



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Trabajo de Fin de Máster

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética



**ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA INTERACCIÓN DEL VIRUS TSWV
CON DOS ESPECIES DE PIMIENTO**

**ANÁLISE TRANSCRIPTÓMICA DA INTERACCIÓN DO VIRUS TSWV
CON DÚAS ESPECIES DE PEMENTO**

**TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF THE TSWV VIRUS INTERACTION
WITH TWO PEPPER SPECIES**

CARMEN FERRER MOURE

Directores: José Día Varela y Javier Veloso Freire

13 de septiembre de 2022

D. JOSÉ DÍAZ VARELA, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA Y D. JAVIER VELOSO FREIRE, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR DE FISIOLÓGÍA VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL DE LA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Máster presentado por la alumna CARMEN FERRER MOURE y titulado:

“Análisis transcriptómico de la interacción del virus TSWV con dos especies de pimiento”

“Análise transcriptómica da interacción do virus TSWV con dúas especies de pemento”

“Transcriptomic analysis of the TSWV virus interaction with two pepper species”

ha sido realizado bajo su dirección y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 5 de setiembre de 2022.

**DIAZ
VARELA
JOSE - DNI
32782379L**

Firmado digitalmente por DIAZ VARELA JOSE - DNI 32782379L
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOGIA, ou=1016, serialNumber=IDCES-32782379L, sn=DIAZ VARELA, givenName=JOSE, cn=DIAZ VARELA JOSE - DNI 32782379L
Fecha: 2022.09.05 07:45:06 +02'00'

Fdo. José Díaz Varela

**VELOSO
FREIRE
JAVIER -
44836782F**

Digitally signed by VELOSO FREIRE JAVIER - 44836782F
DN: c=ES, serialNumber=IDCES-44836782F, givenName=JAVIER, sn=VELOSO FREIRE, cn=VELOSO FREIRE JAVIER - 44836782F
Date: 2022.09.05 12:37:40 +02'00'

Fdo. Javier Veloso Freire

**FERRER
MOURE
CARMEN -
39468134L**

Firmado digitalmente por FERRER MOURE CARMEN - 39468134L
Fecha: 2022.09.05 14:19:53 +02'00'

Conforme: Carmen Ferrer Moure

RESUMEN

El género *Capsicum* es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. La presencia de plagas y enfermedades en sus cultivos reduce las producciones causando graves pérdidas económicas. El virus TSWV infecta al pimiento provocando un crecimiento reducido de la planta, disminución en la producción de frutos o incluso la muerte de la planta, lo que causa graves pérdidas económicas al agricultor. En el presente estudio se analiza el perfil de expresión génica en plantas de pimiento resistentes y susceptibles a la infección con TSWV con el objetivo de comprender el modo en que el virus infecta al huésped y qué mecanismo usa éste para hacer frente a la infección. Los resultados obtenidos indican diferencias que pueden ser clave en la generación de resistencia al virus.

RESUMO

O xénero *Capsicum* é un dos cultivos máis importantes a nivel mundial. A presenza de pragas e enfermidades nos seus cultivos reduce a produción, provocando graves perdas económicas. O virus TSWV infecta ao pemento provocando un crecemento reducido da planta, diminución na produción de froitos ou mesmo a morte da planta, o que causa graves perdas económicas ao agricultor. No presente estudo analízase o perfil de expresión xénica en plantas de pemento resistentes e susceptibles á infección polo TSWV para comprender como o virus infecta ao hóspede e que mecanismo emprega este para facer fronte á infección. Os resultados obtidos indican diferenzas que poden ter a chave para a xeración de resistencia ao virus.

ABSTRACT

The *Capsicum* genus is one of the most important crops worldwide. The presence of pests and diseases in their crops reduces production, causing serious economic losses. The TSWV virus infects pepper causing reduced growth of the plant, a decrease in fruit production or even the death of the plant, which causes serious economic losses to the farmer. In the present study, the gene expression profile in pepper plants resistant and susceptible to infection with TSWV is analyzed in order to understand how the virus infects the host and what mechanism it uses to deal with the infection. The results obtained indicate differences that may be crucial for the generation of resistance to the virus.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Pimiento	5
Producción mundial de pimiento	5
Importancia económica a nivel nacional	6
<i>Capsicum annuum</i> y <i>Capsicum chinense</i>	7
Enfermedades del pimiento: el virus TSWV	7
Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	7
Descripción	7
Modo de transmisión e impacto económico	9
Interacción planta patógeno	9
Resistencia sistémica	11
Resistencia a Tospovirus en plantas de pimiento	12
Ultrasecuenciación y RNA-seq	12
NGS y técnicas de secuenciación masiva	12
Tecnología RNA-seq	13
Justificación	14
OBJETIVOS	16
MATERIAL Y MÉTODOS	17
Material vegetal	17
Obtención de secuencias mediante secuenciación masiva por NGS	17
Análisis de expresión diferencial	18
Análisis funcional	18
Medida de la expresión génica por RT-qPCR	19
RESULTADOS	21
Control de calidad de las muestras	21
Análisis de expresión diferencial	21
Análisis funcional de <i>Capsicum annuum</i>	23
Análisis funcional de <i>Capsicum chinense</i>	26
Análisis funcional entre <i>C. annuum</i> y <i>C. chinense</i>	28
Validación de resultados del análisis de expresión diferencial mediante qPCR	31
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

INTRODUCCIÓN

Pimiento

El género *Capsicum* pertenece a la familia de las solanáceas. Dentro de ella es uno de los grupos más cultivados en el mundo. El pimiento para cultivo en fresco es originario de América, concretamente de la zona de Perú y Bolivia. Fue introducido en España en 1493 por los primeros colonizadores de América, pudiendo así extenderse por toda Europa (Reche Mármol, 2010; MARM, 2008).

Capsicum comprende una gran variedad de especies que presentan diversidad de características y usos. Se emplea tanto en su forma fresca como seca y es conocido por su contenido en vitamina C, vitamina A, antioxidantes y flavonoides (Srivastava *et al.*, 2019).

Producción mundial de pimiento

El cultivo de pimiento es una importante actividad económica a nivel mundial. Globalmente la producción de pimiento se ha incrementado paulatinamente a lo largo del lustro 2015-2020 (FAO, 2021). Esto supone un aumento de los cultivos alrededor de todo el mundo, sobre todo en las regiones en que tradicionalmente se ha cultivado esta hortaliza [figura 1A]. España es un gran productor de pimiento; se encuentra en la quinta posición a nivel mundial y es el primer productor dentro de la Unión Europea [figura 1B].

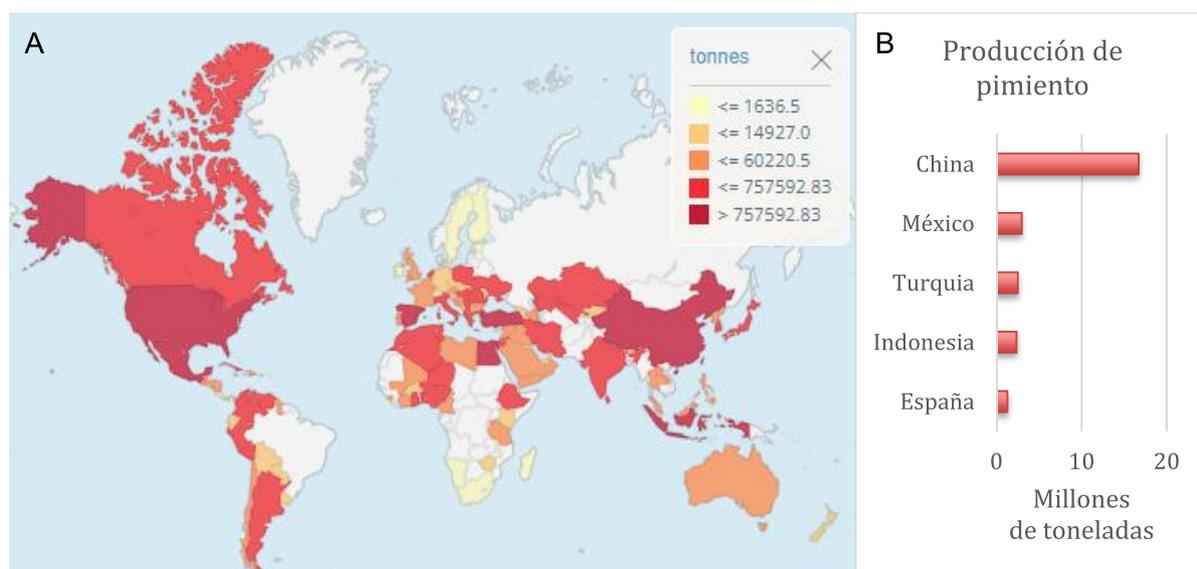


Figura 1. Producción mundial de pimientos fresco (media anual en toneladas) entre los años 2015 y 2020 expresada en toneladas (A). Producción de pimiento fresco (media anual en millones de toneladas) de los 5 países con mayor productividad (B). (FAO, 2021)

Importancia económica a nivel nacional

El pimiento es un cultivo que ha incrementado su producción también en España. La mayor producción se sitúa en las provincias del noroeste y el sureste del país [figura 2].



Figura 2. Producción de pimiento (en miles de toneladas) por provincias en el año 2021 (MARM, 2021).

Las exportaciones españolas de pimiento a nivel mundial han crecido notablemente en los últimos años, aumentando en un 27% entre los años 2016 y 2021 según datos de la Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas y Hortalizas (FEPEX, 2021) [figura 3].

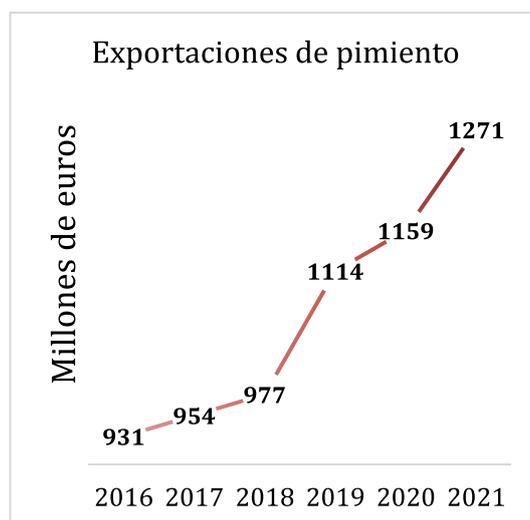


Figura 3. Evolución de las exportaciones de pimiento en España (en millones de euros) entre 2016 y 2021 (FEPEX, 2021)

En el año 2021 el pimiento aparece como la primera hortaliza exportada por España, con 1.271 millones de euros en exportaciones. A partir de estos datos se puede concluir que el cultivo de pimiento es una actividad económica de importancia y al alza en nuestro país [figura 3].

Capsicum annuum y *Capsicum chinense*

Dentro del género *Capsicum* se distinguen hasta 35 especies de las cuales cinco son de cultivo habitual. Estas son *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens* (Tripodi, 2019). Las especies de mayor importancia económica pertenecen al complejo *Capsicum annuum* destacando entre ellas *C. annuum* y *C. chinense* (Carrizo *et al.*, 2016).

C. annuum es la especie más cultivada y comercializada a nivel mundial. Dentro de esta especie hay especialidades picantes, debido a la presencia de capsicinoides, y no picantes. Sus frutos son de diferente tamaño, forma y color (Tripodi *et al.*, 2019). Los frutos de la especie *Capsicum annuum*, L., constituyen el ecotipo local de la variedad Padrón, una variedad altamente apreciada por los consumidores (MAPA, 2021).

Por su parte, *C. chinense* se cultiva principalmente en América, Asia y África. Esta planta da lugar a frutos altamente picantes de forma muy irregular (Tripodi *et al.*, 2019).

Enfermedades del pimiento: el virus TSWV

La presencia de plagas y enfermedades en los cultivos de pimiento disminuye la calidad de los frutos y reduce las producciones produciendo graves pérdidas económicas. Las plantas de pimiento pueden ser atacadas por plagas de artrópodos aéreos o edáficos; pueden presentar enfermedades producidas por hongos, oomicetos, nematodos, bacterias y virus, además de sufrir el efecto de condiciones climatológicas adversas (Reche Mármol, 2010). Los virus no penetran en la planta por sí solos sino mediante vectores o heridas producidas en la superficie. Entre los agentes víricos que infectan a los cultivos de pimiento destaca el Virus del Bronceado del Tomate, conocido en inglés como Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) (Reche Mármol, 2010). Actualmente existen cultivos de *C. chinense* resistentes a este virus debido a la presencia del gen *Tsw*. Estos sirven como fuente de estudio para entender los mecanismos necesarios para frenar la infección (Srivastava *et al.*, 2019).

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

Descripción

El virus TSWV o virus del bronceado del tomate es un *Tospovirus* de la familia *Bunyaviridae*. Las partículas virales tienen un tamaño de entre 80-120 nm. El genoma viral consta de tres cadenas simples de ARN: ARN L que codifica para una RNA polimerasa, ARN M que codifica dos glicoproteínas que se

incorporan a la membrana de la célula huésped y una proteína no estructural implicada en el movimiento viral y ARN S el cual codifica la nucleocápside. Las tres cadenas de RNA se unen mediante la proteína N formando una ribonucleoproteína. Todo está rodeado de una envoltura lipídica formada por las dos glicoproteínas y un trozo de la membrana del hospedador (Almasi *et al.*, 2018; Sherwood *et al.*, 2003).

Hospedadores y sintomatología

El virus TSWV infecta a más de 1000 especies de plantas, principalmente a las familias Solanaceae y Asteraceae (Almasi *et al.*, 2018). Su distribución es ubicua en el medio ambiente, infecta tanto a plantas cultivadas como a plantas silvestres o malas hierbas (Sherwood *et al.*, 2003). En España se ha detectado infección por TSWV en multitud de especies de hortalizas (pimiento, tomate, judía, etc.) y de plantas ornamentales principalmente en cultivos de invernadero. Este amplio rango de potenciales hospedadores hace de este virus un agente realmente dañino a nivel mundial.

Los síntomas que produce el virus TSWV en la planta se caracterizan por su heterogeneidad entre especies. En general los organismos infectados muestran manchas, anillos y patrones cloróticos o necróticos en las hojas de los frutos, retraso del crecimiento y muerte (Best, 1968; Almasi *et al.*, 2018). El retraso en el crecimiento se agrava cuando las plantas se infectan en estadios tempranos de su ciclo vital (Sherwood *et al.*, 2003).

Las plantas de pimiento infectadas presentan manchas amarillentas circulares en hojas verdes y manchas amarillentas circulares u ovoides en frutos rojos [figura 4]. Estos anillos o manchas pueden progresar a manchas cloróticas o necróticas a lo largo de la progresión de la enfermedad (Contreras Salatti *et al.*, 2007).

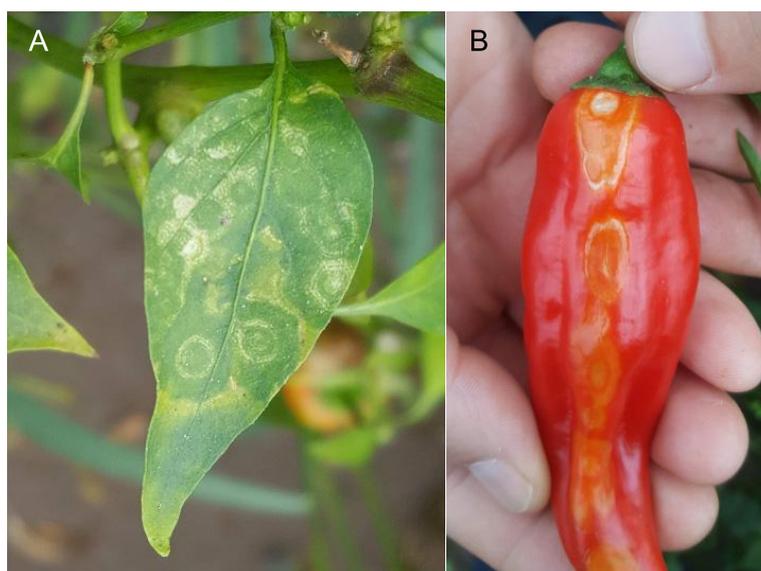


Figura 4. Hoja (A) y fruto (B) de pimiento infectado por el virus TSWV [Imágenes tomadas por Javier Veloso].

Modo de transmisión e impacto económico

Su principal vector transmisor son los tisanópteros o trips, una especie de insectos neópteros que se alimentan de plantas y hongos. El TSWV es transmitido por nueve especies de trips siendo *Frankliniella occidentalis* su mayor transmisor ya que se distribuye globalmente y puede transmitir la mayoría de los *Tospovirus* (Almasi *et al.*, 2018; Sherwood *et al.*, 2003). Cuando el trip adquiere el virus durante su estado larvario éste es capaz de replicarse y persistir durante las distintas etapas del desarrollo. Los trips adultos serán capaces de transmitir el virus a las plantas que les sirven de alimento (Almasi *et al.*, 2018). El aumento de las temperaturas en los últimos años ha aumentado la distribución de los vectores del TSWV.

El impacto económico del TSWV en los cultivos es de gran magnitud debido a su amplia distribución geográfica y a los efectos que produce en la planta infectada. El virus se ha encontrado en países de todo el mundo, especialmente en zonas templadas (Contreras Salatti *et al.*, 2007). En España la costa del mediterráneo es la zona más afectada, aunque el virus ha infectado cultivos a lo largo de todo el país. En España y Francia se produjo un importante brote durante la década de los 90 que causó una pérdida del 25% de las cosechas de pimiento, principalmente en el mediterráneo (Jordá *et al.*, 2000). Estos brotes se controlaron con el desarrollo de variedades de pimiento parcialmente resistentes al virus (Moury *et al.*, 1998). En los últimos años se han producido brotes en la mayor región de producción de pimiento en Galicia en la que se perdió el 10 % de la producción (Alfonso, 2019).

Interacción planta patógeno

Tras la interacción de los patógenos con sus huéspedes vegetales tiene lugar la respuesta inmune de la planta. En interacciones planta-patógeno compatibles, el patógeno es capaz de producir la enfermedad inhibiendo o evitando la respuesta inmune de la planta. Sin embargo, en interacciones planta-patógeno incompatibles, el patógeno es incapaz de producir la enfermedad ya que el sistema inmune de la planta detiene la invasión del patógeno. La respuesta inmune de la planta se divide en dos grandes tipos, la respuesta inmune constitutiva y la inducida. La respuesta inmune constitutiva se expresa de manera constante y la forman barreras físicas (pared celular, corteza) o químicas (metabolitos tóxicos) que impiden la penetración del patógeno en los tejidos.

La respuesta inmune inducida se expresa únicamente si el patógeno es detectado por la planta. La respuesta inmune inducida incluye cambios en la pared celular a través de la producción de lignina y calosa, producción de compuestos antimicrobianos, como proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y fitoalexinas, entre otros (Spoel *et al.*, 2012). La respuesta inmune inducida puede dividirse en dos tipos dependiendo del tipo de moléculas del patógeno que la activan, PTI (inmunidad desencadenada por PAMPS) o ETI (inmunidad desencadenada por efectores). Las PAMPs (Pathogen Associated

Molecular Patterns) son moléculas estructurales como la quitina o el beta-glucano, presentes en varias especies de patógenos. La respuesta inmune desencadenada por PAMPS, la PTI, produce una activación de defensas de intensidad moderada (figura 5, PTI, “amplitude of defense”). La PTI constituye un mecanismo de defensa genérico frente a un amplio espectro de patógenos.

Algunos patógenos especializados son capaces de superar esta primera línea de defensa secretando efectores que inhiben la PTI (Jones & Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2012). Los efectores son sustancias, comúnmente de naturaleza proteica que son introducidas en las células vegetales por los patógenos. Los efectores suelen ser compuestos muy especializados presentes solo en una especie o incluso de una raza del patógeno. La inhibición de la PTI por los efectores se la conoce como ETS, susceptibilidad desencadenada por efectores (Jones *et al.*, 2006; Glazebrook *et al.*, 2003) (figura 5, ETS). En el proceso de interacción planta-patógeno algunos individuos de la especie vegetal desarrollan la capacidad de detectar los efectores de los patógenos por el desarrollo de proteínas R. Las proteínas R se encuentran solo en determinados cultivares de la especie vegetal y les permite la detección de efectores de razas concretas de patógenos. Las proteínas R desencadenan la respuesta inmune desencadenada por efectores o ETI, tras el reconocimiento del efector. La ETI es una respuesta rápida y de alta intensidad (figura 5, ETI, “amplitude of defense”). La ETI puede ser a su vez desactivada por efectores diferentes a los que la activan produciendo nuevamente ETS, hasta que algunos individuos de la especie vegetal desarrollan proteínas R para volver a activar la ETI (figura 5, ETS-ETI). Esta interacción planta patógeno de activación y desactivación de la respuesta inmune se ilustra en el modelo en zig-zag descrito por Jones y Dangl en 2006 [figura 5].

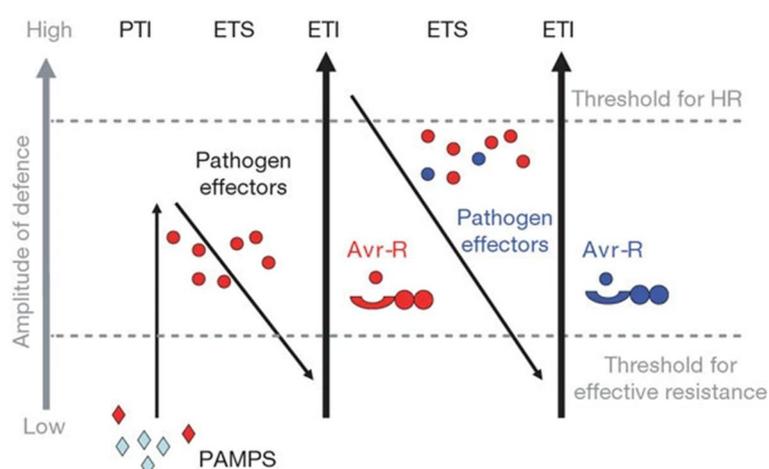


Figura 5. Modelo en zig - zag de interacción planta-patógeno en el que se muestran las dos capas de la respuesta inmune inducida; la PTI (inmunidad desencadenada por PAMPS) y la ETI (inmunidad desencadenada por efectores) (Jones & Dangl, 2006).

La ETI y la PTI utilizan múltiples proteínas reguladoras, especies reactivas de oxígeno (ROS) y fitohormonas como el ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y los jasmonatos (JA) que inducen la activación de la respuesta inmune. Los niveles de estas fitohormonas (SA, ET o JA) y el ROS aumentan en los tejidos vegetales tras la infección por el patógeno activando la expresión de los genes responsables de las defensas. Las defensas activadas por la respuesta inmune incluyen la producción de proteínas PR, proteínas relacionadas con la patogénesis, que abarca, entre otras, proteínas hidrolíticas (quitinasas y glucanasas), peroxidasas, inhibidores de proteinasas y RNAsas. (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2012).

Resistencia sistémica

El reconocimiento del patógeno no solo desencadena la activación de la respuesta inmune en las células en contacto directo con el patógeno sino también en células distantes en tejidos sanos. Las células en contacto con el patógeno activan la producción de señales a nivel sistémico que se transportan hasta los tejidos sanos donde activan la respuesta inmune sin la necesidad de la presencia del patógeno. La activación de las defensas en los tejidos sanos impide la progresión de la enfermedad. A este tipo de respuesta inmune se la conoce como resistencia sistémica (Kamle *et al.*, 2020).

La respuesta inmune puede ser activada por varios agentes inductores diferentes del patógeno como son organismos no patogénicos (como las rizobacterias), compuestos naturales o sintéticos o incluso por partes del patógeno sin capacidad de infección (Walters *et al.*, 2013). Estos agentes inductores de resistencia se llaman elicitores (Nürnberg, 1999). Los elicitores pueden ser oligosacáridos, péptidos, proteínas y lípidos. Entre las respuestas de resistencia sistémica se distinguen la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). Estas se diferencian en cuanto a la naturaleza de su elicitador y a las rutas de señalización que activan.

La SAR es un mecanismo de respuesta inducible mediada por una gran variedad de agentes bióticos y abióticos. En la SAR, la señalización está mediada por la fitohormona ácido salicílico (SA) (Shah *et al.*, 2013) y la activación de la respuesta inmune en tejidos distales depende de la producción y acumulación de SA, primero en el lugar de infección, y posteriormente en los propios órganos distales (Jung *et al.*, 2009). La señalización por SA está vinculada a la producción de ROS. SA y ROS se coordinan para la activación de una respuesta inmune especializada conocida como respuesta hipersensible (HR) que desencadena la muerte celular programada en la célula huésped cuando entra en contacto con el patógeno.

La ISR es un mecanismo de respuesta inducible mediada principalmente por la interacción de las raíces con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Walters *et al.*, 2013; Vallad *et al.*, 2004). En la ISR, la señalización está mediada por fitohormonas del grupo de los jasmonatos (JA) y etileno (ET) (Vallad *et al.*, 2004).

Tanto la SAR como la ISR pueden conducir a un estado de *priming* en la planta. En este estado las defensas no se activan directamente tras el contacto con el elicitor pero cuando entran en contacto con el patógeno las defensas se activan de manera más intensa y rápida (Goellner *et al.*, 2008).

Ambas rutas activan la respuesta inmune en tejidos sanos, pero, en general, la SAR activa una respuesta inmune eficaz frente a biotrofos, mientras que la ISR activa una respuesta inmune eficaz frente a necrotrofos. Los biotrofos son patógenos que se alimentan de los tejidos vivos del huésped mientras que los necrotrofos destruyen el tejido del huésped para poder alimentarse. Los virus se clasifican como patógenos biotrofos (Glazebrook, 2005).

Resistencia a Tospovirus en plantas de pimiento

Debido a la amplia distribución mundial del virus TSWV la búsqueda de fuentes de resistencia natural y de genes de resistencia en plantas se ha intensificado. Se han identificado distintos genes de resistencia presentes en cultivos de pimiento y tomate. Con respecto al pimiento se ha encontrado en plantas de *Capsicum chinense* un gen que produce resistencia a los Tospovirus, el gen *Tsw*. Este gen codifica para un tipo de proteína R y media una respuesta de tipo HR impidiendo la propagación sistémica del virus. La eficacia de *Tsw* parece disminuir cuando la planta está expuesta a altas temperaturas, además, su eficiencia es baja cuando las plantas se infectan en estadios tempranos (Turina *et al.*, 2016). Asimismo, han surgido varias cepas de TSWV que han roto la resistencia conferida por el *Tsw* (Debreczeni *et al.*, 2015). Por este motivo la existencia de este gen parece no ser suficiente para el control del virus TSWV a largo plazo.

Un mecanismo alternativo de defensa en plantas incluye procesos que inducen el silenciamiento del ARN viral. Los sistemas de defensa activados durante la respuesta inmune incluyen la producción de endonucleasas que destruyen el genoma del virus o impiden su expresión. El ácido salicílico podría inducir la resistencia al virus al potenciar la defensa antiviral basada en el silenciamiento del ARN vírico (Voinnet, 2005). Potenciar este silenciamiento y evitar que el virus pueda suprimirlo podría ser una nueva vía de resistencia antiviral.

Ultrasecuenciación y RNA-seq

NGS y técnicas de secuenciación masiva

La tecnología NGS (Next Generation Sequencing) es un nuevo método de secuenciación de ADN y ARN que sustituye y complementa al método de secuenciación clásico o método de Sanger.

Desde los años 70, cuando Frederick Sanger publicó su técnica de secuenciación de ADN, ésta ha sido ampliamente usada y ha permitido grandes avances. Esta técnica que usa didesoxinucleótidos terminadores permite obtener lecturas de hasta 1000 pb con una precisión del 99,9%, por lo que se

consiguen secuencias largas de gran calidad. Sin embargo, sólo lee una secuencia por experimento por lo que su rendimiento es bajo para su coste (Lin Liu *et al.*, 2012).

Los métodos de nueva generación superan las limitaciones de Sanger. Con ellos se generan millones de secuencias más cortas (reads) pero que pueden combinarse (ensamblarse) obteniendo un rendimiento mucho mayor. Estas técnicas necesitan de un paso de amplificación por PCR que alarga el proceso, además las regiones altamente repetitivas son difíciles de ensamblar a partir de lecturas pequeñas y presentan baja fiabilidad. Por ello se han empezado a desarrollar tecnologías de secuenciación de tercera generación (Verma *et al.*, 2021). A pesar de las limitaciones, la NGS se utiliza cada vez más en clínica e investigación.

Existen dos enfoques de secuenciación entre las técnicas NGS; la secuenciación por ligación y la secuenciación por síntesis. Dentro de las tecnologías disponibles las más usadas en todos los ámbitos son las plataformas de secuenciación por síntesis desarrolladas por *Illumina* (Verma *et al.*, 2021). El flujo de trabajo consta de varios pasos: fragmentación del ADN y ligación de adaptadores, preparación de la biblioteca, enriquecimiento de las regiones de interés mediante captura o amplificación, secuenciación y análisis bioinformático de los datos (Jauk, 2019). Empleando estos métodos se puede estudiar el genoma, exoma, epigenoma o transcriptoma de cualquier organismo en poco tiempo y a bajo coste.

Tecnología RNA-seq

La transcriptómica es el estudio del conjunto de transcritos que se expresan en un organismo, tejido o célula en un momento o un estado fisiológico determinado. El estudio del transcriptoma es esencial para revelar elementos reguladores génicos, componentes moleculares de células y tejidos, procesos biológicos, descifrar el efecto de señales ambientales en la expresión del genoma o percibir eventos epigenéticos (Jazayeri *et al.*, 2015). El RNA-Seq es la secuenciación del ARN del transcriptoma de un organismo mediante técnicas de secuenciación NGS. El RNA-Seq es la técnica más común en los últimos años para el estudio del transcriptoma a gran escala, aunque existen otras técnicas.

Los microarrays de expresión han sido durante años la herramienta elegida para el estudio del transcriptoma (Wang *et al.*, 2009). Sin embargo, los microarrays presentan limitaciones como la hibridación cruzada, la hibridación inespecífica y el rango de detección limitado de sondas individuales (Zhao *et al.*, 2014) que son superadas por el RNA-seq.

Las técnicas de secuenciación masiva son actualmente de primera elección para medir el nivel de expresión génica. La RNA-seq utiliza la NGS para secuenciar los transcritos del total de ARN presente en una muestra biológica en un momento dado. Esta tecnología presenta ciertas ventajas con respecto a los microarrays. Es más reproducible, permite identificar y cuantificar la expresión de isoformas y transcritos no conocidos (Costa-Silva *et al.*, 2017) además, no necesita de un genoma de referencia

para realizar la anotación (Zhao *et al.*, 2014). El RNA-Seq también presenta un rango dinámico más amplio que el microarray, lo que permite la detección de más genes diferencialmente expresados (Zhao *et al.*, 2014).

El análisis de las secuencias de RNA-seq consta de varios pasos. Las lecturas secuenciadas por NGS de mayor calidad se mapean a un genoma de referencia. Seguidamente se cuantifican las secuencias mapeadas para cada gen y se normalizan los datos. Por último, se realiza el análisis de expresión diferencial y el análisis funcional para interpretar los datos en su contexto biológico (Costa-Silva *et al.*, 2017). Siguiendo este flujo de trabajo, en el presente estudio se seguirán los pasos mostrados en la figura 6 y que se describen en detalle en la sección de material y métodos.

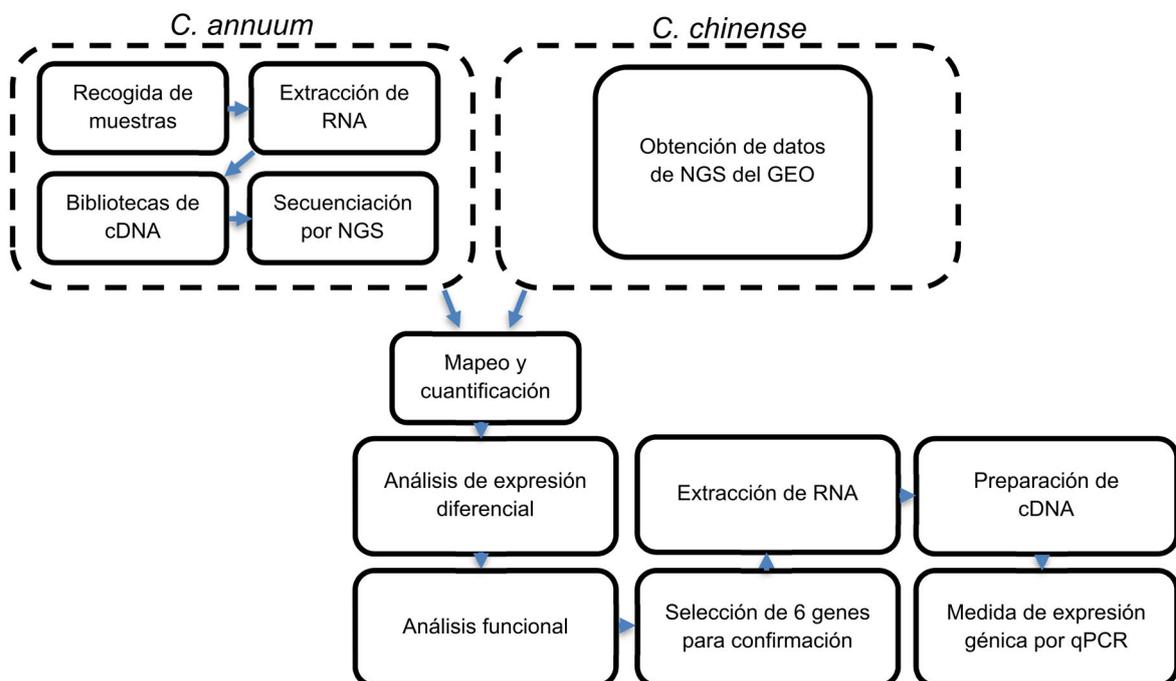


Figura 6. Esquema general de flujo de trabajo en el presente estudio.

En el presente trabajo se han añadido cuatro pasos finales de validación de resultados del análisis de NGS mediante un estudio de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) [figura 6]. En estos cuatro pasos finales se realiza un estudio de un subconjunto reducido de genes (seis genes) para confirmar los datos obtenidos por NGS. Estos pasos se detallan en la sección de material y métodos.

Justificación

El amplio abanico de hospedadores disponibles, la distribución geográfica mundial, la letalidad que produce en la planta afectada, así como las cuantiosas pérdidas económicas justifican la importancia de estudiar posibles vías para combatir al virus TSWV. Debido al gran peso económico que tiene el pimiento en nuestro país es determinante intentar controlar la enfermedad que causa en sus cultivos.

Para ello es necesario comprender el modo en que el virus infecta al huésped y qué mecanismo usa éste para hacer frente a la enfermedad. Analizando el perfil de expresión génica en organismos sanos e infectados es posible encontrar diferencias biológicas. La tecnología RNA-seq parece la más adecuada para este fin por sus ventajas en la realización del análisis de expresión diferencial.

OBJETIVOS

- I. Análisis de expresión diferencial entre plantas de *C. annuum* infectadas y no infectadas con el virus TSWV.
- II. Análisis de expresión diferencial entre plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con el virus.
- III. Análisis de expresión diferencial entre *C. annuum* (susceptible al virus TSWV) y *C. chinense* (resistente al virus TSWV) a partir de los perfiles de expresión génica obtenidos en los objetivos anteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Capsicum annuum

Se emplearon plántulas de *Capsicum annuum* L. var. *annuum* ecotipo Padrón. Éstas se obtuvieron a partir de los invernaderos de varias cooperativas locales. Se seleccionaron tres plantas no infectadas que fueron usadas como control y otras tres plantas que presentaban síntomas de infección por TSWV en invernadero. Estas muestras fueron recogidas y procesadas para su secuenciación en el laboratorio del grupo FISAPLANT por Javier Veloso.

Capsicum chinense

Se emplearon datos de RNA-Seq generados a partir de tres plantas de *Capsicum chinense* 'PI152225' control y tres plantas inoculadas con el virus TSWV. Se emplearon los datos del transcriptoma de las plantas de 5 días postinfección y cultivadas a 25°C (GEO Accessions: GSM3530873, GSM3530874, GSM3530875, GSM3530879, GSM3530880 y GSM3530881). La extracción de RNA y secuenciación a partir de las hojas inoculadas se detalla en Chung *et al.* en 2018. Brevemente, la extracción se realizó con un kit de extracción de RNA (MG MED, Inc. Seúl, Corea) y los perfiles de ARNm fueron obtenidos mediante secuenciación masiva por triplicado empleando el sistema Illumina HiSeq 2500. Estos datos se encuentran disponibles en el NCBI-Gene-Expression-Omnibus y se pueden consultar en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE124386>.

Obtención de secuencias mediante secuenciación masiva por NGS

Para la obtención de secuencias de Next Generation Sequencing (NGS) se recolectaron tres réplicas biológicas de hojas de *Capsicum annuum* no infectadas y de hojas 5 días postinfección con TSWV.

El ARN total se extrajo de las muestras homogeneizadas en nitrógeno líquido como se describe en el protocolo del kit E.Z.N.A.[®] Plant RNA (Omega Bio-tek, #R6827-01). La integridad y la cuantificación del ARN total se realizó con un bioanalizador 2100 de Agilent (#G2939BA). Solo se usaron muestras que cumplieren los parámetros de calidad de ≥ 200 ng/ μ l y un RIN (número de integridad del ARN) ≥ 7 . Para cada una de las seis muestras se empleó 1 microgramo de ARN total para construir la biblioteca de ADNc siguiendo el protocolo descrito en el kit de preparación de bibliotecas TruSeq Stranded mRNA (Illumina, #20020594). La calidad y la cuantificación del ADNc se midió mediante bioanalizador 2100 de Agilent. Solo se usaron muestras que cumplieren los parámetros de calidad de ≥ 10 ng/ μ l y una única banda a 320pb correspondiente a los constructos de la biblioteca de ADNc. Para cada una de las seis bibliotecas/muestras se generaron 100 millones de lecturas *paired-end* de 150 pb generando un total de 15 gigabases por muestra. Las lecturas se generaron en un secuenciador Illumina NovaSeq 6000 en

la compañía Macrogen siguiendo el protocolo del fabricante (Illumina, Sequencing System Guide #1000000019358 v14).

Mapeo y cuantificación de las secuencias

Se obtuvieron lecturas para la secuenciación de las seis bibliotecas de *Capsicum annuum*. Las lecturas secuenciadas de *C. annuum* y las obtenidas del NCBI de *C. chinense* fueron tratadas de igual manera. Con el objetivo de seleccionar las lecturas de mayor calidad se cortaron los adaptadores mediante la herramienta *Cutadapt* (Martin, 2011) y se eliminaron aquellas lecturas menores a 70 pb y con calidad media menor a 30. Posteriormente se mapearon estas lecturas con secuencias nucleotídicas de *E. coli* con el objetivo de eliminar la posible contaminación bacteriana durante la manipulación. Las lecturas no alineadas se mapearon con secuencias nucleotídicas de ARNr y ARNt de *C. annuum* y *C. chinense* respectivamente. De esta forma se obtuvieron las lecturas correspondientes a ARNm.

Las lecturas de ARNm se alinearon al genoma de referencia de *C. chinense* (<http://peppergenome.snu.ac.kr/data/Chinense.v1.2.Total.fa.gz>) o de *C. annuum* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000710875.1/). Todos los alineamientos se llevaron a cabo usando el software *Bowtie* (Langmead *et al.*, 2009) el cual proporciona un archivo con las lecturas alineadas en el genoma de referencia en formato .sam (Li *et al.*, 2009). Este archivo .sam se convirtió en un archivo binario .bam empleando *Samtools* (Danecek *et al.*, 2021). Se visualizaron los alineamientos en el visor APOLLO (Lewis *et al.*, 2002) empleando el genoma de referencia en formato .fasta, los alineamientos en formato .bam y el archivo de anotación en formato .gff3.

Análisis de expresión diferencial

Tras obtener las lecturas secuenciadas alineadas a su correspondiente genoma de referencia se obtuvieron los conteos para cada gen empleando *Bedtools* (Quinlan *et al.*, 2010). El análisis de expresión diferencial se realizó ejecutando la herramienta *DESeq* (Love *et al.*, 2014) a partir del software RStudio, esta herramienta usa una distribución binomial negativa para el análisis de expresión diferencial (Love *et al.*, 2014). De esta manera se obtuvieron los genes diferencialmente expresados para *C. annuum* y para *C. chinense* de las plantas infectadas comparadas con sus respectivos controles.

Análisis funcional

Tras el análisis de expresión diferencial se utilizó la herramienta de ontología DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) para explorar los procesos biológicos y rutas metabólicas diferencialmente expresados en los dos organismos. DAVID genera un análisis de ontología genética (Gene Ontology Resource, <http://geneontology.org>) y de rutas metabólicas del KEGG (Kyoto

Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) comparando el número de genes dentro de cada una de las categorías GO del *Gene Ontology Resource* y el número de genes dentro de cada una de las rutas metabólicas del KEGG. Para estos análisis se tuvieron en cuenta únicamente los genes diferencialmente expresados con un log₂FC (fold change) mayor o menor a 2 y un p-valor ajustado menor o igual a 0,05. De las categorías GO sobre-representadas o sub-representadas obtenidas en DAVID solo se tuvieron en cuenta las que presentaban un p-valor menor o igual a 0,01. De las rutas metabólicas KEGG sobre-representadas o sub-representadas obtenidas en DAVID solo se tuvieron en cuenta las que presentaban un p-valor menor o igual a 0,01. Se utilizaron homólogos de *Arabidopsis thaliana* para el análisis funcional (GO y KEGG) en DAVID. Los genes homólogos de *C. annuum* o de *C. chinense* en *Arabidopsis thaliana* se obtuvieron mediante alineamiento de las secuencias proteicas de los genes correspondientes con la herramienta *Blastp*.

Medida de la expresión génica por RT-qPCR

Para el análisis de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se usaron seis replicas biológicas (hojas de tres plantas control y tres plantas infectadas con TSWV) diferentes de las usadas para el análisis transcriptómico por NGS. Se recolectaron tres réplicas biológicas de hojas de *Capsicum annuum* no infectadas y de hojas 5 días postinfección con TSWV. El ARN total se extrajo de las muestras homogeneizadas en nitrógeno líquido como se describe en el protocolo del kit E.Z.N.A.[®] Plant RNA (Omega Bio-tek, #R6827-01). La síntesis de ADNc se llevó a cabo siguiendo el protocolo del qScript[®] cDNA Synthesis Kit de QuantaBio (#95047-100), utilizando 1 microgramo de ARN total extraído anteriormente como molde para su retrotranscripción. Las muestras de ADNc obtenidas se analizaron con el sistema de PCR cuantitativa en tiempo real *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, #1845096).

Para el análisis de expresión génica con RT-qPCR se escogieron seis genes diferencialmente expresados en el análisis transcriptómico de *C. annuum*. Estos seis genes son representativos de las rutas metabólicas (KEGG) o funciones biológicas (GO) identificadas en el análisis funcional obtenido con DAVID.

Para la amplificación de estos seis genes se diseñaron cebadores específicos para su secuencia depositada en la base de datos del NCBI; XM_016719071.1, XM_016712663.1, XM_016713195.1, XM_016715948.1, XM_016715949.1 y XM_016713942.1 [tabla 1]. Los cebadores fueron diseñados utilizando la herramienta *Primer Designing Tool* del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). La mezcla (50 µl) para la reacción de la qPCR contiene 1X de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, #1708880), 0.3 µM de cada cebador y 2,5 µl de ADNc. El ADNc de la muestra se usó en tres concentraciones diferentes para poder calcular la eficiencia de la amplificación como se describe en

Pfaffl (Pfaffl, 2001), por ello los 2,5µl contenían 100, 20 o 4 ng de ADNc dependiendo de la dilución. El protocolo del termociclador consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificación (20 segundos a 95°C, 25 segundos a 58°C y 50 segundos a 72°C) y finalmente una elongación de 5 minutos a 72°C. Los resultados obtenidos se analizaron con el software Bio-rad CFX Maestro. Como control endógeno se empleó el gen de la actina (*CaAct*), que se expresa constitutivamente. Se calcularon las eficiencias de amplificación y los valores de umbral de detección (Ct) para calcular con ellos la expresión génica relativa según el método de Pfaffl (Pfaffl; 2001) de los seis genes estudiados [Tabla 1].

Gen	Función	Cebador Forward	Cebador Reverse
XM_016719071.1	<i>Proteína de respuesta a estrés por altas temperaturas (HSP)</i>	TGGACTTGAAAGCAAGGAGG	CCGTAGCTCCTTCAACACA
XM_016712663.1	<i>Glutación - S - transferasa</i>	ATCTCGTCACTCGACTTTGG	AGGCAGAATCAACAAATAATACACA
XM_016713195.1	<i>Óxido de aleno sintasa</i>	CAGCAAACAACAAGCAGTGT	AGCGGCATTGTTCTGTAAC
XM_016715948.1	<i>Jasmonato metiltransferasa 1</i>	ACAATTAGGGCTGTGGTTGAA	TAAATGCACCCGATGACATT
XM_016715949.1	<i>Jasmonato metiltransferasa 2</i>	CTCCTTCCCAGAGTTGAGAGT	CTTGTTGGGAAACGCCT
XM_016706818.1	<i>NIM1-Interacting 2</i>	GACGTCGTTTCAAATCCGC	ACAACCACCACGATCACTAC

Tabla 1. Genes amplificados por qPCR y cebadores empleados en el análisis.

RESULTADOS

Control de calidad de las muestras

Previamente al análisis de expresión diferencial se realizó un estudio de la variabilidad de las muestras mediante un análisis de componentes principales (PCA) [figura 7] para cada especie entre el grupo control y el grupo infectado con TSWV usando el propio paquete *DESeq* en RStudio. En ambas especies (*C. annuum* y *C. chinense*) las muestras del mismo grupo se agrupan lo que es indicativo de que las muestras son homogéneas y no existe alta variabilidad intragrupal. Cabe destacar que para *C. annuum* las muestras infectadas y control se agrupan por separado, pero una de las muestras control muestra mayor variabilidad intragrupal en el segundo componente del PCA, aunque permanece dentro de los márgenes permitidos. La homogeneidad de las muestras permite un análisis de *DESeq* significativo.

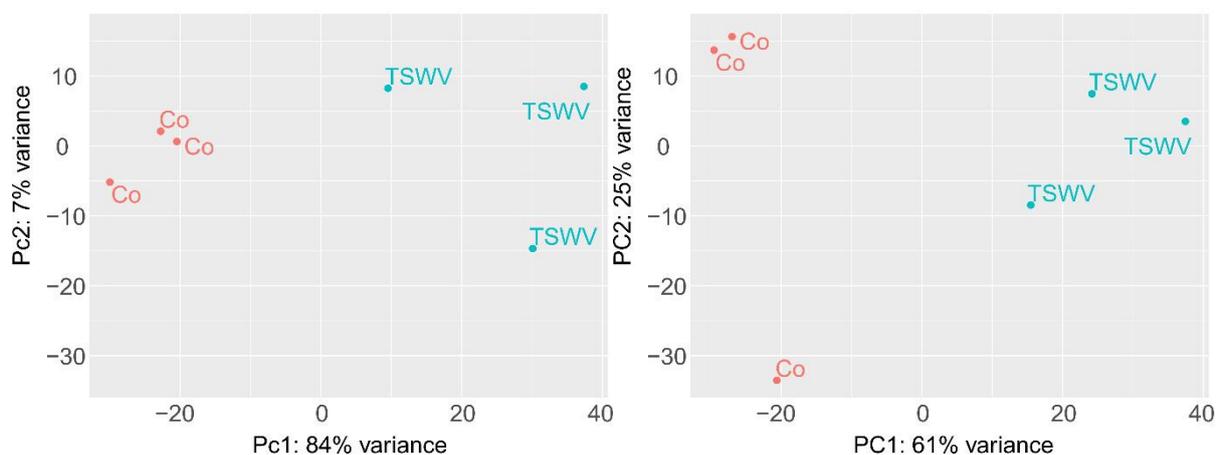


Figura 7. Análisis de componentes principales de *Capsicum chinense* (izquierda) y *Capsicum annuum* (derecha). Se muestran las muestras del grupo control en rojo y las muestras del grupo infectado con TSWV en azul.

Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial se realizó ejecutando la herramienta *DESeq* (Love *et al.*, 2014). Se consideró como gen diferencialmente expresado (DE) aquel cuya expresión era mayor a \log_2FC 2 y su p-valor ajustado menor de 0,05. El análisis muestra diferentes respuestas genéticas a la infección entre las plantas de *C. chinense*, resistentes al virus TSWV, y las plantas de *C. annuum*, sensibles al mismo. En *C. chinense* se encontraron 761 genes diferencialmente expresados [figura 8, izquierda] mientras que para *C. annuum* se encontraron 1166 entre genes sobreexpresados y reprimidos [figura 8, derecha].

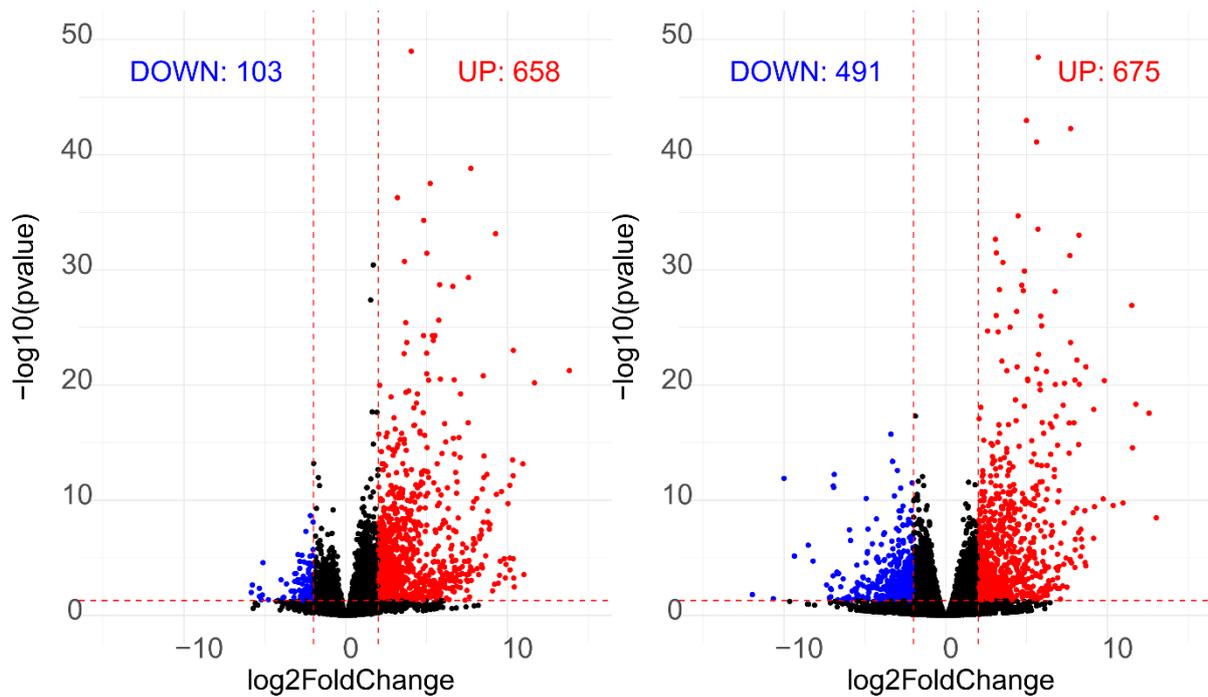


Figura 8. Volcano plot de los genes diferencialmente expresados (DE) en *Capsicum chinense* (izquierda) y *Capsicum annuum* (derecha). Se observan los genes sobreexpresados en rojo, los reprimidos en azul y los no diferencialmente expresados en negro. La línea punteada roja horizontal muestra el umbral de p -valor $\leq 0,05$. Las líneas punteadas rojas verticales muestran los umbrales de $\log_2FC \leq -2$ y ≥ 2 respectivamente.

Entre los genes diferencialmente expresados en las plantas, 172 se sobreexpresan y 62 se reprimen en ambos organismos. Se observa una diferencia notable entre el número de genes reprimidos en las dos especies siendo mayor para *C. annuum* [figura 9].

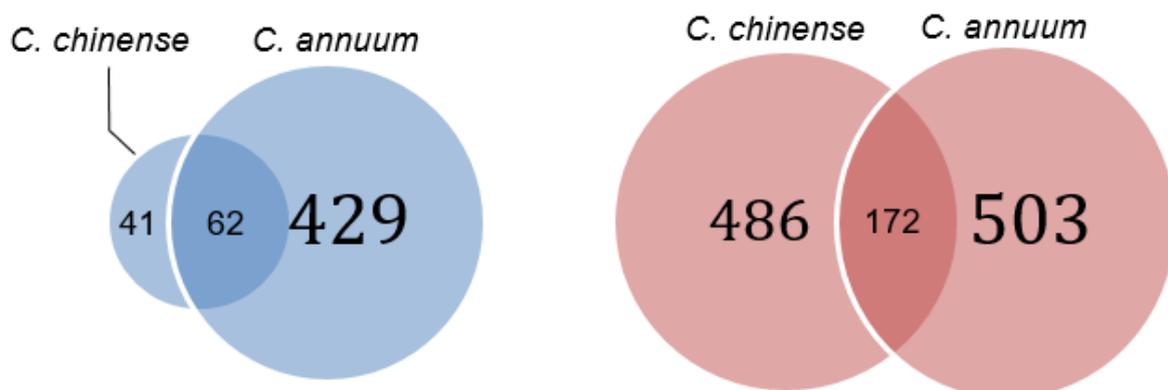


Figura 9. Diagramas de Venn mostrando el número de genes diferencialmente expresados de forma única o de forma compartida entre *C. chinense* y *C. annuum*. A la izquierda aparecen los genes reprimidos (azul) y a la derecha los genes sobreexpresados (rojo).

En el análisis de expresión diferencial un gen codificante para una **óxido de aleno sintasa** (AOS) y dos genes que codifican **jasmónico-O-metiltransferasas** (JMT) se encuentran sobreexpresados en *C. chinense*, pero reprimidos en *C. annuum*. Estos genes están implicados en la biosíntesis y en la ruta de transducción de señales del ácido jasmónico, una ruta que se destacará en el análisis funcional.

Además, en *C. annuum* aparecen sobreexpresados de forma importante genes que codifican **proteínas de respuesta a estrés por altas temperaturas** (HSP, *heat shock proteins*) de clase IV. Las HSP son una familia de chaperonas moleculares con funciones en la supervivencia y el desarrollo celular.

Varios genes relacionados con el estrés oxidativo se sobreexpresan en *C. annuum* mientras que están reprimidos en *C. chinense*. Entre ellos, dos **glutación-S-transferasas** (GST) que contribuyen al metabolismo del estrés oxidativo en plantas ya que reducen el estado oxidativo del interior celular. El número de procesos sobreexpresados de oxidación-reducción es mayor en *C. chinense* que en *C. annuum* y los procesos activados en *C. chinense* producen un incremento del estado oxidativo y no una reducción. El incremento del estado oxidativo es fundamental para los procesos de señalización en la respuesta inmune ya que implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Pastor *et al.*, 2013).

Adicionalmente se observa un componente esencial de la señalización de la respuesta sistémica adquirida (SAR) que se reprime en *C. annuum*. Este componente de señalización es una **proteína que interacciona con NIM1**, *NIM1-interacting 2* (*NIMIN2*) (Weigel *et al.*, 2001).

Los seis genes aquí destacados, se usarán para confirmar los datos de RNA-Seq mediante qPCR ya que, como se verá en el análisis funcional, estos genes forman parte de las principales rutas de la respuesta inmune durante la interacción con el TSWV.

Análisis funcional de *Capsicum annuum*

Para dilucidar los cambios fisiológicos producidos en *Capsicum annuum* durante la infección con TSWV se empleó la herramienta de ontología DAVID. Esta herramienta revela que los genes diferencialmente expresados en *Capsicum annuum* están asociados con variados procesos biológicos [figura 10]. En este estudio, de las tres categorías de términos GO en el *Gene Ontology Resource* solo se muestra la categoría de “funciones biológicas”. En la figura 10 se muestran los términos GO presentes exclusivamente en *C. annuum* y se han eliminado aquellos que están presentes en ambas especies con la misma expresión diferencial (sobrerrepresentados o reprimidos).

El proceso biológico con mayor número de genes sobreexpresados en *C. annuum* es la **respuesta a estrés por altas temperaturas**

(GO:0009408) [figura 10]. La sobreexpresión de la respuesta al calor ha sido relacionada con la susceptibilidad al TSWV (Moury *et al.*, 1998). La **respuesta a la luz** (GO:0009416) es el proceso biológico con el mayor número de genes reprimidos. Esta categoría contiene sobre todo genes relacionados con los fotosistemas con lo que se asocia a la represión de los genes contenidos en la categoría de la **fotosíntesis** (GO:0015979) lo que indica una reducción de la capacidad fotosintética de las hojas de *C. annum* infectadas con TSWV.

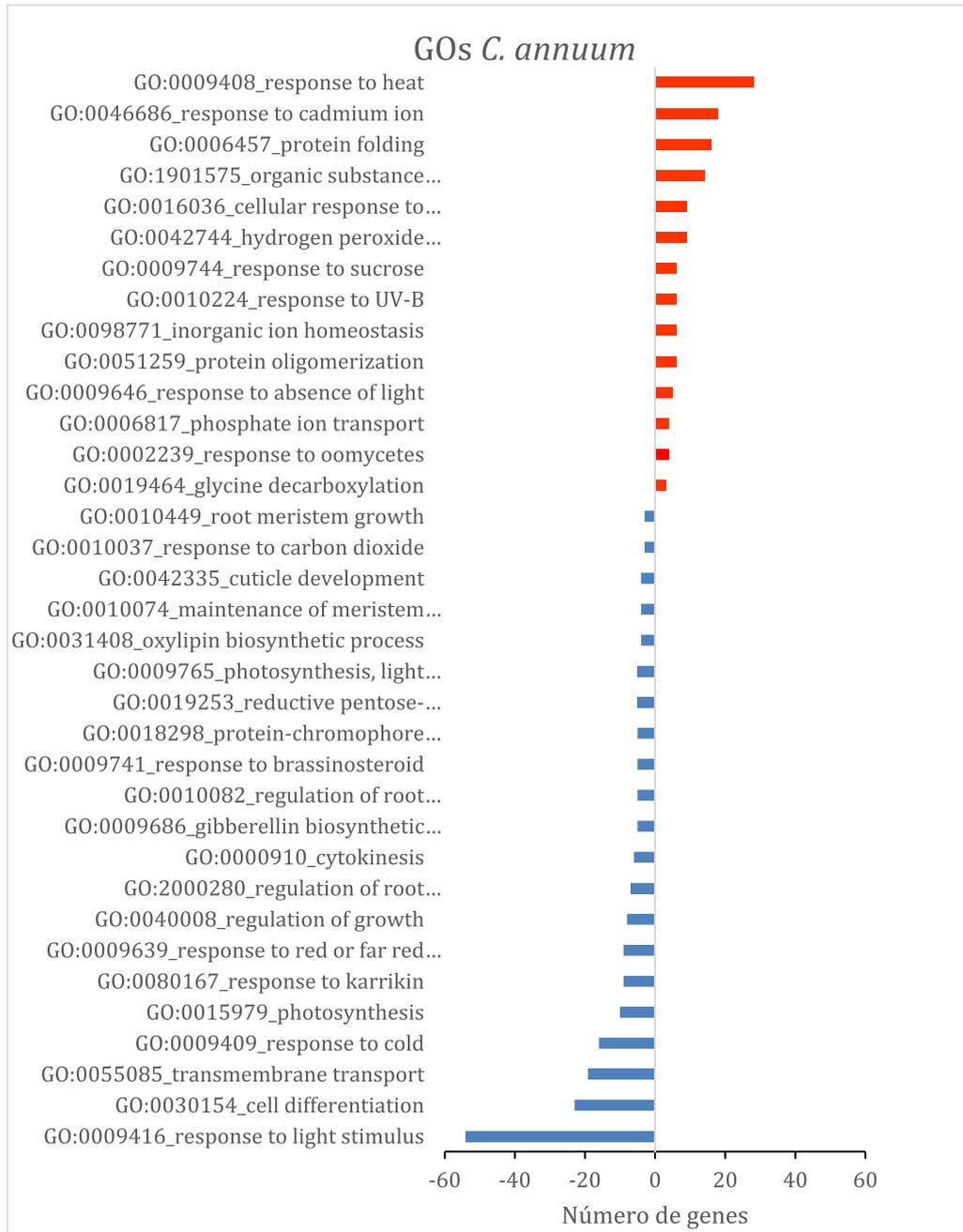


Figura 10. Número de genes dentro de la categoría “Procesos biológicos” del Gene Ontology Resource (GO) para genes sobreexpresados (barras rojas) y para genes reprimidos (barras azules) en las plantas de *Capsicum annum* infectadas con TSWV en comparación con plantas de *Capsicum annum* control.

Adicionalmente a la reducción fotosintética, la sobreexpresión de genes en la categoría de la **respuesta celular a la falta de fosfato** (GO:0016036) indica que la infección por TSWV causa una reducción en la asimilación de nutrientes del suelo y causa estrés por falta de nutrientes en el tejido. En general, las plantas de *C. annuum* infectadas por TSWV muestran varios genes reprimidos en la categoría de **regulación del crecimiento** (GO:0040008).

Los genes sobreexpresados en la categoría de **plegamiento de proteínas** (GO:0006457) se asocian a la categoría citada anteriormente de **la respuesta al estrés por altas temperaturas** (GO:0009408) ya que en su mayoría son *Heat Shock Proteins* (HSPs). La sobreexpresión de HSPs ha sido asociada a la reducción o incremento de la infección vírica dependiendo del tipo de HSP. Algunas HSPs se asocian a las proteínas del virus y las ayudan a pasar de un compartimento celular a otro (Gorovits *et al.*, 2017). La categoría **proceso catabólico del peróxido** (GO:0042744) también se ve sobrerrepresentado por un mayor número de genes sobreexpresados en las plantas de *C. annuum* infectadas con TSWV. Adicionalmente a las categorías de “funciones biológicas” mostradas en la figura 10, varios genes de la categoría de “función molecular” **actividad glutatión transferasa** (GO:0004364) aparecen presentes únicamente en las plantas de *C. annuum* inoculadas con TSWV. La sobreexpresión de la actividad glutatión transferasa ha sido relacionada con la susceptibilidad a virus (Chen *et al.*, 2013).

El análisis funcional también proporciona varias rutas KEGG sobrerrepresentadas o reprimidas en *C. annuum* [tabla 2]. De manera similar a los términos GO, en este estudio se muestran las rutas KEGG presentes exclusivamente en *C. annuum* y se han eliminado aquellas que están presentes en ambas especies con la misma expresión diferencial (sobrerrepresentadas o reprimidas). La ruta KEGG de **procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico** (ath04141) aparece como la ruta con mayor número de genes sobreexpresados. Esta ruta está posiblemente relacionada con el procesamiento de las proteínas víricas en la célula huésped. La mayor parte de rutas KEGG únicas en las plantas de *C. annuum* se encuentran reprimidas [tabla 2]. La mayor parte de las rutas KEGG reprimidas tiene que ver con la reducción de funciones vitales causadas por la infección como son la **fotosíntesis** (ath00195), el **metabolismo del carbono** (ath01200) y la reducción en la síntesis de las hormonas promotoras de la división celular (citoquininas) en los meristemos: la **biosíntesis de la Zeatina** (ath00908). Sin embargo, hay una ruta que se reprime de especial interés para el proceso defensivo, la ruta del **ácido alfa-linoleico** (ath00592) [tabla 2] ya que se trata de la ruta de síntesis de la hormona ácido jasmónico.

KEGG pathway <i>C. Annuum</i>	Número de genes	p-value
ath04141:Protein processing in endoplasmic reticulum	18	4,9E-04
ath00945:Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	4	0,03
ath00941:Flavonoid biosynthesis	3	0,04
ath01110:Biosynthesis of secondary metabolites	-55	1,9E-06
ath01100:Metabolic pathways	-81	2,0E-05
ath00908:Zeatin biosynthesis	-6	8,5E-04
ath00710:Carbon fixation in photosynthetic organisms	-8	0,001
ath00196:Photosynthesis - antenna proteins	-5	0,002
ath00630:Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-8	0,002
ath01200:Carbon metabolism	-15	0,005
ath00195:Photosynthesis	-7	0,010
ath00592:alpha-Linolenic acid metabolism	-5	0,018
ath00906:Carotenoid biosynthesis	-4	0,031
ath00040:Penrose and glucuronate interconversions	-7	0,043

Tabla 2. Número de genes dentro de las rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) con genes sobreexpresados (barras rojas) y genes reprimidos (barras azules) en las plantas de *Capsicum annuum* infectadas con TSWV en comparación con plantas de *Capsicum annuum* control.

Análisis funcional de *Capsicum chinense*

La herramienta de ontología DAVID se usa también para comprobar los cambios que se producen en las plantas de *Capsicum chinense* resistentes a TSWV durante su interacción con el virus.

El análisis de GOs revela que los genes diferencialmente expresados en *Capsicum chinense* están asociados con variados procesos biológicos [figura 11]. De manera similar al estudio con *C. annuum*, de las tres categorías de términos GO en el *Gene Ontology Resource* solo se muestra la categoría de “funciones biológicas” para *C. chinense* [figura 11] y se muestran los términos GO presentes exclusivamente en *C. chinense* ya que se han eliminado aquellos que están presentes en ambas especies con la misma expresión diferencial (sobrerrepresentados o reprimidos).

El proceso biológico con mayor número de genes sobreexpresados en *C. chinense* es la **regulación de la respuesta de defensa** (GO:0031347). La categoría se compone principalmente por genes sobreexpresados del tipo receptores de membrana RLK, factores de transcripción WRKY y Myb, lectinas y fosfatasa, entre otras. La ruta de la **resistencia sistémica adquirida (SAR)** (GO:0009627) también aparece sobrerrepresentada conteniendo dos genes sobreexpresados que son fundamentales de esta ruta, el *NIMIN2* y el *NPR3* (Veloso *et al.*, 2014). La ruta de **biosíntesis de las oxilipinas** (GO:0031408) se encuentra también sobrerrepresentada y contiene genes sobreexpresados de la síntesis de jasmonatos como son la metiltransferasa del ácido jasmónico (JMT), la óxido de aleno sintasa (AOS) y la lipoxigenasa (LOX1). Esta es la única ruta de síntesis de hormonas de defensa que se muestra en el análisis de

ontología, pero existen dos rutas de respuesta a hormonas de defensa, la **ruta de señalización mediada por ácido jasmónico** (GO:0009867) y la **ruta de señalización mediada por ácido salicílico** (GO:0009863). Por último, destacar el proceso de **muerte celular** (GO:0008219) que se ve representado por *NIM1-interacting 2* (*NIMIN2*) mencionado anteriormente. La muerte celular programada se vincula con la **respuesta a especies reactivas de oxígeno** (GO:0000302) también sobrerrepresentada en plantas *C. chinense* infectadas con TSWV [figura 11].

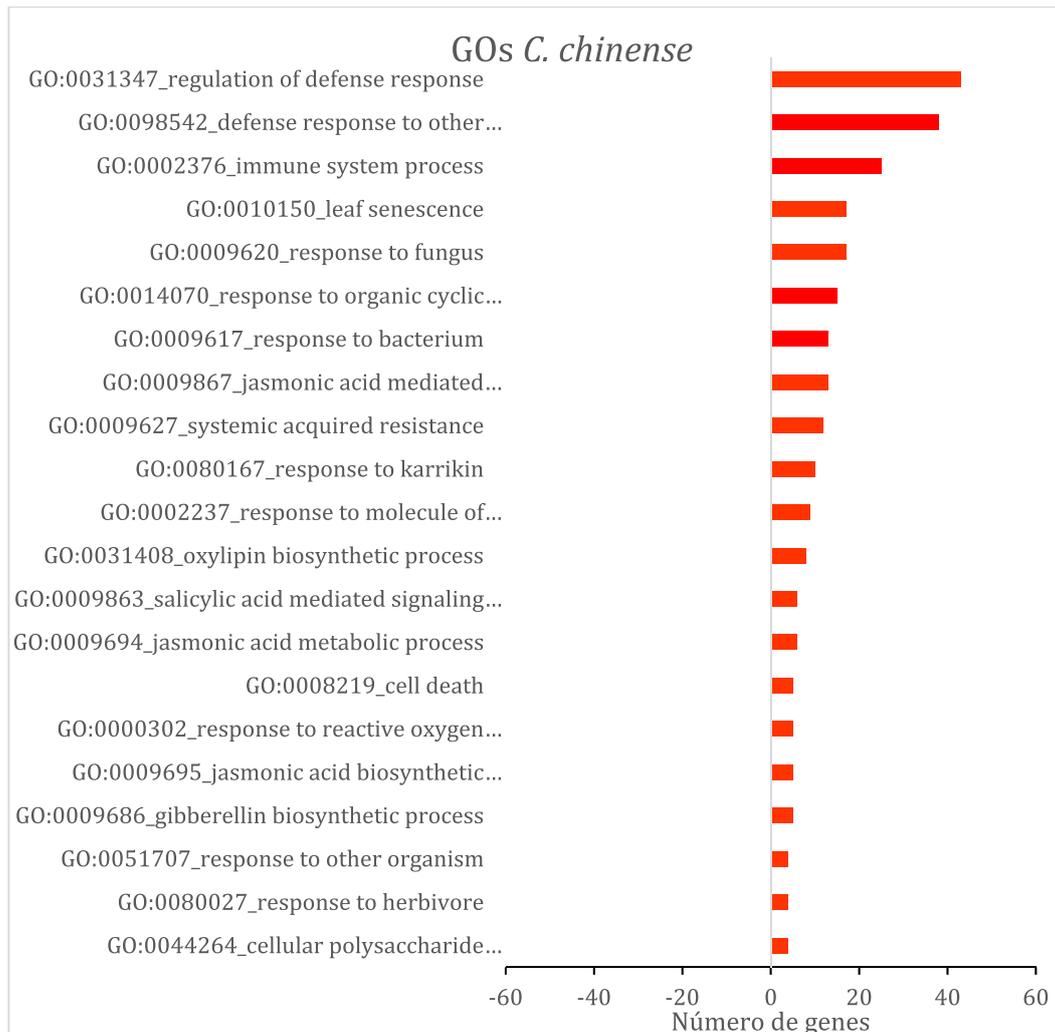


Figura 11. Número de genes dentro de la categoría “Procesos biológicos” del Gene Ontology Resource (GO) para genes sobreexpresados (barras rojas) en las plantas de *Capsicum chinense* infectadas con TSWV en comparación con plantas de *Capsicum chinense* control.

Cabe destacar que no se encontró ningún “proceso biológico” del Gene Ontology Resource reprimido que fuese único de *C. chinense*.

El análisis funcional también proporciona varias rutas KEGG sobrerrepresentadas o reprimidas en *C. chinense* [tabla 3]. De manera similar a los términos GO, en este estudio se muestran las rutas KEGG

presentes exclusivamente en *C. chinense* y se han eliminado aquellas que están presentes en ambas especies con la misma expresión diferencial (sobrerrepresentadas o reprimidas). Las rutas KEGG con mayor número de genes sobreexpresados, son **biosíntesis de metabolitos secundarios** (*ath01110*) y **rutas metabólicas** (*ath01100*). Ambos son términos genéricos que aportan poca información, pero ambas están relacionadas con la **biosíntesis de fenilpropanoides** (*ath00940*), compuestos de la pared celular que la hacen resistente a la penetración por patógenos, además de estar implicados en la síntesis del ácido salicílico y de otros compuestos antimicrobianos. Las tres rutas de señalización; **ruta de señalización por MAPK** (*ath04016*), **transducción de señales por hormonas vegetales** (*ath04075*) e **interacción planta patógeno** (*ath04626*) se relacionan entre sí por contener genes de respuesta a las hormonas SA, JA y ET que son las hormonas encargadas de la activación del sistema inmune (Jones *et al.*, 2006).

KEGG pathway C. Chinense	Número de genes	p-value
ath01110:Biosynthesis of secondary metabolites	73	1,4E-09
ath04016:MAPK signaling pathway - plant	15	5,8E-05
ath01100:Metabolic pathways	90	0,003
ath00940:Phenylpropanoid biosynthesis	11	0,005
ath00592:alpha-Linolenic acid metabolism	6	0,009
ath00902:Monoterpenoid biosynthesis	3	0,017
ath00904:Diterpenoid biosynthesis	4	0,023
ath04075:Plant hormone signal transduction	16	0,026
ath00130:Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	5	0,028
ath04626:Plant-pathogen interaction	12	0,041
ath00270:Cysteine and methionine metabolism	8	0,047

Tabla 3. Número de genes dentro de las rutas KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) con genes sobreexpresados (barras rojas) en las plantas de *Capsicum chinense* infectadas con TSWV en comparación con plantas de *Capsicum chinense* control.

Cabe destacar que no se encontró ninguna ruta del KEGG reprimida que fuese única de *C. chinense*.

Análisis funcional entre *C. annuum* y *C. chinense*

Las principales funciones biológicas encontradas en el análisis diferencial que se expresan en cada una de las dos especies de pimiento se muestran en la tabla 4. La principal función biológica sobrerrepresentada en *C. annuum* corresponde a la **respuesta al estrés por altas temperaturas** (GO:0009408) con 28 genes sobreexpresados dentro de la categoría. En *C. chinense* también encontramos varios genes relacionados con la respuesta al calor, 8 sobreexpresados y 6 reprimidos, pero esta función biológica no se encuentra ni sobrerrepresentada ni reprimida de manera significativa

(p-valor 0,05) en *C. chinense*. La respuesta al calor consta principalmente de HSPs (*heat shock proteins*) con funciones variadas, interviniendo en algunos casos en la respuesta a virus (Gorovits *et al.*, 2017).

Principales categorías C.chinense vs C. annum	Número de genes	
	C. annum	C. chinense
GO:0009408_response to heat	28	14
GO:0031347_regulation of defense response	9	43
ath00592:alpha-Linolenic acid metabolism		-5 6
ath04075:Plant hormone signal transduction		16

Tabla 4. Principales categorías sobrerrepresentadas en *C. chinense* y en *C. annum*. Para la categoría GO:0031347 se muestran las principales rutas del KEGG asociadas a genes dentro de la categoría. Los valores numéricos indican la cantidad de genes en cada categoría. Las barras rojas indican sobrerrepresentación, las azules represión. Las grises indican que la categoría no se expresa diferencialmente.

La principal ruta sobrerrepresentada en *C. chinense* es la regulación de la **respuesta de defensa** (GO:0031347). En *C. annum* también encontramos varios genes relacionados con la regulación de la respuesta de defensa, 6 sobreexpresados y 3 reprimidos, pero esta función biológica no se encuentra ni sobrerrepresentada ni reprimida de manera significativa (p-valor 0.05) en *C. annum*. Dentro del conjunto de genes dentro de la respuesta de defensa encontramos genes que se agrupan en dos rutas KEGG en *C. chinense*, la ruta del **metabolismo del ácido alfa-linoleico** (*ath00592*) y la ruta de **señalización de hormonas vegetales** (*ath04075*). Ambas son rutas esenciales para la regulación de la respuesta de defensa ya que la primera produce la síntesis de la hormona ácido jasmónico (JA), una hormona vegetal relacionada con la regulación de las defensas (Glazebrook, 2005). La ruta de señalización de hormonas vegetales abarca la señalización de varias hormonas, pero incluye la señalización del ácido jasmónico y la del ácido salicílico.

En la figura 12 se muestra la ruta del **metabolismo del ácido alfa-linoleico** (*ath00592*) en la que se indican los genes sobreexpresados en plantas *C. chinense* infectadas con TSWV. En la figura 13 se muestra la **ruta de señalización de hormonas vegetales** (*ath04075*) simplificada para mostrar únicamente la señalización del ácido jasmónico y el ácido salicílico. La producción de ácido jasmónico en las plantas de *C. chinense* inoculadas con TSWV comprende un total de 6 genes sobreexpresados. Entre estos 6 genes encontramos la primera enzima responsable de la síntesis la **óxido de aleno sintasa** (AOS, 4.2.1.92) y la última la **jasmónico-O-metiltransferasa** (JMT, 2.1.1.141) [figura 12]. En las plantas de *C. chinense* se encuentran sobreexpresadas dos jasmónico-O-metiltransferasa diferentes.

La **ruta de señalización de hormonas vegetales** (*ath04075*) muestra la expresión no solo de genes individuales si no también la sobrerrepresentación de rutas KEGG y GOs [figura 13]. La ruta muestra

sobrerrepresentación de 3 genes individuales, 2 rutas KEGG y 2 GOs. Los tres genes corresponden a un represor de la respuesta al jasmonato (JAZ), dos factores de transcripción del salicilato que se relacionan con la activación de la muerte celular (NIMIN2 y NPR3) y una proteína relacionada con la patogénesis que se usa comúnmente como marcador de la activación de la respuesta inmune (PR-1). Las dos rutas del KEGG sobrerrepresentadas en *C. chinense* son las relacionadas con el ácido jasmónico, una de entrada, la ruta del **metabolismo del ácido alfa-linoleico** (*ath00592*), y otra de salida, la ruta de **biosíntesis de monoterpenos** (*ath00902*) [tabla 3].

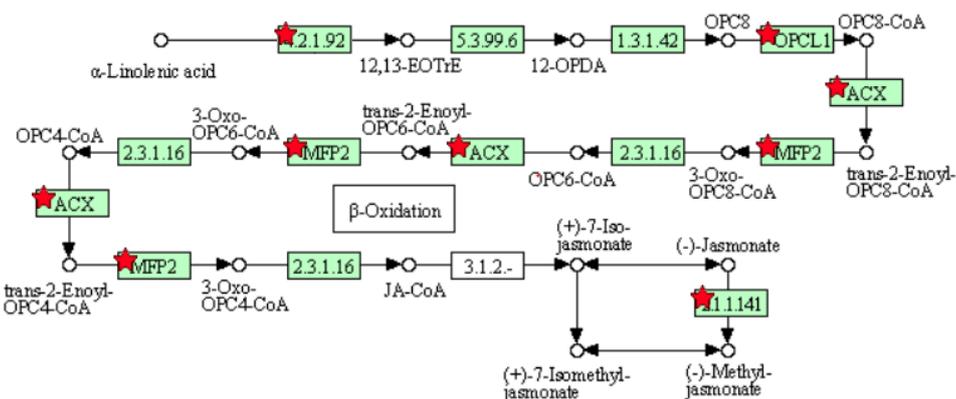


Figura 12. Ruta del **metabolismo del ácido alfa-linoleico** (*ath00592*) en la que se produce la síntesis de la hormona ácido jasmónico (*Jasmonate*). Se indica con una estrella roja los genes sobreexpresados en plantas *C. chinense* infectadas con TSWV. La ruta ha sido modificada para simplificarla.

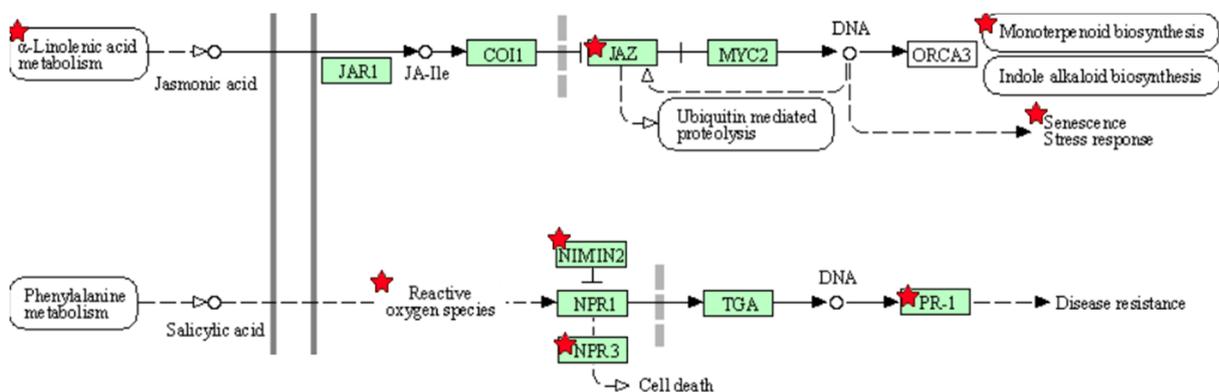


Figura 13. Ruta del KEGG de **señalización de hormonas vegetales** (*ath04075*) para el ácido jasmónico (arriba) y para el ácido salicílico (abajo). Se indica con una estrella roja los genes o procesos sobreexpresados en plantas de *C. chinense* infectadas con TSWV. La ruta ha sido modificada para simplificarla. La doble línea gruesa vertical indica la membrana plasmática y la línea discontinua gruesa vertical indica la membrana nuclear. Los genes individuales se representan como cuadrados, las rutas KEGG como globos y los GOs como texto sin encerrar.

Los dos GOs sobrerrepresentados dentro de la ruta de *señalización de hormonas vegetales* (*ath04075*) que se muestra en la figura 13, son la *producción de especies reactivas de oxígeno* (*actividad oxido reductasa GO:0016491*) y la *senescencia* (*senescencia de la hoja GO:0010150*). Nótese que la *actividad oxido reductasa GO:0016491* es un término GO del tipo “función molecular” y no proceso biológico, por ello no se muestra en la figura 11. La *actividad oxido reductasa GO:0016491* es la “función molecular” con más sobrerrepresentación en las plantas de *C. chinense* infectadas, con un total de 42 genes sobreexpresados principalmente peroxidasas, amino oxidasas y NADPH oxidasas.

Estas rutas se han escogido no solo porque se sobreexpresen en *C. chinense* durante la infección con TSWV si no porque se reprimen en *C. annuum* (biosíntesis de JA) o no se sobreexpresan (señalización de JA o SA) durante la infección con TSWV.

Validación de resultados del análisis de expresión diferencial mediante qPCR

Para validar los resultados obtenidos mediante RNA-seq se ha calculado la expresión relativa de seis genes representativos de la respuesta observada en el RNA-seq. La expresión génica relativa se ha obtenido mediante la técnica de RT-qPCR usando muestras de réplicas biológicas diferentes a las usadas en el RNA-seq. Los seis genes ensayados corresponden con genes representativos de la ruta de síntesis del JA, la ruta de señalización del SA y la ruta de respuesta al estrés por altas temperaturas. Por ello se escogieron estos seis genes; una óxido de aleno sintasa (AOS), dos jasmonato metiltransferasas (JMT1 y JMT2), una proteína de interacción con NIM1 (NIMIN2), una glutatión-S-transferasas (GST) y una proteína de respuesta al estrés por alta temperatura (HSP). Los resultados de expresión para estos genes se muestran en la figura 14.

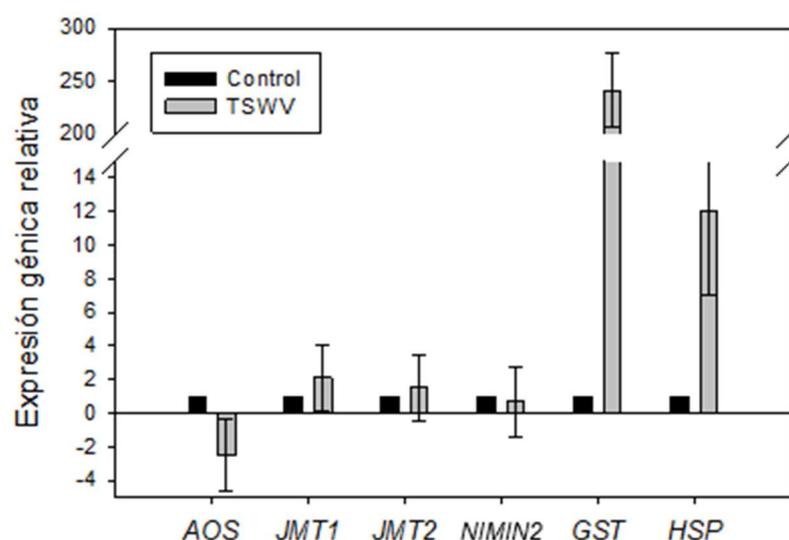


Figura 14. Expresión relativa de los genes óxido de aleno sintasa (AOS), jasmonato metiltransferasa (JMT1 y JMT2), proteína de interacción con NIM1 (NIMIN2), glutatión-S-transferasas (GST) y una proteína de respuesta al calor (HSP) en plantas de *Capsicum annuum* infectadas con TSWV.

Los datos de expresión relativa por qPCR muestran que las rutas de síntesis de JA, que comprenden los genes AOS, JMT1 y JMT2, no se sobreexpresan en las plantas de *C. annuum*. Así mismo, el gen relacionado con la muerte celular, NIMIN2, tampoco se sobreexpresa en las plantas de *C. annuum*. Sin embargo, el gen GST, responsable de reducir las especies reactivas de oxígeno, se sobreexpresa hasta 241 veces más en plantas de *C. annuum* inoculadas con TSWV que en las plantas control. La proteína de respuesta al estrés por altas temperaturas, HSP, también se ve sobreexpresada, hasta 12 veces más en las plantas de *C. annuum* inoculadas con TSWV que en las plantas control. Estos datos muestran la misma tendencia que la observada en el RNA-seq.

DISCUSIÓN

La infección por el virus TSWV es causante de cuantiosas pérdidas en el cultivo mundial de distintas especies de pimiento. Los virus parasitan las células de la planta huésped empleando su maquinaria celular para multiplicarse, dispersarse y suprimir su sistema inmune. De esta forma inducen y reprimen la expresión de distintos genes de la planta infectada en su propio beneficio. Al mismo tiempo la planta induce y reprime otros genes para iniciar los mecanismos de defensa. Este proceso se encuentra parcialmente desentrañado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en otras especies (Xu *et al.*, 2020). Existen diferencias en este proceso entre las diferentes especies de plantas estudiadas.

En este estudio el número de genes sobreexpresados y reprimidos es mayor en *C. annuum* que en *C. chinense* lo que concuerda con la infección vírica que sufre el primer organismo. Además, encontramos una diferencia muy acusada entre el número de genes reprimidos en las dos plantas siendo mucho mayor en *C. annuum*. El virus TSWV reprime profundamente la expresión génica probablemente debido a los efectos de la infección. Las plantas de pimiento infectadas presentan patrones cloróticos en hojas y frutos, lo que se justifica por la represión en el proceso de fotosíntesis que encontramos en *C. annuum*. Por ello los procesos como la fotosíntesis o el crecimiento se ven reprimidos en *C. annuum* ya que estas plantas son incapaces de detener la infección por TSWV.

Cuando se produce la interacción entre la planta y el virus, ya sea ésta compatible o incompatible se producen cambios en la pared celular, especies reactivas de oxígeno, compuestos antimicrobianos y cambios transcripcionales con el objetivo de contener al patógeno y frenar la infección (Spoel *et al.*, 2012). En el análisis realizado encontramos que la ruta del fenilpropanoide se encuentra inducida en *C. chinense* lo que favorecería la síntesis de salicilatos y el proceso de lignificación reforzando la pared celular con el objetivo de detener la penetración al virus al interior de la célula.

La resistencia a TSWV conferida por el gen *Tsw* se ha relacionado con la generación de una respuesta hipersensible (HR) en el lugar de infección. Las plantas de *C. chinense* usadas en este trabajo contienen este gen y producen una fuerte HR al entrar en contacto con el virus. Se ha observado que el mecanismo HR está influenciado por la temperatura, la resistencia al virus se pierde a altas temperaturas (Chung *et al.*, 2018). En las plantas infectadas encontramos una expresión aumentada de varias proteínas de respuesta al estrés por altas temperaturas (*heat shock proteins*, HSP) que participan en el proceso de respuesta de la planta al estrés causado por este factor ambiental. Si como se ha descrito, la infección es mayor con la temperatura, el aumento de expresión de estas HSP podría favorecer la infección. La sobreexpresión de HSPs ha sido asociada a la reducción o incremento de la infección vírica dependiendo del tipo de HSP. Algunas HSPs se asocian a las proteínas del virus y las ayudan a pasar de un compartimento celular a otro (Gorovits *et al.*, 2017). Cabe mencionar que las plantas control y las plantas inoculadas con TSWV de *C. annuum* se mantuvieron ambas a la misma temperatura.

Las plantas reaccionan a la presencia del agente patógeno generando un estallido oxidativo tras reconocerlo. La acumulación de especies reactivas de oxígeno activa los procesos de muerte celular programada [figura 13]. Las plantas de *C. chinense* muestran la “función molecular” **actividad oxido reductasa** GO:0016491 como la función molecular más sobrerrepresentada, componiéndose principalmente de peroxidasas, amino oxidasas y NADPH oxidasas, enzimas responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Si el virus consigue neutralizar estos compuestos podrá replicarse. La generación de glutatión puede reducir el estrés oxidativo y por tanto favorecer la infección. En plantas de *C. annuum* se da una alta expresión de glutatión-S-transferasas, enzimas que mantienen un estado reductor en la célula promoviendo la eliminación de ROS lo que favorece la infección. El silenciamiento de una GST ha demostrado ser un mecanismo efectivo para disminuir la replicación viral (Chen *et al.*, 2013). En *C. annuum* se observa una fuerte inducción de la expresión de varias GST, este resultado concuerda con la susceptibilidad a TSWV. El silenciamiento de esta enzima podría ser una vía adecuada de control de la infección en esta especie.

El número total de procesos de oxidación-reducción sobreexpresados es mayor en *C. chinense* lo que explica en parte su mayor resistencia a la infección.

La producción de fitohormonas es otro de los procesos clave en el mecanismo de defensa de las plantas. En las plantas de *C. chinense* se encuentra una expresión aumentada de una óxido de aleno sintasa y de jasmónico-O-metiltransferasas. Estas enzimas participan en la biosíntesis de las hormonas vegetales ácido jasmónico y jasmonato de metilo respectivamente. Se ha sugerido que el JA podría repeler a los trips portadores del TSWV al observar que al reprimir esta vía las plantas son más sensibles al vector (Nachappa *et al.*, 2020). Esta acción repelente podría ser debida a metabolitos producidos en la ruta terpenoide activada por el ácido jasmónico. Este podría ser uno de los mecanismos por los que el gen *Tsw* de *C. chinense* promueve la resistencia al virus. La ruta de señalización del ácido jasmónico presenta la sobreexpresión del gen JAZ [figura 13]. Este gen produce la síntesis de represores de la ruta de señalización del ácido jasmónico. Estos represores deben ser destruidos por el proteasoma 26S antes de que los genes de respuesta temprana al jasmonato puedan activarse. Entre estos genes de respuesta temprana encontramos los propios represores JAZ, ya que la respuesta del jasmonato debe ser reprimida una vez haya sido activada para no permanecer activa cuando el estímulo desaparece. Por ello, la activación de los represores JAZ indica una activación de los genes de respuesta temprana al jasmonato.

Por otro lado, la ruta de señalización de la hormona ácido salicílico parece estar activa [figura 13]. La activación del gen relacionado con la patogénesis PR1, se ha usado en *Arabidopsis* como marcador para la activación de la respuesta al SA. La PR1 es una proteína con capacidad tóxica para muchos patógenos ya que desestabiliza las membranas plasmáticas. La expresión de PR1 en *Capsicum* es indicativa del

proceso de activación del SA ya que es uno de las proteínas efectoras de la ruta, pero también participa en la respuesta a JA y ET. El SA a concentraciones moderadas induce la expresión de estos genes de defensa, genes PR como la PR1 (Veloso *et al.* 2014). Sin embargo, a elevadas concentraciones de SA se produce la activación de la muerte celular programada. En concreto, de un tipo de muerte celular programada específico, la HR o respuesta hipersensible. La proteína NIMIN2 se expresa a concentraciones bajas de SA interaccionando con NPR1, de esta manera se promueve la expresión de genes tempranos de la SAR y se bloquea la expresión de genes tardíos. Al aumentar la concentración de SA, NIMIN2 deja de interactuar con NPR1 y se activa la expresión de genes tardíos de la SAR. Cuando las concentraciones de SA son aún más elevadas se activa la interacción de NPR3 con NPR1 y se desencadena la muerte celular programada (Weigel *et al.*, 2001; Hermann *et al.*, 2013). La activación de este gen en las plantas de *C. chinense* indica que la muerte celular programada es uno de los procesos de defensa activos frente al TSWV que no son modulados en las plantas de *C. annuum*.

Hay que tener en cuenta que la respuesta de defensa de pimiento y de *Arabidopsis* tienen sus diferencias. En *Arabidopsis* se ha demostrado que el virus TSWV induce el sistema de defensa regulado por SA de la planta huésped, esto conduce a una disminución en la defensa regulada por JA. En esta planta la infección por TSWV mejora indirectamente el rendimiento de su vector mediante la activación opuesta de SA/JA (Hiroshi *et al.*, 2012). Sin embargo, en las plantas de pimiento resistentes encontramos que la ruta de señalización del SA y la del JA actúan de forma conjunta. Cabe destacar que en las plantas de *Capsicum chinense* no se ha detectado un aumento en la síntesis de SA tras la interacción con el virus TSWV, pero es posible que se deba a que su producción se da en las etapas tempranas de la infección antes de los 5 días a los que se tomaron las muestras. Es probable que un pico inicial de SA active la producción de JA posteriormente.

Este trabajo abre la puerta a la realización de estudios funcionales que comprueben las hipótesis sugeridas a partir del análisis de expresión diferencial.

CONCLUSIONES

- Las plantas de *C. annuum* infectadas con TSWV muestran una represión de la ruta de biosíntesis de JA pero activan rutas que favorecen la infección vírica como la ruta de respuesta al estrés por altas temperaturas.
- Las plantas de *C. chinense* infectadas con TSWV muestran una sobreexpresión de la ruta de biosíntesis de JA, de la señalización del JA y del SA, producción de ROS y activación de la muerte celular programada.
- El principal proceso biológico activado en *C. chinense* que no se encuentra en *C. annuum* es la respuesta de defensa (GO:0031347) mientras que la principal ruta activada en *C. annuum* que no se encuentra en *C. chinense* es la respuesta al estrés por altas temperaturas (GO:0009408).

BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso, M.** (05/06/2019). El virus del bronceado que amenaza la cosecha del pimiento de Padrón en O Salnés. *La Voz de Galicia*. <https://www.lavozdeg Galicia.es/noticia/somosagro/2019/06/05/bronceado-matapimiento-padron-salnes/00031559732104380745220.htm> (consultado el 25 de mayo de 2022).
- Almasi, A., Salanki, K., Nemes, K., Palkovics, L. & Tobias, I.** (2018). A case study of Tomato Spotted Wilt Virus–pepper interaction. En: Gaur, R.K. Khurana, S. & Dorokhov, Y. (eds.) *Plant Viruses*, pp.239-248. CRC Press.
- Balint-Kurti P.** (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology* 20: 1163–1178.
- Best, R.J.** (1968). Tomato Spotted Wilt Virus. *Advances in Virus Research* 13: 66-146.
- Carrizo García C., Barfuss M.H., Sehr E.M., Barboza G.E., Samuel R., Moscone E.A. & Ehrendorfer F.** (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118:35-51.
- Chen, I.H., Chiu, M.H., Cheng, S.F., Hsu, Y.H. & Tsai, C.H.** (2013). The glutathione transferase of *Nicotiana benthamiana* NbGSTU4 plays a role in regulating the early replication of Bamboo mosaic virus. *The New Phytologist*, 199: 749-757.
- Chung, B.N., Lee, J.H., Kang, B.C., Koh, S.W., Joa, J.H., Choi, K.S. & Ahn, J.J.** (2018). HR-mediated defense response is overcome at high temperatures in *Capsicum* species. *The Plant Pathology Journal*, 34: 71–77.
- Contreras Salatti, R., Depestre Manso, T.L. & Rodríguez, Y.** (2007). El virus del bronceado del tomate (TSWV) y su incidencia en el cultivo del pimiento. *Temas de Ciencia y Tecnología* 11: 33-39.
- Costa-Silva, J., Domingues, D., & Lopes, F.M.** (2017). RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. *PloS One*, 12: e0190152.
- Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Valeriu Ohan, J.M., O Pollard, M., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M. & Li, H.** (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *GigaScience*, 10: giab008
- Debreczeni, D. E., López, C., Aramburu, J., Darós, J. A., Soler, S., Galipienso, L., Falk, B. W., & Rubio, L.** (2015). Complete sequence of three different biotypes of tomato spotted wilt virus (wild type, tomato Sw-5 resistance-breaking and pepper Tsw resistance-breaking) from Spain. *Archives of Virology*, 160: 2117–2123.
- FAO.** (2021). FAOSTAT. Obtenido de FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (consultado el 6 de diciembre de 2021).
- FEPEX.** (2020). Federación española de asociaciones de productores exportadores de frutas, hortalizas, flores y plantas vivas. Obtenido de: <https://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-espa%C3%B1ola-frutas-hortalizas> (consultado el 5 de diciembre de 2021)
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205-227.
- Goellner, K. & Conrath, U.** (2008). Priming: it's all the world to induced disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 233-242.
- Gorovits, R., & Czosnek, H.** (2017). The involvement of heat shock proteins in the establishment of tomato yellow leaf curl virus infection. *Frontiers in Plant Science*, 8: 355.

- Hermann, M., Maier, F., Masroor, A., Hirth, S., Pfitzner, A. J., & Pfitzner, U. M.** (2013). The Arabidopsis NIMIN proteins affect NPR1 differentially. *Frontiers in Plant Science*, 4:88.
- Hiroshi, A., Yasuhiro, T., Takeshi, S., Shigemi, S., Tamito, S., Soichi, K., Shinya, T. & Masatomo, K.** (2012). Antagonistic plant defense system regulated by phytohormones assists interactions among vector insect, thrips and a Tospovirus, *Plant and Cell Physiology*, 53: 204–212,
- Jain, M.** (2011). A next-generation approach to the characterization of a non-model plant transcriptome. *Current Science*, 101: 1435-1439
- Jauk, F.** (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Hematología Volumen 23 Número Extraordinario XXIV Congreso Argentino de Hematología*: 21-38.
- Jazayeri, S.M., Melgarejo Muñoz, L.M. & Romero, H.M.** (2015). RNA-seq: a glance at technologies and methodologies. *Acta Biológica Colombiana*, 20: 23-35
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Jordá, C., Font, I., Lázaro, A., Juárez, M., Ortega, A., & Lacasa, A.** (2000). New natural hosts of tomato spotted wilt virus. *Plant Disease*, 84: 489.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J. & Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science*, 324: 98-91.
- Kamle, M., Borah, R., Bora, H., Jaiswal, A.K., Singh, R.K. & Kumar, P.** (2020). Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR): Role and Mechanism of Action Against Phytopathogens. En: Hesham, AL., Upadhyay, R., Sharma, G., Manoharachary, C. & Gupta, V. (eds) *Fungal Biotechnology and Bioengineering. Fungal Biology*. Springer, Cham.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg S.L.** (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10: R25.
- Lewis, S.E., Searle, S.M., Harris, N., Gibson, M., Lyer, V., Richter, J., Wiel, C., Bayraktaroglu, L., Birney, E., Crosby, M.A., Kaminker, J.S., Matthews, B.B., Prochnik, S.E., Smithy, C.D., Tupy, J.L., Rubin, G.M., Misra, S., Mungall, C.J., & Clamp, M.E.** (2002). Apollo: a sequence annotation editor. *Genome Biology*, 3: RESEARCH00821.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup.** (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078–2079.
- Lin Liu, Y., Siliang Li, N.H., Yimin He, R.P., Danni Lin, L.L. & Law, M.** (2012). Comparison of Next-Generation sequencing systems, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 251364
- Love M.I., Huber W. & Anders S.** (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15: 550.
- Lu, H. P., Luo, T., Fu, H. W., Wang, L., Tan, Y. Y., Huang, J. Z., Wang, Q., Ye, G. Y., Gatehouse, A., Lou, Y. G., & Shu, Q. Y.** (2018). Resistance of rice to insect pests mediated by suppression of serotonin biosynthesis. *Nature Plants*, 4: 338–344.
- Lyon, G.** (2007). Agents that can elicit induced resistance. En: Walters, D., Newton, A. & Lyon, G., (eds.) *Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection*, pp. 9-29. Blackwell Publishing.

- MAPA.** (2021). D.O.P. Pemento de Herbón. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Obtenido de: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/dop-igp/hortalizas/DOP_pemento_herbon.aspx (consultado el 27 de noviembre de 2021).
- MARM.** (2008). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Obtenido de: <https://www.mapa.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2523> (consultado el 27 de noviembre de 2021).
- Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1): 10-12.
- Moury, B., Selassie, K.G., Marchoux, G., Daubeze, A.M. & Palloix, A.** (1998). High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology* 104: 489–498.
- Nachappa, P., Challacombe, J., Margolies, D.C., Nechols, J.R., Whitfield, A.E., & Rotenberg, D.** (2020). Tomato Spotted Wilt Virus benefits its thrips vector by modulating metabolic and plant defense pathways in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 11: 575564.
- Nürnberg, T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 167-182.
- Pastor, V., Luna, E., Ton, J., Cerezo, M., García-Agustín, P., & Flors, V.** (2013). Fine tuning of reactive oxygen species homeostasis regulates primed immune responses in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26: 1334–1344.
- Peteira Delgado-Oramas, B.** (2020). La resistencia inducida como alternativa para el manejo de plagas en las plantas de cultivo. *Revista de Protección Vegetal*, 35(1): e07. Epub 01 de abril de 2020. Recuperado el 17 de enero de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522020000100001&lng=es&tlng=es.
- Pfaffl M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.
- Pieterse, C.M.J., van der Does, D., Zamioudis, C., León-Reyes, A. & van Wees, S.C.M.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28: 489-521.
- Pieterse M.J. & Van Loon L.C.** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 456-464.
- Quinlan, A.R. & Hall, I.M.** (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, *Bioinformatics*, 26: 841–842.
- Reche Mármol, J.** (2010). Cultivo del pimiento dulce en invernadero. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca.
- Shah, J. & Zeier, J.** (2013). Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4: 30.
- Sherwood, J.L., German, T.L., Moyer, J.W. & Ullman D.E.** (2003). Tomato spotted wilt. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2003-0613-02.

- Spoel, S.H. & Dong, X.** (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12; 89-100.
- Srivastava, A. & Mangal, M.** (2019). Capsicum breeding: History and development. En: Ramchiary, N & Kole, C (eds.). *The Capsicum Genome*, pp. 25-55. Springer.
- Tripodi, P. & Kumar, S.** (2019). The Capsicum crop: An introduction. En: Ramchiary, N & Kole, C (eds.). *The Capsicum Genome*, pp. 1-8. Springer.
- Turina, M., Kormelink, R. & Resende, R.O.** (2016). Resistance to tospoviruses in vegetable crops: Epidemiological and molecular aspects. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 347-371.
- Vallad, G.E. & Goodman, R.M.** (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science*, 44: 1920-1934.
- Veloso, J., García, T., Bernal, A. & Díaz, J.** (2014) New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology* 138: 685–693.
- Verma, S., & Gazara, R.K.** (2021). Next-generation sequencing: an expedition from workstation to clinical applications. En: Raza, K & Dry N. (eds.). *Translational Bioinformatics in Healthcare and Medicine*, pp. 29–47. Academic Press.
- Voinnet, O.** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6: 206–220.
- Walters, D.R., Ratsep, J. & Havis, N.D.** (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64: 1263-1280.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10: 57–63.
- Weigel, R. R., Bäuscher, C., Pfitzner, A. J., & Pfitzner, U. M.** (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Molecular Biology*, 46: 143–160.
- Xu, M., Chen, J., Huang, Y., Shen, D., Sun, P., Xu, Y. & Tao, X.** (2020). Dynamic transcriptional profiles of Arabidopsis thaliana infected by tomato spotted wilt virus. *Phytopathology*, 110: 153–163.
- Zhang H.Z. & Cai X.Z.** (2005). Nonexpressor of pathogenesis-related genes 1 (NPR1): a key node of plant disease resistance signalling network. *Chinese Journal of Biotechnology*. 21: 511-515.
- Zhang, Y, Zhao, L, Zhao, J, Li, Y, Wang, J, Guo, R, Gan, S, Liu, CJ, & Zhang, K.** (2017). S5H/DMR6 encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis. *Plant Physiology*, 175: 1082–1093.
- Zhao, S., Fung-Leung, W. P., Bittner, A., Ngo, K., & Liu, X.** (2014). Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PloS One*, 9: e78644.