorar la calidad de los cultivos. En este trabajo se planteó probar el efecto de la aplicación de los CPCV generados en la BUAP en plantas infectadas con un aislado de TEV (TEV-TAMPS).

Hipótesis

Los CPCV aBSS4 y aBSS18 promueven en plantas de tabaco un sistema de defensa contra el *Virus del Jaspeado del Tabaco* mediante la inducción de genes involucrados en la resistencia a patógenos.

Objetivos

General

- Evaluar el efecto de los promotores de crecimiento vegetal aBSS4 y aBSS18 sobre plantas de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) infectadas con el *Virus del Jaspeado del Tabaco* (TEV-TAMPS).

Específicos:

- Examinar la propagación de la infección por TEV en las plantas de tabaco tratadas con los CPCV.
- Cuantificar mediante qPCR la cantidad de TEV en las plantas de tabaco tratadas con los CPCV.
- Analizar los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta a patógenos en las plantas de tabaco.
- Comparar los resultados obtenidos de los tratamientos aplicando los compuestos aBBSS4 y aBBSS18.

Materiales y métodos

1. Siembra y germinación.

En este trabajo se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como modelo biológico; las semillas de tabaco fueron provistas por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de plantas de la Facultad de Química de la UNAM. Las semillas fueron sembradas en una mezcla de sustrato peat moss (Premier, peat moss turbe), agrolita y vermiculita en una proporción 3:1:1. Para su germinación y crecimiento se mantuvieron durante 20 días en una cámara de germinación (Witeg, ThermStable GC-100, Alemania) en condiciones de crecimiento estándar: temperatura constante de 23 °C, 50 % de humedad relativa y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad.

Una vez que las plántulas presentaron hojas verdaderas, se transplantaron individualmente en macetas de 12.5 cm² con sustrato (peat moss:agrolita:vermiculita 3:1:1) y fueron mantenidas en la cámara de germinación bajo condiciones de crecimiento estándar.

2. Aplicación de los compuestos promotores de crecimiento vegetal aBSS4 y aBBSS18.

Los compuestos utilizados en esta investigación fueron proporcionados por el Doctor Jesús Sandoval Ramírez del laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Posteriormente a los 20 días. Las plantas de tabaco fueron sometidas a 6 tratamientos utilizando los compuestos denominados: aBSS4 y aBSS18, con los que se realizaron tratamientos previos a la inoculación de TEV-TAMPS (P04 y P18), y tratamientos posteriores a la inoculación con TEV-TAMPS (X04 y X18) también se establecieron dos tratamientos control, uno sin inóculo viral y otro con inóculo viral.

Los CPCV fueron preparados en una solución a 0.1 mg/L, considerando que experimentos anteriores han indicado que dicha concentración induce los mayores efectos en las plantas, así como en los microorganismos asociados a la rizósfera (Jiménez-Burton M.A., 2018).

Las soluciones de los CPCV aBSS4 y aBSS18 se aplicaron directamente al tejido foliar mediante un aspersor cada dos días durante 10 días para el caso del pretratamiento, y cada dos días durante 10 días para los tratamientos posteriores a la inoculación de TEV-TAMPS.

La inoculación se realizó un día después del último aspejado para los tratamientos, y el día posterior después de la inoculación para los postratamientos.

3. Inoculación de plantas de tabaco con TEV.

Plantas adultas de tabaco fueron infectadas con un macerado de tejido vegetal infectado con el aislamiento TEV-TAMPS (número de acceso ncbi: JX512813.1), provisto por la Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de plantas de la Facultad de Química de la UNAM. Utilizando un estilete, se realizaron heridas mecánicas directamente a hojas verdaderas aplicando el macerado a dos plantas por cada tratamiento (replica experimental).

4. Análisis molecular.

4.1 Extracción de RNA a partir de plantas de tabaco

El RNA total se obtuvo a partir de 0.1 gramos de hojas jóvenes (sistémicas) utilizando el kit TRIZOL Reagent (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, el RNA se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La integridad, calidad y cantidad del RNA total fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y la medición por espectrofotometría de las absorbancias a 260 y 280 nm (anexo 1).

4.2 Síntesis de DNA complementario (cDNA) mediante reacciones de transcripción reversa (RT).

Las reacciones de RT se realizaron con el kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Scientific, California USA) en un volumen final de 20 µl, usando 1 µg de RNA total, 1 µl de oligodT 10 mM, 4 µL de solución de reacción RT 5X, 1 µl de dNTPs 10 mM, y 0.3 µl de enzima M-MMLV reverse transcriptase, completando el volumen a 20 µL con agua estéril. Las reacciones fueron incubadas en un termociclador BIORAD-T100 a 42 °C durante 60 minutos.

4.3 Diseño de oligonucleótidos de transcritos relacionados con la respuesta viral.

Con la finalidad de analizar la presencia y acumulación viral, así como la expresión de genes relacionados con respuestas de defensa a infecciones virales en tabaco.

Para obtener cDNA correspondiente al genoma de *TEV*. Los oligonucleótidos corresponden de la región CP a la región no traducible 3' (Esquema 1). Los mRNA diana seleccionados fueron: *NtEF1 α* : factor eucariótico de elongación de traducción, en investigaciones previas, se ha expuesto la relación en procesos de anclaje para traducción y replicación viral (Li et al., 2013). *NtERF-5*: Ethylene Response Factor 5, factor de transcripción, involucrado en cascadas de señalización para la activación de genes durante estrés biótico y abiótico (Fischer y Droge-Laser, 2004). *NtCHI-III*: quitinasa reportado como gen expresado bajo infecciones fúngicas y virales, inducido por la familia de factores de transcripción ERF (Samac, 1990). El mRNA para la subunidad ribosomal 18S se utilizó como control de carga y calidad de síntesis de cDNA.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos correspondientes al mRNA o cDNA de genes seleccionados a partir de literatura consultada, considerando su relación en la respuesta frente a estrés biótico y abiótico (Fischer y Droge-Laser, 2004) y su expresión durante infecciones fúngicas y virales (Samac, 1990). Las secuencias fueron extraídas de la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information), los oligonucleótidos se diseñaron empleando el software de acceso libre Primer Blast, Oligo Analyzer y Geneious 4.8.5. (Tabla 3).

Tabla 10. Oligonucleótidos diseñados para amplificar cDNA de genes diana relacionados con la respuesta viral en plantas de *Nicotiana tabacum* (Nt) y de la región CP a 3' de del genoma de TEV.

Genes		Secuencia	tamaño (pb)	Tamaño producto (pb)	Tm	Referencia
<i>NtERF5</i>	Fw	GTCGTCTTCCGTCGTTGACC	20	264	61	Fischer y Droge-Laser, 2004
	Rv	CACATGCTTTCCTTCGCCAC	20			
<i>NtBCHIII</i>	Fw	GGACTTCCAGCAGCCAAGAC	20	196	60	Samac <i>et al.</i> , 1990
	Rv	GGGCGCCTTGTTTCATTGACA	20			
<i>NtEF1α</i>	Fw	CACATCAACATTGTGGTCATTGG	23	243	60	Thivierge <i>et al.</i> , 2008
	Rv	GCAGTAGTACTTGGTGGTCTC	21			
<i>TEV</i>	Fw	ACGGCACACAGCACATGA	18	247	60.3	
	Rv	CTCGCACTACATAGGAGAATTAGAC	25			
<i>Nt18S</i>	Fw	GTTGGCCTTCGGGATCGGAGTA	22	159	60	
	Rv	TCGAGCCCCCAACTTTCGTTCT	22			

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.

A partir del RNA total procedente de las plantas, se generaron los cDNA y se sometieron a PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 3). Los productos de las PCR fueron resueltos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Con la finalidad de corroborar la eficiencia de la reacción de RT-PCR (Veáse punto 4.2), se amplificó un fragmento de 159 pares de bases del cDNA 18S ribosomal.

Las reacciones de PCR punto final se realizaron con el kit Dream Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, California USA) utilizando los siguientes componentes: 1 μ L de solución de reacción, 0.2 μ L de dNTPs 0.2 μ M, 0.2 μ L de oligonucleótidos Fw y Rva 10 mM, 7.7 μ L de H₂O, 0.2 μ L de Dream Taq DNA Polymerase y 0.5 μ L de cDNA. Todas las reacciones se hicieron por duplicado. Las condiciones óptimas para las reacciones de amplificación de los cDNAs diana fueron previamente estandarizadas mediante protocolos de PCR de gradiente tomando como referencia la Tm° provista por el fabricante *Sigma-Aldrich*® (Tabla 3).

4.5 Análisis cuantitativo de la presencia de TEV y expresión de mRNAs.

Las reacciones de qPCR se realizaron con el kit EXPRESS SYBR GreenER, qPCR SuperMix Universal (Invitrogen, Thermo Scientific, California, USA) usando 6 µL de SYBR-GREEN, 1 µl de cDNA, 0.4 µl de oligonucleótidos Fw y Rv 10 mM, 0.24 µL de ROX 10 mM, y 4.36 µl de agua estéril, las reacciones fueron preparadas en una campana de flujo laminar y posteriormente se corrieron en un termociclador 7500 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) ubicado en el Centro de Detección Biomolecular de la BUAP. Los niveles de expresión relativa fueron calculados después de la normalización con el gen de referencia 18S usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y fue representado como veces de cambio con respecto a la condición control. Las mediciones de qPCR tiempo real se realizaron 3 veces por cada para de oligonucleótidos diseñados.

Resultados

1. Efecto de los compuestos aBSS4 y aBSS18 durante la infección por TEV en *N. tabacum*.

Se ha reportado previamente el efecto de los CPCV en el desarrollo de las plantas así como el efecto en los microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de maíz (Jiménez-Burton, M. A. 2018; Peña 2012; Moreno, 2009; Zurita, 2011), en éste trabajo se ha evaluó el efecto de los compuestos aBSS4 y aBSS18 en la infección con TEV-TAMPS, realizando un tratamiento previo o posterior a la inoculación, en ambos casos, los compuestos promotores crecimiento vegetal, indujeron la atenuación de los síntomas asociados a TEV-TAMPS en comparación del control viral (CV) (Figura 6), en el caso de las plantas tratadas previamente con el compuesto aBSS18, no desarrollaron síntomas en las hojas sistémicas mostrando un aspecto similar a las plantas que no fueron inoculadas con TEV (Figura 6, X18).

Las plantas que recibieron los tratamientos posteriores a la inoculación desarrollaron síntomas con menor severidad que las plantas CV, aunque los síntomas son más visibles en las plantas que recibieron el pretratamiento.

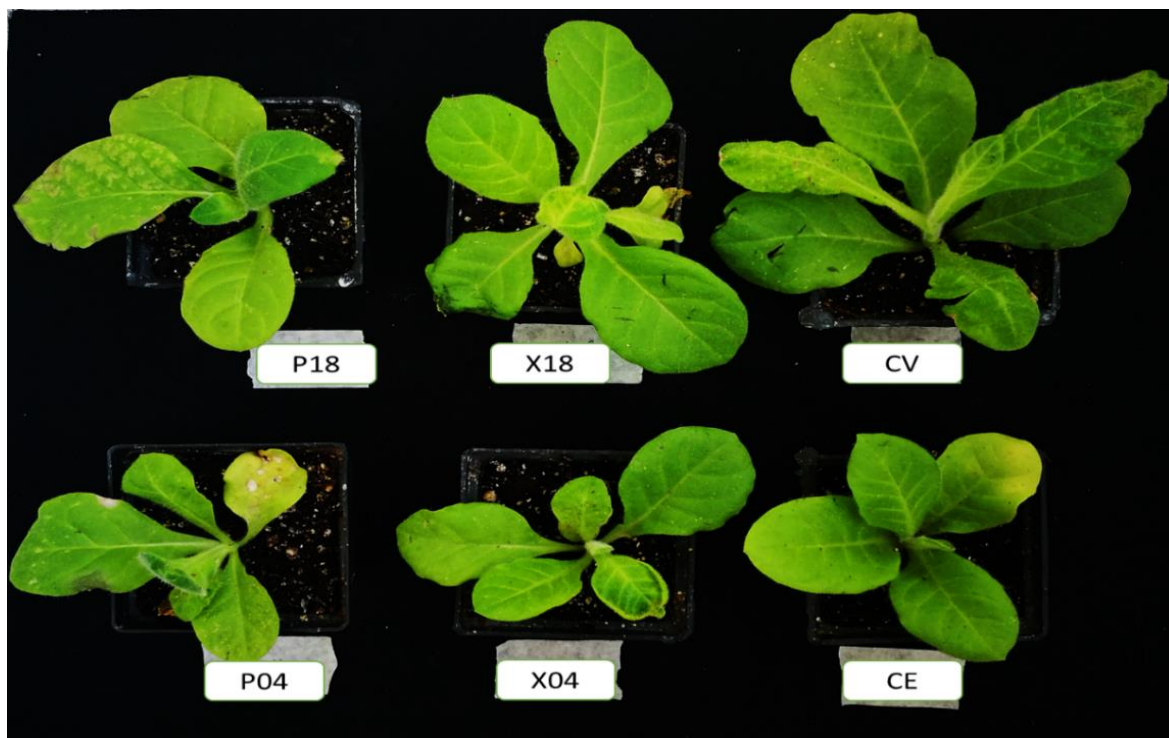


Figura 6. Efecto de los CPCV aBSS4 o aBSS18 en plantas de *Nicotiana tabacum* inoculadas con TEV. P18) pretratamiento con el aBSS18; X18) postratamiento con el aBSS18; P04) pretratamiento con el aBSS4; X04) pos tratamiento con el aBSS4; CV) control con inoculación viral y sin aplicación de los CPCV; CE: control experimental sin inoculación y sin aplicación de los CPCV.

2. Efecto de los CPCV aBSS4 y aBSS18 en la carga viral.

Dado que se observaron diferencias en el desarrollo de síntomas en las plantas de tabaco bajo los diferentes tratamientos, nos interesó saber si estas diferencias estaban relacionadas con variaciones en la carga viral, para responder a esta interrogante se cuantificó la carga viral en las plantas infectadas previamente o posterior al tratamiento con CPCV (Figura 7B).

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación con los oligonucleótidos que se generaron, se procedió a realizar experimentos de PCR en tiempo real, para obtener la cuantificación relativa de la carga viral en las plantas. Este experimento mostró que en las plantas de tabaco que recibieron el pretratamiento con los CPCV hubo una menor acumulación de TEV-TAMPS con respecto al CV, habiendo una disminución de más del 60% en las plantas con el pretratamiento con aBSS4 y casi un 100% en las plantas con el pretratamiento con el compuesto aBSS18. Cuando el tratamiento con los CPCV fue aplicado después de la inoculación viral, se observó una acumulación mayor de TEV-TAMPS en plantas tratadas con el compuesto aBSS4 con respecto al CV, pero hubo una represión de 0.8 veces de cambio de TEV-TAMPS en las plantas tratadas con el compuesto aBSS18 con respecto al CV, sugiriendo que este compuesto podría inducir algún sistema de respuesta ante la infección viral (Figura 7A) aún después de la infección.

Las plantas del grupo denominado control experimental (CE) no fueron inoculadas con TEV-TAMPS, por lo que no se observó acumulación de RNA viral.

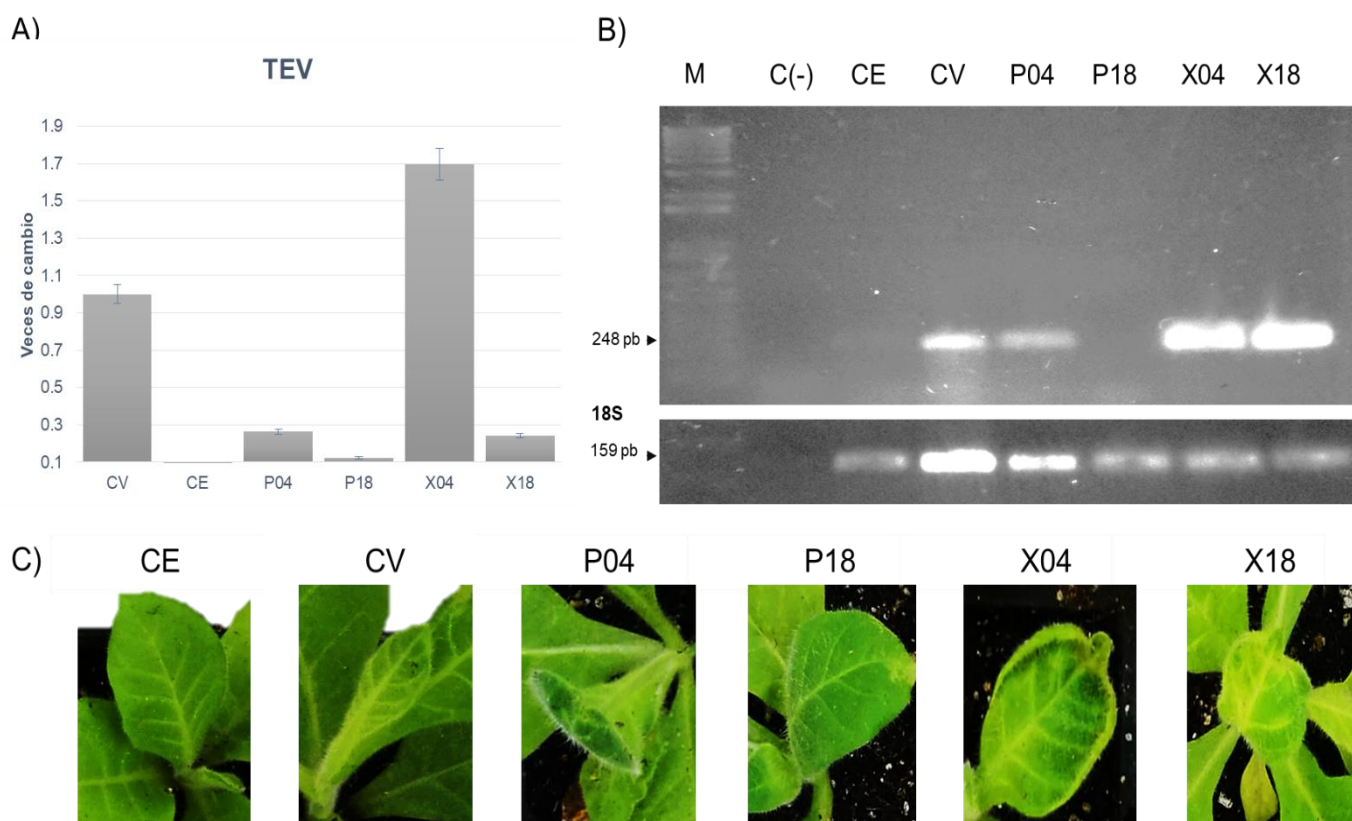


Figura 7. Acumulación de RNA viral y síntomas de la infección por TEV-TAMPS en hojas jóvenes de plantas de tabaco tratadas con CPCV. (A) Cuantificación por qPCR de TEV-TAMPS; (B) Detección de TEV-TAMPS por RT-PCR; (C) Apariencia de las hojas jóvenes de tabaco inoculadas con TEV-TAMPS. CE: control experimental; CV: control viral; P04: pretratamiento aBSS; P18: pretratamiento aBSS18; X04: postratamiento aBSS4; X18: postratamiento aBSS18.

3. Cuantificación de los niveles de expresión de genes asociados a la infección y viral.

Se ha observado que los CPCV generados en la BUAP tienen un efecto potenciador del desarrollo de las plantas incluso mayor a otras fitohormonas (Peña, 2012), otro trabajo realizado en nuestro grupo de investigación demostró que compuestos CPCV inducen cambios en la expresión de genes. Basándonos en estos antecedentes, nos enfocamos a analizar la expresión de genes asociados a la infección por patógenos en plantas infectadas con TEV-TAMPS antes o después del tratamiento con los compuestos aBSS4 y aBSS18. En plantas, se ha demostrado desde hace más de dos décadas que algunos componentes celulares como los factores de elongación y de inicio de la traducción, están asociados a la replicación de virus de RNA en modelos animales, vegetales y bacterianos. En *Arabidopsis thaliana* y en *Nicotiana benthamiana* El factor de elongación eucariótico 1-alfa (eEF1 α) interacciona con la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la proteína VPg del virus

del mosaico del nabo (TuMV) en *Arabidopsis thaliana* y en *Nicotiana benthamiana*, además el del aumento del nivel de eEF1 α se ha correlacionado con la infección por TuMV en las plantas mencionadas (Thivierge et al., 2008; Cotton, S., et al., 2009). De igual forma, se ha señalado que diversos factores transcripcionales (FT) que regulan diversos procesos del desarrollo de las plantas están implicados en la respuesta a patógenos, entre estos se han encontrado a los factores de respuesta a etileno (ERF por ethylene response factor), ampliamente distribuidos en especies del reino vegetal (Riechmann y Meyerowitz, 1998). Algunos factores, como NtERF1 y NtERF4, se han caracterizado, y tienen afinidad a cajas GCC encontradas en varios promotores de genes PR (Ohme-Takagi y Shinshi 1995, Ohta et al., 2000), particularmente el ERF-5 se ha relacionado en la respuesta de plantas frente infecciones virales (Son, G. H., et al., 2011; Huang et al., 2016). Una de las proteínas presentes durante la infección por patógenos y cuya expresión es inducida por factores transcripcionales ERF son las quitinasas, se ha reportado que la expresión de estas es estimulada durante la infección por virus (Mur et al., 2007), al igual que durante fenómenos de estrés abiótico (Son, 2011). En los siguientes párrafos se expondrá los resultados obtenidos con los mRNA diana mencionados previamente.

Los niveles de expresión de NteEF1 α fueron cuantificados en las plantas de tabaco con los diferentes tratamientos. NteEF1 α incrementa su expresión en plantas infectadas con TEV-TAMPS (plantas CV); en comparación con el CE que tiene una expresión basal, pero se observa una represión de la expresión de NteEF1 α de 0.6 veces de cambio en el pretratamiento y 0.4 veces en el postratamiento con el compuesto aBSS4 con respecto al CV. En los tratamientos con el compuesto aBSS18, los niveles de expresión de NteEF1 α en el pretratamiento se suprimen a un mayor grado, aproximadamente 0.95 veces de cambio, de igual forma el postratamiento tiene una supresión de 0.9 veces de cambio, sugiriendo que el compuesto tiene un efecto mayor de supresión de la expresión del factor de elongación con respecto a CV (Figura 8A).

Los niveles de expresión de NtERF-5 fueron analizados en las plantas de tabaco tratadas con los CPCV e inoculados con TEV. Se observó que los niveles de expresión de NtERF-5 mantenían un patrón similar al de NteEF1 α , incrementándose más de 20 veces en el CV con respecto al CE, pero en las plantas con el pre y postratamiento con el compuesto aBSS18, los niveles de NtERF-5 se mantuvieron cercanos a los de las plantas CE, mientras que en las plantas con el pretratamiento con el compuesto aBSS4, la expresión de NtERF-5 se reprímio a 0.7 veces de cambio con respecto al CV y en las plantas con el

postratamiento a 0.5 con respecto al CV (Figura 8B). De nueva cuenta, el compuesto aBSS18 suprime a un mayor grado la expresión de los genes diana.

La expresión de la quitinasa NtCHI-III fue cuantificada en este trabajo, se observó que NtCHI-III al igual que NtEF1 α y NtERF-5, sufre una represión en su expresión en las plantas tratadas con los CPCV con respecto al CV. En el pretratamiento con el compuesto aBSS18 se observó una supresión mayor en la expresión de NtCHI-III, aproximadamente 0.99 veces de cambio con respecto al CV, aunque la supresión fue menor en las plantas con el postratamiento, aproximadamente 0.9 veces de cambio. Por otra parte, se observó una represión de 0.9 veces de cambio en la expresión de NtCHI-III en las plantas pretratadas con el compuesto aBSS4 con respecto a la condición CV y 0.8 veces de cambio en las plantas con el postratamiento (Figura 8C).

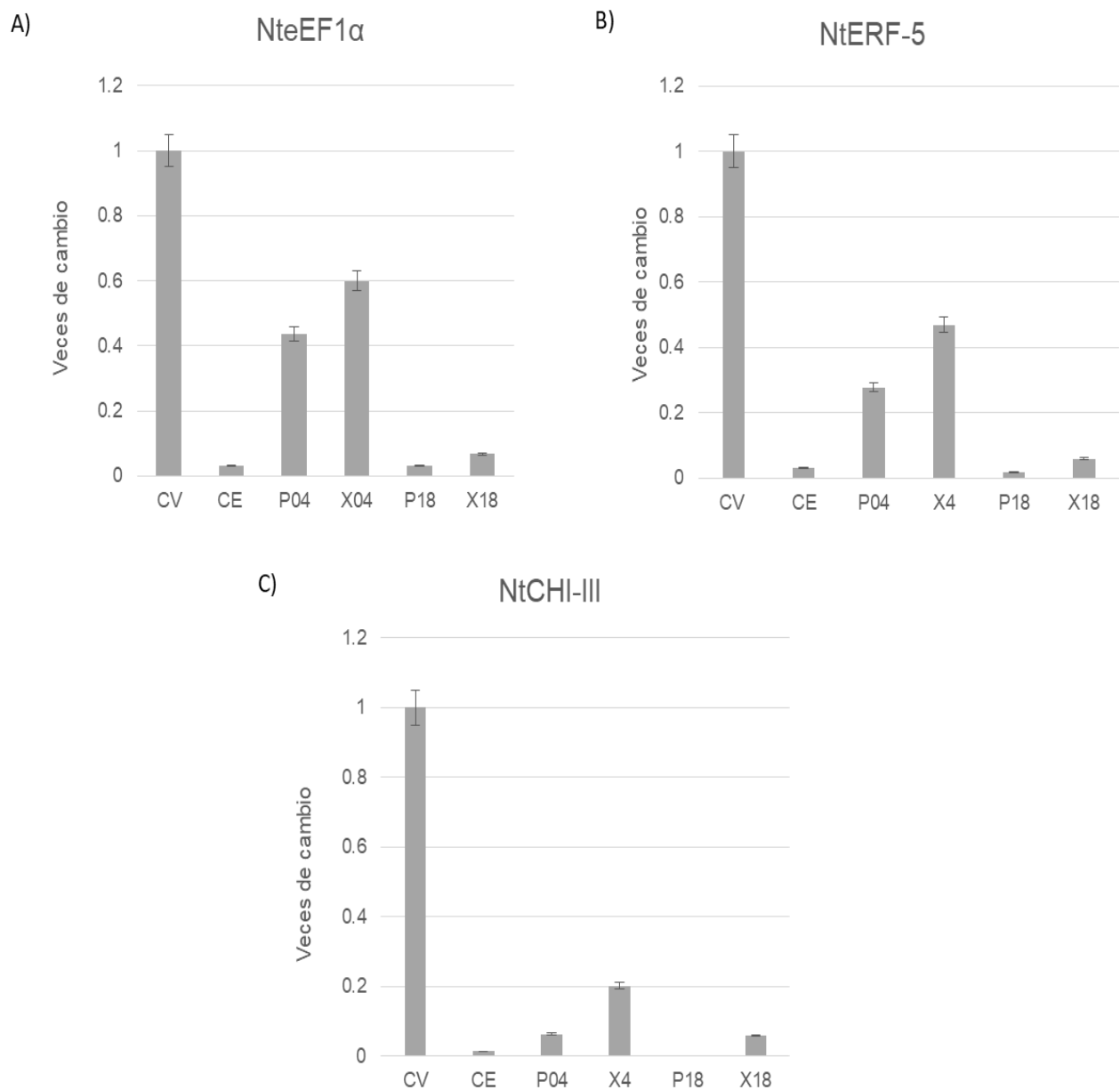


Figura 8. Acumulación de transcritos de genes asociados a la infección viral. qPCR tiempo real A) Nt-eEF1 α : factor eucariótico de elongación de traducción 1 α . B) NtERF-5: ethylene response factor 5, (C) NtCHI-III: quitinasa. Tratamientos: CV: control viral, CE: control experimental, P04: pretratamiento aBSS4, P18: pretratamiento aBSS18, X04: postratamiento aBSS4, X18: postratamiento aBSS18.

Discusión de resultados.

En la BUAP se generó una familia de CPCV de base esteroidal, su aplicación en plantas ha inducido cambios en el desarrollo (Zeferino-Diaz et al., 2015), en la acumulación de biomasa (Peña, 2012), en la germinación y la floración (Rojas, 2012), además de tener efecto en los microorganismos asociados a la rizósfera de plantas de maíz que recibieron tratamiento con los compuestos durante la imbibición de la semilla (Jimenez-Burton, M.A. 2018). Aunado a esto, algunos datos generados en nuestro laboratorio sugieren que los CPCV podrían inducir respuestas en las plantas que les permiten resistir el estrés abiótico y biótico (Fulanito de tal., 20XX), basándonos en estos antecedentes el presente trabajo se enfocó a evaluar el efecto de los CPCV aBSS4 y aBSS18 durante el estrés biótico causado por la infección por el virus TEV.

1. Desarrollo de la infección por TEV y el efecto de los CPCV.

El TEV es un virus que infecta un gran número de plantas, como tomate, pimiento, tabaco y otras solanáceas que son sus principales hospederos. Sus síntomas van desde moteado suave, arrugas, malformación y reducción de tamaño, mientras que en plántulas provocan entrenudos acortados y atrofiados y en los frutos provocan moteado y tamaño reducido (Cerkaskas, 2005; Shepherd y Purcifull, 1971). Durante el desarrollo de este trabajo, se probó el efecto de los CPCV aBSS4 y aBSS18 en la infección por TEV-TAMPS observándose diferencias en el desarrollo de los síntomas en las plantas bajo los tratamientos con los CPCV. En las plantas de tabaco, TEV-TAMPS provocó malformación y amarillamiento del tejido foliar. Sin embargo, las plantas tratadas con el CPCV aBSS18 antes o después de hacer la inoculación con TEV mostraron menor severidad de las lesiones con respecto al control viral (Figura 7C).

Dado que se observó diferencia en el desarrollo de síntomas asociados a TEV en las plantas de tabaco con los diferentes tratamientos, se realizó la cuantificación de la carga viral.

2. Efecto de los CPCV en los niveles de mensajero viral.

Las fitohormonas son cada vez más reconocidas por tener un papel esencial en las interacciones planta-patógeno. Se sabe que las fitohormonas SA, JA y ET están involucrados en las respuestas de defensa para mitigar el estrés biótico en las plantas. (Robert-Seilaniantz, 2011; Zhu et al., 2014). Las vías de señalización de estas hormonas influyen mutuamente a través de una red compleja de interacciones sinérgicas y antagónicas (Kooornnef, 2008). En muchos casos, el ET actúa como un modulador de las respuestas de la planta a SA o JA. Las nuevas evidencias sugieren que algunas otras hormonas vegetales, como el ABA, el GA, las citoquininas, las auxinas y los BRs, también desempeñan papeles críticos en las interacciones planta-patógeno (Robert-Seilaniantz, 2011; Pieterse et al., 2009).

Nuestros resultados muestran que las plantas de tabaco a las que se aplicó el CPCV aBSS18, previa o posteriormente a la inoculación con TEV-TAMPS, se acumuló una menor cantidad de RNA viral, en el caso de las plantas pretratadas con el mismo compuesto la cantidad de RNA viral es comparable a la condición CE. En las plantas pretratadas con el compuesto aBSS4 también se observó una disminución de la acumulación de TEV-TAMPS, sin embargo, en las plantas que recibieron el tratamiento posterior a la inoculación con TEV-TAMPS, se acumuló una mayor carga de RNA viral, aproximadamente 0.7 veces mayor que en el CV (Figura 7A). Estos resultados sugieren que el compuesto aBSS18 es más efectivo que aBSS4 para el control de la infección por TEV en plantas de tabaco y podría ser usado en la prevención o disminución de la infección viral, aunque es necesario probar su efecto en otras especies y/o variedades de plantas infectadas por TEV, así como por otras especies virales. Trabajos donde se ha evaluado el efecto de la homobrasinólida durante la infección por el CMV indican que dicho compuesto podría inducir una respuesta a nivel nuclear que permite activar mecanismos de resistencia contra virus (Zhu, et al., 2015), es posible que otros compuestos análogos a los brasinoesteroides como los compuestos aBSS4 y aBSS18 activen las mismas respuestas en la defensa contra virus, no obstante, se desconoce la respuesta molecular estimulada por los CPCV.

3. Estimulo molecular inducido por los CPCV durante la infección por TEV-TAMPS

En este trabajo, se observó que los compuestos denominados aBSS4 y aBSS18 estimulan diferentes niveles de protección contra la infección por TEV en *Nicotiana tabacum*, estos resultados sugieren que los CPCV podrían actuar sobre la expresión de genes relacionados con los mecanismos de replicación viral y/o de defensa ante infecciones virales en plantas.

La supresión de eEF1 α en los tratamientos, podría estar implicando una disminución en la eficiencia de replicación viral, en otras especies virales, se ha relacionado el aumento de este factor durante la infección, principalmente en vesículas complejas de replicación (Thivierge et al., 2008). Esto podría indicar que la replicación y/o traducción de TEV podrían estar afectadas debido a la ausencia o baja presencia de eEF1 α , impactando negativamente la carga viral, siendo el compuesto aBSS18 más efectivo para controlar la infección viral.

La aplicación de compuestos ha permitido realizar tratamientos de quimioterapia contra infecciones virales (Panattoni y Triolo, 2013), por ejemplo, la aplicación de cianuro (CN). En *Arabidopsis thaliana*, el CN induce la reducción en la acumulación de la carga viral de algunos virus, como el Virus de Aclaramiento de las Nervaduras del Nabo (TVCV) y promueve la necrosis de las células durante la respuesta hipersensible de la planta evitando la movilización vía sistémica del TuMV (Shi et al., 2012; Wong et al., 2002). Se ha visto que las plantas pueden liberar CN como subproducto durante la biosíntesis de etileno (Siegien y Bogatek, 2006; Siefert, 1995). En tomate, la aplicación poscosecha de homobrasinolida; un compuesto análogo a los BRs, aumenta la expresión del gen para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa, involucrado en la biogénesis del etileno, como resultado de la producción de esta fitohormona se produce CN (Shi et al., 2006; Woeste et al., 1999; Zhu et al., 2015; Siefert, 1995; Bajg, 2009; Kombrink et al., 1997; Neuhaus, 1999). Es posible que el compuesto aBSS18, actúa de manera similar a la homobrasinolida, induciendo la biogénesis de etileno y produciendo CN. En experimentos donde se ha evaluado los niveles de cianuro en procesos infección por patógenos en plantas, se ha observado que puede inducir a la muerte celular debido al nivel de toxicidad del compuesto, evitando así la movilización de algunos patógenos (Siegien y Bogatek, 2006). Es posible que los CPCV estimulen la liberación de CN lo que ocasionaría la muerte celular en las hojas verdaderas de las plantas tratadas e infectadas.

El ET, es una fitohormona expresada durante la respuesta a estrés biótico y abiótico en plantas, está implicado en la expresión de genes PR (Geraats, 2007). El aumento de producción de ET, se refleja en el incremento de la expresión de activadores transcripcionales que son activados por etileno (Heyman et al., 2013). Los factores de transcripción ERF están implicados en la señalización de la respuesta a estrés biótico y abiótico (Kizis et al., 2001; Ohme-Takagi et al., 2000). La sobreexpresión de los genes ERF da como resultado una mayor tolerancia al ataque de patógenos (Berrocal-Lobo, 2002; Gu, 2002; He, 2001; Park et al., 2001).

En tabaco, uno de los factores de transcripción para la expresión de proteínas PR es ERF-5 (Fischer y Droge-Laser, 2004). Durante el análisis de la expresión de genes implicados en la infección viral, se observó un aumento de la expresión de ERF-5 (Fig 8 B), en las plantas de tabaco infectadas con TEV-TAMPS y donde se aplicaron los compuestos aBSS4 y aBSS18 como pre y postratamiento, se observa una represión de ERF-5 sugiriendo que el control de la infección podría ser auxiliado de mecanismos inducidos por dicho factor de transcripción. Los factores pertenecientes a la familia ERF, estimulan la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), entre ellas glucanas, quitinasas, peroxidasas entre otras (Kombrink et al., 1997). Nuestros resultados sugieren que ERF-5 sufre una represión en comparación con el CV, probablemente por la disminución en la carga viral que se encontró en las muestras. La baja presencia de carga viral en los tejidos que fueron tratadas con los CPCV, podría estar relacionado con el bajo estímulo para la expresión de ERF-5.

Como se menciona en el párrafo anterior, las quitinasas, son proteínas pertenecientes al grupo de las PR (Kombrink et al., 1997; Neuhaus, 1999). Los datos obtenidos muestran que durante la infección por TEV existe un aumento considerable en la expresión del gen CHI-III (Quitinasa tipo III) en tejido con los síntomas de la enfermedad, en plantas de *Capsicum chinense* infectadas con el virus del moteado level de los pimientos, se encontró que diferentes quitinasas, entre ellas CHI-III sufre un aumento en su nivel de expresión (Elvira et al., 2008). La aplicación de los CPCV regula la expresión de CHI-III en plantas inoculadas con TEV-TAMPS. La represión de los mRNA de quitinasas, podría estar relacionado; de igual forma como ocurre con ERF-5, a la baja carga viral que está presente en las plantas tratadas. Sin embargo, en el CV, la planta es estimulada para expresar proteínas relacionadas a la patogénesis debido al estrés generado por la presencia del virus. El pretratamiento aBSS18, mostró una menor acumulación de transcrito viral en las

hojas jóvenes (Figura 7A). La ausencia o nula presencia de partículas virales generado por los CPCV, podría estar relacionado con la represión de los mRNA diana, principalmente en los tratamientos P18 y X18, los cuales mostraron una menor expresión en comparación con los tratamientos P04 y X04, que presentan una mayor acumulación de carga viral, pero aún así, menor que en el CV. El compuesto aBSS18 tiene un efecto positivo (Figura 8) en plantas infectadas por TEV, tal como se observó en el fenotipo del pre tratamiento 18 (P18) (Figura 7C). La medición de la expresión de genes asociados a respuestas contra enfermedades permite investigar la función de los CPCV en el proceso de infección viral, sin embargo, la abundancia de los transcritos no es una confirmación de la función propia de los genes, pues la expresión genética también es regulada a nivel de la síntesis proteica.

Se requiere estudios minuciosos sobre la interacción de los CPCV con los receptores celulares y las cascadas de señalización que estuvieran afectando directa o indirectamente a los genes implicados a los BRs; los cuales comparten una estructura similar. Debido al alto costo de ese tipo de metodología, no pudo ser desarrollado, pero permitiría comprender mejor a nivel molecular los efectos en la expresión y regulación de genes.

Un análisis transcriptómico permitiría analizar la expresión de otros genes durante la respuesta viral por parte de la planta. Permitiendo desarrollar mutantes en modelos biológicos de aquellos genes que se hayan observado con cambios significativos para comprender la interacción de los CPCV. De igual forma se podría estudiar otras especies virales de la misma familia e investigar si los efectos son similares a los observados en esta investigación.

Conclusiones

La aplicación de los CPCV tiene efectos diferenciales durante la infección de TEV-TAMPS en plantas de tabaco.

Se puede concluir que:

- 1) Ambos compuestos tienen un efecto protector contra la infección por TEV, pero el compuesto aBSS18 mostró una mayor efectividad.
- 2) Los tres genes analizados están implicados en la respuesta a la infección por TEV en *Nicotiana tabacum*.
- 3) Los CPCV parecen regular diferentes mecanismos como la síntesis de proteínas virales y la señalización mediada por fitohormonas como Etileno.
- 4) Probablemente los CPCV sustituyan la participación del etileno, debido a que en ausencia de CPCV aumenta la expresión de ERF-5 y en presencia de CPCV, ERF-5 se reprime, lo que sugeriría que al tener presentes los análogos de brasinoesteroides, la planta no requiere etileno para contender con la infección.
- 5) Existe una disminución de la acumulación viral en tejido joven (hojas sistémicas).

Es posible que los resultados estén vinculados a interacciones con otras hormonas, como el ET, sin embargo, se requiere investigar con mayor énfasis los mecanismos moleculares a través de los cuales actúan los CPCV, posiblemente por medio de un análisis global de la expresión genética, además es necesario validar los resultados en diferentes modelos biológicos, así como otras especies virales. También es necesario realizar estudios sobre la interacción de los CPCV con los receptores celulares y las cascadas de señalización que se estimulan.

Debido al potencial que tienen estos CPCV, la aplicación del compuesto aBSS18 podría tener un impacto económico promoviendo el desarrollo de las plantas y la prevención de enfermedades de origen viral, sin embargo, se requieren realizar más estudios con otros modelos biológicos y virales.

Referencias

1. a) Agrios G. (2005). Chapter 14: Plant Diseases caused by Viruses. Plant Pathology. (p.724-820), Fifth Edition. Elsevier Academic Press.
2. b) Agrios G, (2005) Chapter 1: History of Plant Pathology Early Significant Plant Diseases. Plant Pathology (pp 25-27) San Diego, CA: Academic Press
3. Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., y Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 232(4751), 738-743.
4. Acheson, N. H. (2007). Introduction to virology. Fundamentals of molecular virology. (1a ed., pp. 1-17). Hoboken, NJ: Wiley.
5. Adams, M. J., Antoniwi, J. F. y Beaudoin, F. (2005), Overview analysis of the polyprotein cleavage sites in the family *Potyviridae*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 471-487. doi:10.1111/j.1364-3703.2005.00296.x
6. Agudelo-Romero, P., Carbonell, P., De La Iglesia, F., Carrera, J., Rodrigo, G., Jaramillo, A., y Elena, S. F. (2008). Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* after infection with Tobacco etch virus. *Virology journal*, 5(1), 92.
7. Akiyama K. y Hayashi H (2006). "Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts/parasitic weeds in plant roots." *Ann Bot* 97(6);925-31. PMID: 16574693
8. Alder A, Jamil M, Marzorati M, Bruno M, Vermathen M, Bigler P, Ghisla S, Bouwmeester H. Beyer P. y Al-Babili S. (2012). "The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone." *Science* 335(6074);1348-51. PMID: 22422982
9. Andrade Rosales, M. d. L. (2013). Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la inclinación de la lámina de arroz y en los cultivos de frijol. Jardín Botánico Universitario, Laboratorio de Síntesis y Modificación de productos naturales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura
10. Bailey JR, Barnes E, Cox AL. 2018. Approaches, Progress, y Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology*. pii: S0016-5085(18)35035-2.
11. Bajguz A, y Hayat S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Biochem.*;47:1–8.
12. Bajguz A., (2009). "Isolation y Characterization of Brassinosteroids from Algal Cultures of *Chlorella Vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae)." *Jl of Plant Physiology* 166(17): 1946–49.
13. Baltimore D (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological reviews*, 35 (3), 235-41 PMID: 4329869
14. Belkhadir, Youssef, Jaillais, Yvon, Epplé, Petra, Balsemão-Pires, Emilia, Dangl, Jeffery L. Chory, Joanne (2012). "Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(1): 297-302.
15. Berrocal-Lobo, M., Molina, A., y Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal*, 29(1), 23-32.
16. Blanc S, López-Moya JJ, Wang RY, García-Lampasona S, Thornbury DW y Pirone TP. (1997). A specific interaction between coat protein y helper component correlates with aphid transmission of a *Potyvirus*. *Virology* 231:141–147. 10.1006/viro.1997.8521 [PubMed] [Cross
17. Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor y targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
18. Burton, M. (2018) Efecto de promotores de crecimiento vegetal en la diversidad del microorganismos del suelo asociado a la rizosfera del Maíz (Facultad de Ciencias Biológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla)
19. Carrington, J. C. y D. D. Freed (1990). "Cap-independent enhancement of translation by a plant *Potyvirus* 5' nontranslated region." *J Virol* 64(4): 1590-1597
20. Carrington, J. C. y D. D. Freed (1990). "Cap-independent enhancement of translation by a plant *Potyvirus* 5' nontranslated region." *J Virol* 64(4): 1590-1597
21. Cerkaskas, R. (2005). "Tobacco Etch Virus on Tomato." *AVRDC – The World Vegetable Center* 42: 1–2.

22. Chen W., Dai J., Zhang H., Jiao H., Cheng J. y Wu Y. (2014): Concentrationy detection of tobacco etch virus from irrigation water using real-time PCR. *Turkish Journal of Agriculturey Forestry*, 38: 471–477.
23. Chen Z, Wang X, Song B, Wang H, Bhadury PS, Yan K, Zhang H, Yang S, Jin L, Hu D, Xue W, Zeng S y Wang J, (2008). Synthesisy antiviral activities of novel chiral cyanoacrylate derivatives with (E) configuration. *Bioorg Med Chem* 16: 3076-3083.
24. Chew, M.I.Y., Vega, P.A., Palomo, R.M. y Díaz, J.F. (2007). Principales enfermedades del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en la Región Lagunera, México. *Memorias. XIX Semana Internacional de Agronomía FAZ-UJED*. 182 – 187.
25. Chivasa, S., y Carr, J. P. (1998). Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *Plant Cell* 10:1489–1498.
26. Choe, S., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., y Feldmann, K. A. (1998). The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell*, 10(2), 231-243.
27. Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., y Feldmann, K. A. (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growthy seed yield in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 26(6), 573-58
28. Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J. R., y Klessig, D. F. (1995). Two inducers of plant defense responses, 2, 6-dichloroisonicotinic acidysalicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92
29. Contreras-Paredes, C. A., Silva-Rosales, L., Daròs, J. A., Alejandri-Ramírez, N. D., y Dinkova, T. D. (2013). The absence of eukaryotic initiation factor eIF (iso) 4E affects the systemic spread of a Tobacco etch virus isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular*
30. Cotton, S., R. Grangeon, K. Thivierge, I. Mathieu, C. Ide, T. Y. Wei, A. M. Wang y Laliberte J. F. (2009). "Turnip Mosaic Virus RNA Replication Complex Vesicles Are Mobile, Align with Microfilaments, AND Are Each Derived from a Single Viral Genome." *Journal of virology*, 83(20), 10460-10471.
31. Crespo R. J.A., Molina M., Andino Ruibal E. y Silva Larrañaga Y.K. (2010). Primer informe para cuba del virus del grabado del tabaco (tobacco etch virus) en plantas silvestres de cassia tora L. *Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Forestales (ACTAF)*, 11,
32. Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R. V., Sun, G., y Wang, A. (2010). The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathwayy traffics along actin microfilaments. *Virology*, 397(1), 56-63.
33. Culver, J. N., y Padmanabhan, M. S. (2007). Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 221-243.
34. D'Anna F, Panattoni A y Triolo E, (2006). Emerging antiviral drugs in plant chemotherapy. *J Plant Pathol* 88: 39.
35. Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M., Ng, J. C., y Drucker, M. (2017). Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect science*, 24(6), 929-946.
36. Davies, Peter J y Peter J Davies. (2014). "The Plant Hormones: Their Nature , Occurrence ,y Functions A1 . The Plant Hormones: Their Nature ,," (January 2010).
37. Davies, Peter J. (2010). "Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!" *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* (January 2010): 1–802.
38. Debrot, E. (1976). Estudios sobre el virus del grabado del tabaco en siembras de tomate en Venezuela. *Agronomía Trop*, 26, 321-335.
39. Deng, P., Wu, Z., y Wang, A. (2015). The multifunctional protein CI of *Potyvirus* plays interlinkedy distinct roles in viral genome replicationy intercellular movement. *Virology Journal*, 12, 141.
40. Deng, X. G., Zhu, T., Peng, X. J., Xi, D. H., Guo, H., Yin, Y., y Lin, H. H. (2016). Role of brassinosteroid signaling in modulating Tobacco mosaic virus resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific reports*, 6, 20579.
41. Dolja V.V., Haldeman R., Robertson N.L., Dougherty W.G. y Carrington J.C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assemblyy movement of tobacco etch *Potyvirus* in plants. *The EMBO journal*, 13 (6):1482-1491.
42. Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., y Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assemblyy movement of tobacco etch *Potyvirus* in plants. *The EMBO Journal*, 13(6), 1482–1491.
43. Ebrahim, S., Usha, K., y Singh, B. (2011). Pathogenesis related (PR) proteins in plant defense mechanism. *Sci Against Microb Pathog*, 2, 1043-1054.

44. Elvira, M. I., Galdeano, M. M., Gilardi, P., García-Luque, I., y Serra, M. T. (2008). Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible/incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L 3 plants. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1253-1265.
45. Elya, C., Lok, T. C., Spencer, Q. E., McCausland, H., y Eisen, M. B. (2017). A fungal pathogen that robustly manipulates the behavior of *Drosophila melanogaster* in the laboratory. *bioRxiv*, 232140.
46. Faccioli G, (2001). Control of potato viruses using meristem system-cuttings cultures, thermotherapy/chemotherapy. In: *Virus-like diseases of potato production of seed-potatoes* (Loebenstein G, Berger PH, Brunt AA, Lawson RH, eds).
47. Fauquet, C. M. (1999). Taxonomy, classification/nomenclature of viruses. In A. Granoff/R. G. Webster (ed.), *Encyclopedia of virology* 2nd ed. Academic Press, Ltd., London, United Kingdom.
48. Fermin, G. y Tennant, P. (2018). Host–Virus Interactions: Battles Between Viruses and Their Hosts. In: J. E. Fostel, G. Fermin y P. Tennant, ed., *Viruses*, 1st ed. Academic Press, pp.245-271.
49. Fernandez-Calvino, L., Goytia, E., Lopez-Abella, D., Giner, A., Urizarna, M., Vilaplana, L., y Lopez-Moya, J. J. (2010). The helper-component protease transmission factor of tobacco etch *Potyvirus* binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor. *Journal of General Virology*, 91(11), 2862-2873.
50. Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., y Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual review of plant biology*, 59.
51. Fischer, U, y W Droge-Laser. (2004). "Overexpression of NtERF5, a New Member of the Tobacco Ethylene Response Transcription Factor Family Enhances Resistance to Tobacco Mosaic Virus." *Mol Plant Microbe Interact* 17(10): 1162–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
52. Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C. y Solano R (2009). "(+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate." *Nat Chem Biol* 5(5): 344-50. PMID: 19349968
53. Fraser, R. S. S., y Whenham, R. J. (1989). Absciscic acid metabolism in tomato plants infected with tobacco mosaic virus: relationships with growth, symptoms/the Tm-1 gene for TMV resistance. *Physiological/molecular plant pathology*, 34(3), 2
54. Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2431-2452.
55. Fujioka, S., Noguchi, T., Yokota, T., Takatsuto, S., y Yoshida, S. (1998). Brassi- nosteroids in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 48: 595–599
56. Gaglia MM, Munger K. (2018). More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses. *Curr Opin Virol*. 27;32:48-59
57. Garzón, T.J.A., Reyes, M.C. y Milán, C.J. (2012). Virus y fitoplasmas que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en México. Pp. 95-128. In: *Cultivo de chile en México*. (J. A. Zegbe D., R. D. Valdez C. y A. Lara H. Eds.). Universidad Autónoma de Zacate
58. Geraats, B. P. J., Bakker, P. A. H. M., Linthorst, H. J. M., Hoekstra, J., y van Loon, L. C. (2007). The enhanced disease susceptibility phenotype of ethylene-insensitive tobacco cannot be counteracted by inducing resistance or application of bacterial antago
59. Gómez Jaimes, R., Hernández Fuentes, L. M., Osuna García, J. A., y Martínez Bolaños, M. (2013). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de tomate en el estado de Nayarit.
60. Gómez, Diana Sanzón, y Emma Zavaleta Mejía. (2011). "Respuesta de Hipersensibilidad, Una Muerte Celular Programada Para Defenderse Del Ataque Por Fitopatógenos." *Revista Mexicana de Fitopatología* 29(2): 154–64.
61. González-García, M. P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-García, S., Russinova, E., y Caño-Delgado, A. I. (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in *Arabidopsis* roots. *Development*, dev-0
62. Gray, W. M. (2004). Hormonal Regulation of Plant Growth/Development. *PLoS Biology*, 2(9), e311.
63. Gregory, L. E., y Mandava, N. B. (1982). The activity/interaction of brassinolide/gibberellic acid in mung bean epicotyls. *Physiologia Plantarum*, 54(3), 239-243.
64. Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen Jr, J. D., y Cook Jr, J. C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281(5728), 216.

65. Gu, Y. Q., Wildermuth, M. C., Chakravarthy, S., Loh, Y. T., Yang, C., He, X., y Martin, G. B. (2002). Tomato transcription factors Pti4, Pti5,yPti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(4), 817-831.
66. Gudesblat, G. E., y Russinova, E. (2011). Plants grow on brassinosteroids. *Current opinion in plant biology*, 14(5), 530-537.
67. Halliday, K. J. (2004). Plant hormones: the interplay of brassinosteroidsyauxin. *Current Biology*, 14(23), R1008-R1010.
68. He, P., Warren, R. F., Zhao, T., Shan, L., Zhu, L., Tang, X., y Zhou, J. M. (2001). Overexpression of Pti5 in tomato potentiates pathogen-induced defense gene expressionyenhances disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Molecular*
69. Heyman, J., Cools, T., Vandenbussche, F., Heyndrickx, K. S., Van Leene, J., Vercauteren, I. y De Veylder, L. (2013). ERF115 controls root quiescent center cell divisionystem cell replenishment. *Science*, 342(6160), 860-863
70. Hillung, Julia, José M. Cuevas,ySantiago F. Elena. (2012). "Transcript Profiling of Different Arabidopsis Thaliana Ecotypes in Response Totobacco Etch *Potyvirus*Infection." *Frontiers in Microbiology* 3(JUN): 1-9
71. Hirai, Nobuhiro, Ryuji Yoshida, Yasushi Todokori,yHajime OHIGASHI. (2000). "Biosynthesis of Absciscic Acid by the Non-Mevalonate Pathway in Plants,yby the Mevalonate Pathway in Fungi." *Bioscience, Biotechnology,yBiochemistry* 64(7): 1448-58.
72. Hollings M, (1965). Disease control through virus-free stock. *Ann Rev Phytopath* 3: 367-396.
73. Huang, Y., Zhang, Bao-Long Sun, Sheng Xing, Guo-Ming Wang, Feng Li, Meng-Yao Tian, Yong-Sheng Xiong, Ai-Sheng (2016). "AP2/ERF Transcription Factors Involved in Response to Tomato Yellow Leaf Curly Virus in Tomato." *The Plant Genome* 9(2).
74. Huffman JH, Sidweell RW, Khare GP, Witkowski JT, Allen LB, Robins RK, (1973). In vitro effect of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole, ICN 1229) on deoxyribonucleic acidyribonucleic acid viruses. *Antimicrob Agents Ch* 3: 235-
75. Hull R. (2009) *Plant Virology*. Cuarta Edición; 32 Jamestown Road, London NW1 7BY, UK: Academic Press.
76. ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses (2013) *Potyviridae* figures. Figura y table recuperado de: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/272/Potyviridae-figures
77. ICTV-b, International Committee on Taxonomy of Viruses (2017) *Potyviridae* figures. Tabla recuperada de: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
78. Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., y Khan, M. I. R. (2017). Ethylene role in plant growth, developmentysenescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers in plant science*, 8, 475.
79. Iriti, M., y Faoro, F. (2008). Absciscic acid is involved in chitosan-induced resistance to tobacco necrosis virus (TNV). *Plant PhysiologyyBiochemistry*, 46(12), 1106-1111.
80. Jackson, R. J., Hellen, C. U., y Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiationyprinciples of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:113-127
81. Jin, Song Heng Li, Xue Qin Wang, G Geoff Zhu, Xiang Tao. (2015). "Brassinosteroids alleviate high temperature injury in *Ficus concinna* seedlings via maintaining higher antioxidant defenseyglyoxalase systems." *AoB Plants*.
82. Johnson, J. (1927). The classification of plant viruses. *Wis. Agric. Exp. Sin. Bull.* 76:1-16
83. Kekarainen, T., Savilahti, H., y Valkonen, J. P. T. (2002). Functional Genomics on Potato Virus A: Virus Genome-Wide Map of Sites Essential for Virus Propagation. *Genome Research*, 12(4), 584-594.
84. Kelloniemi J, Kristiina M, Valkonen J (2008). Three heterologous proteins simultaneously expressed from a chimeric *Potyvirus*: Infectivity, stabilityythe correlation of genomeyvirion lengths. *Virus Research*.;135:282-291.
85. Khan, M. A., Miyoshi, H., Gallie, D. R., y Goss, D. J. (2008). *Potyvirus*genome-linked protein, VPg, directly affects wheat germ in vitro translation: Interactions with translation initiation factors eIF4FyeIFiso4F. *J. Biol. Chem.* 283:1340-1349
86. Kizis, D., Lumbreras, V., y Pagès, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS letters*, 498(2-3), 187-189.
87. Koike, S. T., Gladders, P., y Paulus, A. (2006). *Vegetable diseases: A colour handbook*. CRC Press.

88. Kombrink, E., y Somssich, I. E. (1997). Pathogenesis-related proteins in plant defense. In *Plant relationships* (pp. 107-128). Springer, Berlin, Heidelberg.
89. Koornneef, A., y Pieterse, C. M. (2008). Cross talk in defense signaling. *Plant physiology*, 146(3), 839-844.
90. Kreuze, J. F., y Valkonen, J. P. (2017). Utilization of engineered resistance to viruses in crops of the developing world, with emphasis on sub-Saharan Africa. *Current opinion in virology*, 26, 90-97.
91. Kuhn, C.W., Nutter, F.W., Jr., y Padgett, G.B. (1989). Multiple levels of resistance to tobacco etch virus in pepper. *Phytopathology* 79:814-818.
92. Lai, R., You, M., Lotz, L. A. P., y Vasseur, L. (2011). Response of green peach aphid to other arthropods to garlic intercropped with tobacco. *Agronomy journal*, 103(3), 856-863.
93. Lawton, K; Weymann, K; Friedrich, L; Vernooij, B; Uknes, S; Ryals, J. (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:863-870
94. Lee, S. C., y Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic/abiotic stress responses. *Plant, Cell y Environment*, 35(1), 53-60.
95. Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., y Laliberté, J. F. (2000). Complex formation between *Potyvirus* VPg translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74:7730-7737
96. Leubner-Metzger, G. (2001). Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta*, 213(5), 758-763.
97. Li, D., Wei, T., Abbott, C. M., & Harrich, D. (2013). The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 253-266.
98. Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., y Chory, J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*. 272, 398–40
99. Li, J., y Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. 90, 929–938.
100. Li, X. H., Valdez, P., Olvera, R. E., y Carrington, J. C. (1997). Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport, protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, 71(2), 1598–1607.
101. Liu, Y. R., Liang, J. Y., Wang, W. P., Zhou, J., Xia, X. J., Zhou, Y. H. y Shi, K. (2015). The relationship between the plant-encoded RNA-dependent RNA polymerase 1 and alternative oxidase in tomato basal defense against Tobacco mosaic virus.
102. Lodish H, Berk A, Zipursky SL. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 6.3, Viruses: Structure, Function, Uses. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>
103. Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Gusmaroli, G., Luna, A. P., Taconnat, L., Deng, X. W., y Bejarano, E. R. (2011). Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated deubiquitylation of SCF E3 ligase complexes to inhibit jasmonate signaling
104. Mandadi, K. K., y Scholthof, K. B. G. (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease?. *The plant cell*, tpc-113.
105. Mano, Yoshihiro, y Keiichirou Nemoto. (2012). "The Pathway of Auxin Biosynthesis in Plants." *Journal of Experimental Botany* 63(8): 2853–72.
106. Martínez, Fernando. (2014). "Tobacco Etch Virus Protein P1 Traffics to the Nucleolus and Associates with the Host 60S Ribosomal Subunits during Infection." 88(18): 10725–37.
107. Milton Zaitlin M., (1998) *The Discovery of the Causal Agent of the Tobacco Mosaic Disease, Discoveries in Plant Biology*. Hong Kong: World Publishing Co. 105–11
108. Moreno, A. (2009). Efecto de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.) criollo Jardín Botánico BUAP. Puebla, Mexico, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura.
109. Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., y Prats, E. (2007). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of experimental Botany*, 59(3), 501-520.
110. Neuhaus J-M (1999). Plant chitinases. In: Datta SK, Muthukrishnan S, editors. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press; pp. 77–105.
111. Nukari A, Uosukainen M, Rokka VM, (2009). Cryopreservation techniques and their application in vegetatively propagated crop plants in Finland. *Agr Food Sci* 18: 117-128.

112. Ohme-Takagi, M., y Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 7(2), 173-182.
113. Ohme-Takagi, M., Suzuki, K., y Shinshi, H. (2000). Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant Cell Physiology*, 41(11), 1187-1192.
114. Ohta, M., Ohme-Takagi, M., y Shinshi, H. (2000). Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions. *The Plant Journal*, 22(1), 29-38.
115. Oka, K., Kobayashi, M., Mitsuhashi, I., y Seo, S. (2013). Jasmonic acid plays a negative role in resistance to Tobacco mosaic virus in tobacco. *Plant Cell Physiology*.
116. Olsper, A., Chung, B. Y.-W., Atkins, J. F., Carr, J. P., y Firth, A. E. (2015). Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyvirus*. *EMBO Reports*, 16(8), 995-1004.
117. Pallás V, Sánchez-Navarro JA, James D. (2018). Recent Advances on the Multiplex Molecular Detection of Plant Viruses and Viroids. *Front Microbiol.* 2018 Sep 10;9:2087.
118. Pallás, V., Genoves, A., Sanchez-Pina, M. A., y Navarro, J. A. (2011). Systemic movement of viruses via the plant phloem. *Recent Advances in Plant Virology*, 75-101.
119. Panattoni A, D'Anna F, Triolo E, (2006). Improvement in grapevine chemotherapy. *Proc 15th Meeting Int Council for the study of Virus-like Diseases of the Grapevine*. Stellenbosch (South Africa), April 3-7. pp: 139-140.
120. Panattoni, A., Luvisi, A., y Triolo, E. (2013). Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (1), 173-188.
121. Park, J. M., Park, C. J., Lee, S. B., Ham, B. K., Shin, R., y Paek, K. H. (2001). Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The*
122. Peña, N. H. (2012). Evaluación de Análogos de Brassinosteroides mediante el bioensayo del frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Jardin Botanico Universitario; Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Química Orgánica BUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.
123. Pérez, M.L. y Rico, J.E. (2004). Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. *Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad de Guanajuato*. 143 p
124. Pernezny, K., Roberts, P. D., Murphy, J. F., y Goldberg, N. P. (Eds.). (2003). *Compendium of pepper diseases* (No. 633.8493/P452). St. Paul MN: APS Press.
125. Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., y Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308.
126. Prins, M., Laimer, M., Noris, E., SCHUBERT, J., Wassenegger, M., & Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular plant pathology*, 9(1), 73-83.
127. Purves, W. K., Sadava, D. E., Orians, G. H., y Heller, H.C. (2003). *Viruses: Reproduction and recombination*. *Life: the science of biology* (7a ed., pp. 258-263). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
128. Raccach, B., Huet, Y. S. Blanc. (2001). *Potyvirus*, p. 181-206. In K. Harris, J. E. Duffus, y O. P. Smith (ed.), *Virus-insect-plant interactions*. Academic Press, San Diego, Calif.
129. Ramakrishna, B. y S. Rao (2014). "Foliar application of brassinosteroids alleviates adverse effects of zinc toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants." *Protoplasma*: 1-13.
130. Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., y Jackson, R. B. (2011). *Structure of viruses*. *Campbell biology* (10a ed., pp. 394-395). San Francisco, CA: Pearson.
131. Riechmann, J. L., y Meyerowitz, E. M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological chemistry*, 379, 633-646.
132. Roberts, P. D., Adkins, S., Pernezny, K., y Jones, J. B. (2004). Diseases of peppers and their management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 333-387). Springer, Dordrecht.
133. Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., y Jones, J. D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, 49, 317-343.
134. Ruiz L, Simón A, García C, Velasco L, Janssen D. (2018). First natural crossover recombination between two distinct species of the family *Closteroviridae* leads to the emergence of a new disease. *PLoS One*. 13;13(9):e0198228
135. Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., & López-Moya, J. J. (2005). Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-Pro oligomers involved in aphid transmission. *Journal of virology*, 79(6), 3758-3765.
136. S. R. Christie, (septiembre, 2018) obtenido de: <http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=258&figno=07>.

137. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-081-FITO-2001, Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha
138. Samac, D A, C M Hironaka, P E Yallaly, y D M Shah. (1990). "Isolation and Characterization of the Genes Encoding Basic/Acidic Chitinase in *Arabidopsis thaliana*." *Plant physiology* 93(3): 907-14. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=10626>
139. Saunders, Keith, Ian D Bedford, Tetsukazu Yahara, y John Stanley. 2003. "The Earliest Recorded Plant Virus Disease." 2(1979): 2003.
140. Shepherd, R. J., y Purcifull, D. E. (1971). Tobacco etch virus. Description of Plant Viruses,
141. Shi, K., Fu, L. J., Zhang, S., Li, X., Dong, D. K., Jiang, Y. P., y Yu, J. Q. (2012). The reduction of reactive oxygen species formation by mitochondrial alternative respiration in tomato basal defense against TMV infection. *Planta*, 235(2), 225
142. Shi, Y. H., Zhu, S. W., Mao, X. Z., Feng, J. X., Qin, Y. M., Zhang, L., y Zhu, Y. X. (2006). Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. *The plant cell*, 18(3), 65
143. Sidwell RW, Huffman JH, Share GP, Allen LB, Witkowski JT., Robins RK, (1972). Broad spectrum antiviral activity of virazole 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 177: 705-706
144. Siegień, I., & Bogatek, R. (2006). Cyanide action in plants—from toxic to regulatory. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28(5), 483-497.
145. Siefert, F., Kwiatkowski, J., Sarkar, S., y Grossmann, K. (1995). Changes in endogenous cyanide and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid levels during the hypersensitive response of tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Plant growth regulation*
146. Siegień, I., y Bogatek, R. (2006). Cyanide action in plants—From toxicity to regulatory. *Acta Physiol. Plant.* 28:483-497
147. Smith, K. A. (2012). Louis Pasteur, the Father of Immunology? *Frontiers in Immunology*, 3, 68.
148. Son, G. H., Wan, Jinrong Kim, Hye Jin Nguyen, Xuan Canh Chung, Woo Sik Hong, Jong Chan Stacey, Gary (2011). "Ethylene-Responsive Element-Binding Factor 5, ERF5, Is Involved in Chitin-Induced Innate Immunity Response." *Molecular Plant-Microbe Interactions*
149. Spiegel S, Frison EA, Converse RH, (1993). Recent development in therapy/virus-detection procedures for international movements of clonal plant germ plasm. *Plant Dis* 77: 176-180.
150. Sponsel V.M., Hedden P. (2004). "Gibberellin biosynthesis inactivation." *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Ed. P.J. Davies.
151. Steber, C. M., y McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 125(2), 763-769.
152. Su, Yi, Shitou Xia, Ruozhong Wang, y Langtao Xiao. (2017). Hormone Metabolism and Signaling in Plants. *Phytohormonal Quantification Based on Biological Principles*.
153. Susaimuthu J, Tzanetakis JI, Gergerich RC, Martin RR. (2008) A member of a new genus in the *Potyviridae* infects *Rubus*. *Virus Res*;131:145-5
154. Szekeres, M., Németh, K., Koncz-Kálmán, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., y Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85(2), 171-182.
155. Teale, W. D., Ditegou, F. A., Dovzhenko, A. D., Li, X., Molendijk, A. M., Ruperti, B., y Palme, K. (2008). Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Molecular Plant*, 1(2), 229-237.
156. Thivierge, K., Cotton, S., Dufresne, P. J., Mathieu, I., Beauchemin, C., Ide, C., y Laliberté, J. F. (2008). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase VPg-Pro in virus-induced vesicles.
157. Valle Borrego B, García Romo E, Olabarrieta Arnal I, Orizales Lago CM, Jesús Merino F. (2018). Emerging and imported diseases diagnosed in the emergency department of a hospital in Madrid. *Emergencias*. 30(5):332-335
158. Valverde, R. A., Nameth, S. T. y Jordan, R. L. (1990) Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease*. 74(3): 255-258
159. Velásquez-Valle, R., Aguilar-Medina, M.M. , y Creamer, R. (2008). First report of Beet mild curly top virus infecting chile pepper in north central, Mexico. *Plant Disease* 92:650.

160. Velásquez-Valle, R., Chew-Madinaveitia, Y. I., Amador-Ramírez, M. D., y Reveles-Hernández, M. (2010). Presencia de virus en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) en Zacatecas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 135-143.
161. Vert, G., Walcher, C. L., Chory, J., y Nemhauser, J. L. (2008). Integration of auxin brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(28), 9829-9834.
162. Wang, Zhi-Yong, Ming-Yi Bai, Eunkyoo Oh, y Jia-Ying Zhu. (2012). "Brassinosteroid Signaling Network Regulation of Photomorphogenesis." *Annual Review of Genetics* 46(1): 701-24.
163. Wani, Shabir H, Vinay Kumar, Varsha Shriram, y Saroj Kumar. (2016). "ScienceDirect Phytohormones Their Metabolic Engineering for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants." *CJ* 4(3): 162-76.
164. Want, J. P. H Van Der, y J Dijkstra. (2006). A History of Plant Virology Brief Review. 1467-98.
165. Wei, T., Zhang, C., Hou, X., Sanfaçon, H., y Wang, A. (2013). The SNARE Protein Syp71 Is Essential for Turnip Mosaic Virus Infection by Mediating Fusion of Virus-Induced Vesicles with Chloroplasts. *PLoS Pathogens*, 9(5), e1003378.
166. Wei, Z., y Li, J. (2016). Brassinosteroids regulate root growth, development and symbiosis. *Molecular plant*, 9(1), 86-100.
167. Wilfert Eckel, R. V., y Lampert, E. P. (1993). Effect of tobacco etch virus on the seasonal growth of flue-cured tobacco. *Crop Protection*, 12(7), 505-512.
168. Woeste, K. E., Vogel, J. P., y Kieber, J. J. (1999). Factors regulating ethylene biosynthesis in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 478-484.
169. Wong, C. E., Carson, R. A., y Carr, J. P. (2002). Chemically induced virus resistance in *Arabidopsis thaliana* is independent of pathogenesis-related protein expression the NPR1 gene. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(1), 75-81.
170. Woodward AW y Bartel B (2005). "Auxin: regulation, action, and interaction." *Ann Bot (Lond)* 95(5):707-35. PMID: 15749753
171. Xi Z, Zhang R, Yu Z, Ouyang D, (2006). The interaction between tylophorine ByTMV next term RNA. *Bioorg Med Chem Lett* 16(16): 300-4304
172. Xia Y, Fan Z, Yao J, Liao Q, Li W, Qua F, Peng L, (2006). Discovery of bitriazolyl compounds as novel antiviral candidates for combating the Tobacco mosaic virus. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 2693-2698
173. Yu, C., Hernandez, T., Zheng, H., Yau, S.-C., Huang, H.-H., He, R. L., ... Yau, S. S.-T. (2013). Real Time Classification of Viruses in 12 Dimensions. *PLoS ONE*, 8(5)
174. Zeenko, V. y D. R. Gallie (2005). "Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader." *J Biol Chem* 280(29): 26813-26824
175. Zeevaart JAD, Creelman RA. Metabolism physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1988;39:439-73.
176. Zeferino-Diaz, R., Hilario-Martinez, J. C., Rodriguez-Acosta, M., Sandoval-Ramirez, J., y Fernandez-Herrera, M. A. (2015). 22-Oxocholestanes as plant growth promoters. *Steroids*, 98, 126-131.
177. Zhang, Da Wei, Deng, Xing Guang Fu, Fa Qiong, Lin, Hong Hui. (2014). Induction of plant virus defense response by brassinosteroids brassinosteroid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*: 1-11.
178. Zhang, S., Wei, Y., Lu, Y., y Wang, X. (2009). Mechanisms of brassinosteroids interacting with multiple hormones. *Plant signaling y behavior*, 4(12), 1117-1120.
179. Zhao WG, Wang JG, Li ZM, Yang Z, (2006). Synthesis antiviral activity against Tobacco mosaic virus 3DQSAR of α -substituted-1,2,3-thiadiazoleacetamides. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 6107-6111.
180. Zhu, F., Xi, D. H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D. W., y Lin, H. H. (2014). Salicylic acid jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant-microbe interactions*, 27(6), 567-
181. Zhu, T., Tan, W. R., Deng, X. G., Zheng, T., Zhang, D. W., y Lin, H. H. (2015). Effects of brassinosteroids on quality attributes ethylene synthesis in postharvest tomato fruit. *Postharvest Biology Technology*, 100, 196-204.
182. Zurita, L. A. L. (2011). Efectos de análogos de brasinoesteroides en maíz criollo (*Zea mays* L.) con variaciones de temperatura. *Jardín Botánico Universitario; Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Química Orgánica BUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tesis de Licenciatura*

ANEXOS

1. Cuantificación del RNA total obtenido de las plantas de *Nicotiana tabacum*.

Muestra	Longitud de onda		Concentración µg/µl
	260/280	260/230	
Control experimental	1.561	0.346	0.475
Control viral	1.902	0.998	1.298
Pre tratamiento 4	1.805	0.841	0.631
Pre tratamiento 18	1.718	0.521	0.371
Pos tratamiento 4	1.886	0.996	1.069
Pos tratamiento 18	1.859	0.817	0.546