



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

Evolución de Virus en Huéspedes con Susceptibilidad Variable: Consecuencias en Eficacia y Virulencia

REBECA NAVARRO CANALES

Director: Prof. Santiago F. Elena Fito

Tutor: Prof. Fernando González Candelas

Programa de Doctorado en Biodiversidad y Biología Evolutiva

Diciembre de 2020



Quiero agradecer este trabajo en primer lugar a todas las personas de mi vida. Por orden, mis padres y hermano: Teresa Canales, Sol Navarro y Jordi Canales: es difícil explicar la suerte que he tenido de que lo sean. Me cuesta creer que la ciencia algún día pueda contestar a preguntas como esas, a pesar de ser del gremio. Este es sin duda el lado más humano y bien recibido de la probabilidad hecha realidad y a pesar de ser complicado de comprender, todo el mundo suele hacerlo.

A Amparo Canales y Purificación Conejero, ausentes, pero todos los días conmigo en cada nueva aventura. Esta tesis tiene un poco del abrazo que no pude darles nunca más.

Al resto de mi familia: tías, tíos, primas y primos: Lourdes y Servando Canales, Pablo y Marina Ugena, Ana Muñoz y Oliver Canales. Y amigos, que son todos también mi familia: Patricia Ventura, Estela Parra, Dainiux Jokubaitis, Miguel Aldana, Rocío León, Beatriz de María, Juan José Navarro y María e Isabel Sorribes.

Por supuesto, a mi director, Santiago Elena, por aceptar dirigirme la tesis doctoral, la transmisión de conocimientos y su paciencia en todo momento. Especialmente en las correcciones y sugerencias realizando el manuscrito. A mis compañeros y técnicas de laboratorio: Francisca de la Iglesia, Paula Agudo, Silvia Ambrós, Susana Martín, José Luís Carrasco, Julia Hillung, Fernando Martínez, Héctor Cervera, Anouk Willemsen, Rubén González, Anamarija Butović y Régis Corrêa. No sólo han sido compañeros, creo que caí en el mejor lugar donde aprender sobre evolución de virus y tener conversaciones interesantes sobre muchas otras cosas que importan y por las que se debe luchar sin descanso ni rendición.

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>1</u>
1. GENERALIDADES Y EVOLUCIÓN DE LOS VIRUS	3
1.1. MUTACIÓN, SELECCIÓN Y DERIVA GENÉTICA	7
1.2. INTERFERENCIA CLONAL	11
2. SELECCIÓN DURA Y BLANDA EN POBLACIONES VIRALES	13
3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA INFECCIÓN EN PLANTAS	18
4. MODELO EXPERIMENTAL	30
4.1. LOS POTYVIRUS DEL GRABADO DEL TABACO (TEV) Y DEL MOSAICO DEL NABO (TUMV)	30
4.2. LA PLANTA COMO HUÉSPED EXPERIMENTAL: <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (<i>BRASICACEAE</i>), <i>NICOTIANA TABACUM</i> Y <i>CAPSICUM ANNUUM</i> (<i>SOLANACEAE</i>)	31
<u>OBJETIVOS</u>	<u>33</u>
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	<u>37</u>
1. DESCRIPCIÓN DE LOS HUÉSPEDES	39
1.1. <i>N. TABACUM</i> Y <i>C. ANNUUM</i>	39
1.2. <i>A. THALIANA</i>	39
2. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL	42
2.1. TEV EN <i>N. TABACUM</i> , <i>C. ANNUUM</i> Y <i>CHENOPODIUM QUINOA</i>	42
2.2. TUMV EN <i>A. THALIANA</i>	46

3. EXTRACCIÓN DE RNA	47
4. PCR CUANTITATIVA	48
4.1. TRANSCRIPCIÓN DEL PLÁSMIDO PMTEV	48
4.2. CONSTRUCCIÓN DE PATRONES	49
4.3. TRANSCRIPCIÓN DEL PLÁSMIDO PUC19 PARA TuMV	49
4.4. RT-qPCR	51
5. SECUENCIAS CONSENSO Y MUTACIONES DE LA POBLACIÓN DE VIRUS ANCESTRAL Y EVOLUCIONADA	52
6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	54
6.1. MODELOS LINEALES GENERALIZADOS	55
6.2. MODELOS AUTOREGRESIVOS INTEGRADOS DE MEDIA MÓVIL	56
7. MATRIZ DE INFECCIÓN EN EL PATOSISTEMA TuMV - <i>A. THALIANA</i>	57
<u>RESULTADOS</u>	<u>59</u>
1. EFECTO DEL TAMAÑO DE INÓCULO SOBRE LA TASA DE EVOLUCIÓN DEL TEV	61
1.1. EL NÚMERO DE GENOMAS POR UNIDAD INFECCIOSA VARÍA ENTRE DISTINTAS ESPECIES DE HUÉSPEDES	61
2. SELECCIÓN DE GENOTIPOS MUTANTES DE <i>A. THALIANA</i> PARA EL EXPERIMENTO DE EVOLUCIÓN EN HUÉSPEDES DE SUSCEPTIBILIDAD VARIABLE	65
3. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DEL TuMV EN GENOTIPOS DE <i>A. THALIANA</i> VARIABLES EN SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN	74
3.1. INFECTIVIDAD, AUDPS, TÍTULO VIRAL Y SÍNTOMAS DE LOS DISTINTOS LINAJES	75
3.2. SÍNTESIS DE LOS DATOS PARA INFECTIVIDAD Y AUDPS	85
3.3. ESTIMACIÓN DE LAS TASAS DE EVOLUCIÓN PARA INFECTIVIDAD Y AUDPS	87
3.4. EVOLUCIÓN DE LA CARGA VIRAL EN TODOS LOS GENOTIPOS MUTANTES DE <i>A. THALIANA</i>	92

3.5. DESCRIPCIÓN DE LOS CAMBIOS GENOTÍPICOS EN LAS SECUENCIAS CONSENSO DE CADA LINAJE EVOLUCIONADO	93
4. MATRIZ DE INFECCIÓN	97
4.1. TIEMPOS DE SUPERVIVENCIA DE LOS LINAJES EVOLUCIONADOS EN CADA MUTANTE: REGRESIÓN KAPLAN-MEIER	104
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA RED DE INTERACCIÓN LINAJE VIRAL-GENOTIPO DE HUÉSPED	113
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>123</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>137</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>141</u>
<u>MATERIAL SUPLEMENTARIO</u>	<u>161</u>

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades y evolución de los virus

Los estudios sobre evolución de virus son cada vez más frecuentes porque, aunque la variabilidad genética es común a todas las especies, en el caso de los virus existen particularidades que hacen que su estudio sea interesante y relevante no solo para la biología evolutiva sino también para la medicina, veterinaria y agricultura (Roossinck, 2003; Elena, 2016).

La variabilidad genética generada por los virus de RNA (ya sean o no retrovirus) es la mayor entre todos los organismos conocidos, ya que éstos son capaces de replicar un número mucho mayor de veces por unidad de tiempo que cualquier otro organismo y además sus tasas de mutación son varios órdenes de magnitud superiores, debido a la ausencia de mecanismos de corrección de errores o fidelidad de copia (Andino y Domingo, 2015). En general, lo observado respecto a virus en pocas generaciones y cortos periodos de tiempo, se observa en organismos superiores en muchas generaciones y en periodos de tiempo de millones de años.

Los patógenos emergentes se definen como aquellos en los que su incidencia aumenta debido a la aparición de uno nuevo en una nueva población huésped o debido a un aumento en la incidencia o patogenicidad de un patógeno ya residente causados por cambios en las condiciones epidemiológicas preexistentes (Woolhouse, 2005; Woolhouse et al., 2005b). Lo primero puede ocurrir cuando un patógeno inicialmente establecido en una especie huésped (fuente o reservorio) coloniza una nueva especie huésped (Nguyen et al., 2013). Después del primer salto entre especies, el patógeno puede extinguirse o persistir sin causar grandes epidemias, pero en otros casos pueden producirse epidemias devastadoras (Woolhouse et al., 2005a, Woolhouse et al., 2005b; Jones, 2009). Existe un creciente interés en dilucidar qué factores gobiernan el éxito de tales saltos entre especies huéspedes y que pueden tener consecuencias epidemiológicas y ecológicas considerables (Ohshima et al., 2002).

No es sorprendente que los virus de RNA se encuentren entre los patógenos emergentes más abundantes (Elena y Sanjuán, 2007; Holmes, 2009). Durante su ciclo de vida normal, los virus experimentan entornos continuamente fluctuantes: se mueven entre huéspedes que difieren en su susceptibilidad y respuesta a la infección, a veces transmitidos por el aire o el agua, pero a veces usan vectores (por ejemplo, insectos, nematodos,

hongos...) en los que en ocasiones también pueden replicar su genoma. Dentro de un huésped individual, los virus enfrentan distintos tipos de tejidos y de células que difieren en sus propiedades fisiológicas y bioquímicas y son constantemente desafiados por una variedad de respuestas inmunes antivirales. Para maximizar su eficacia biológica darwiniana, los virus deben necesariamente adaptarse a todos estos factores. En la mayoría de los casos, esta adaptación sucede fácilmente debido al enorme potencial evolutivo de los virus de RNA (Elena y Sanjuán, 2007; Parrish et al., 2008; Elena et al., 2009; Holmes, 2009), debido a sus altas tasas de mutación y recombinación, grandes tamaños de población y tiempos de generación o replicación muy cortos.

Todos los virus son parásitos estrictos intracelulares, lo que significa que deben desencadenar y completar el ciclo de infección dentro de su célula diana en un huésped que representa su ambiente. Este mecanismo incluye la unión del virus a la célula, su penetración, liberación de su material genético, expresión de genes del virus usando la maquinaria celular, secuestrando los recursos que sean necesarios para el parásito, y el ensamblaje de los nuevos productos para generar nuevos virus que infecten otras células del mismo huésped u otro. De esta manera, un único virión que consiga infectar una célula huésped puede, potencialmente, generar centenares o miles de nuevos virus que infecten otras siempre que eso sea posible en términos de número de virus que hayan conseguido hacerlo y número de huéspedes disponibles.

Los virus son los únicos organismos conocidos que además de tener el DNA como molécula que almacena la información genética del individuo, pueden tener al RNA realizando esta función. En este último caso, el RNA es además el mensajero de la información, por lo que sólo en los virus de RNA se daría esta característica dual única entre todos los organismos (fig. 1).

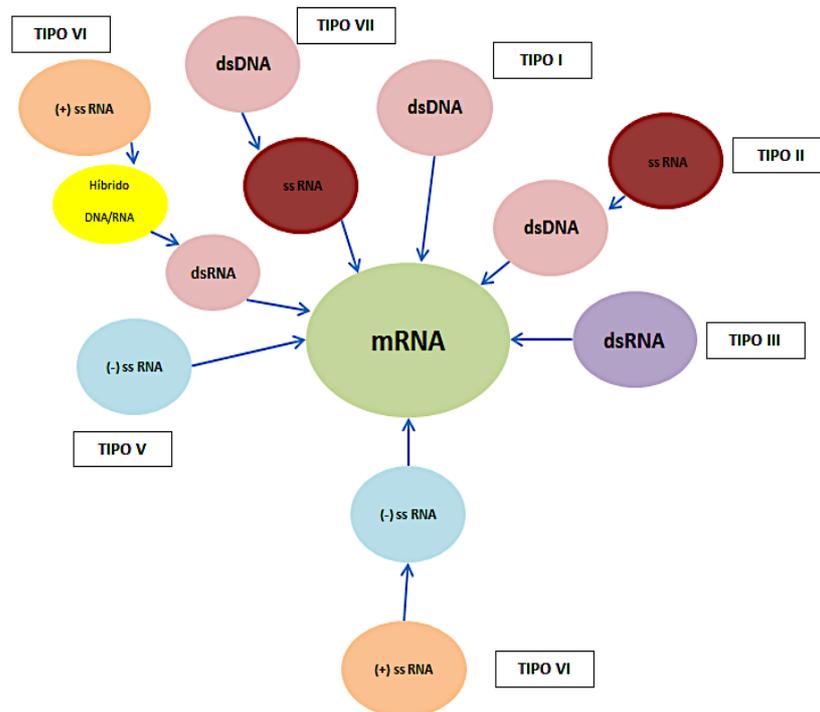


Fig. 1. Diversidad de arquitecturas genéticas y estrategias replicativas virales según la clasificación de Baltimore. Los potyvirus se encuentran en la categoría VI.

Además, los genomas virales pueden ser de cadena doble o simple, y en este último caso, de polaridad positiva (como el mRNA) o negativa (la complementaria al mRNA). Un ejemplo de virus de cadena simple y polaridad positiva son los miembros del género *Potyvirus* dentro de la familia *Potyviridae*, perteneciente al supergrupo de los picornavirus (Koonin et al., 1993). Los potyvirus son transmitidos por pulgones de forma no persistente y su localización geográfica es amplia, siendo más comunes en países tropicales o subtropicales. Este grupo de virus suele tener una gama amplia de huéspedes, aunque no siempre es así (Hollings y Brunt, 1981). Los potyvirus tienen genomas muy compactos, monopartitos y son partículas de morfología filamentosa. Este genoma codifica para una poliproteína única que después es procesada a polipéptidos multifuncionales (fig. 2).

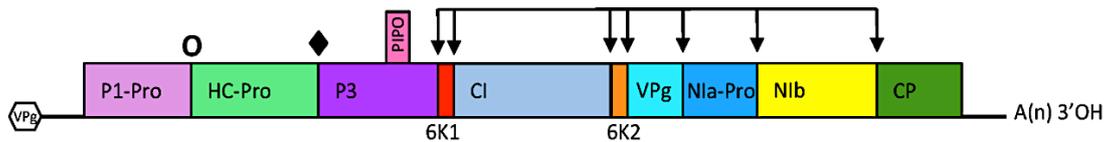


Fig. 2. Esquema general del genoma de los potyvirus. El genoma codifica para una poliproteína que luego es procesada, resultando en péptidos multifuncionales. P1-Pro (proteasa de P1), HC-Pro (*helper component* y proteasa), P3 (proteína 3), PIPO (pretty interesting *Potyviridae* ORF), 6K (péptido de 6 kDa), CI (inclusión citoplasmática y helicasa), NIa-Pro (proteína de inclusión nuclear A y proteasa), NIb (proteína de inclusión nuclear B y RNA polimerasa dependiente de RNA), CP (proteína de la cubierta).

El cistrón *CP* codifica para la proteína de la cubierta del virus y es importante para el virus en la transmisión pulgón-planta, pero también en el movimiento entre células dentro de ésta (Atreya et al., 1990; Rojas et al., 1997; Fedorkin et al., 2001), e interacciona con otras proteínas del virus relacionadas con estas funciones, como HC-Pro, que además de tener esta función, es el supresor del silenciamiento (Yelina et al., 2002). El movimiento entre células es crucial para que el virus pueda desencadenar una infección sistémica, así como el movimiento de larga distancia dentro de la planta vía floemática. El producto del cistrón *VPg* tiene ambas funciones, tanto el movimiento entre células como el de larga distancia, así como la amplificación del genoma y seguramente interacciona con HC-Pro en la ruta de silenciamiento (Schaad et al., 1997; Bayne et al., 2005; Roudet-Tavert et al., 2007; Eskelin et al., 2011). El resto de productos son la proteasa NIa-Pro (Carrington et al., 1993), la RNA polimerasa RNA dependiente NIb (Daròs et al., 1999); CI, la helicasa de RNA (Deng et al., 2015) y cuatro productos relacionados con la amplificación genómica y con función proteasa (P1), el factor de avirulencia implicado en el movimiento entre células (P3); 6K1, implicado en la replicación del virus y 6K2, relacionado con la inducción de síntomas y el movimiento a larga distancia dentro de la planta (Verchot y Carrington, 1995; Jenner et al., 2003; Salvador et al., 2006).

1.1. Mutación, selección y deriva genética

La baja fidelidad de copia en los virus de RNA puede generar una gran cantidad de mutaciones puntuales (transiciones o transversiones), que pueden ser o no sinónimas, es decir, que el cambio nucleotídico puede suponer o no un cambio de aminoácido durante la traducción. Las transiciones son más probables porque bioquímicamente las bases de la misma naturaleza se parecen más entre sí. Asimismo, una mutación, sea puntual o no, puede suponer una ventaja para el organismo o un perjuicio si es ventajosa o deletérea, respectivamente. Si no supone perjuicio o ventaja, es neutral o silenciosa (aunque existe la probabilidad de que en un nuevo suceso evolutivo ésta participe en un evento de cambio fenotípico, si actúa epistáticamente con otra nueva mutación). En cualquier caso, la naturaleza ventajosa o no de la mutación dependerá siempre del ambiente en el que esta se exprese, por tanto, para un virus, del huésped que esté infectando.

En los virus, la tasa de mutación representa un acontecimiento bioquímico durante el proceso de replicación. Esta es igual a la proporción de veces que el enzima responsable de la replicación añade un nucleótido erróneo durante esa ronda de replicación. En términos comparativos, esta tasa es más alta para virus de RNA que de DNA y también varía considerablemente entre virus de RNA (fig. 3).

Como explicaba, la alta mutabilidad en los virus de RNA se debe a la ausencia de mecanismos de fidelidad de copia, o corrección de errores, que es una actividad de la que las RNA polimerasas dependientes de RNA carecen, de forma que la variabilidad introducida en cada ronda de replicación es considerable, pudiendo ser esta beneficiosa, neutral o deletérea y contribuyendo cada mutación de forma o no diferente a la eficacia biológica (Keightley, 1998; Shaw et al., 2002; Hillung et al., 2013, 2015).

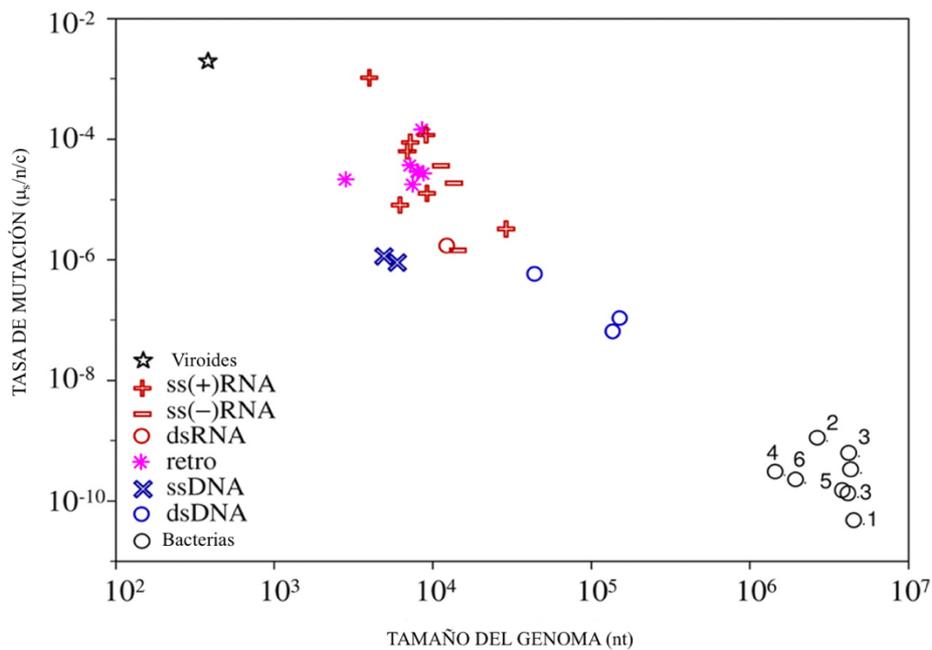


Fig. 3. Tasas de mutación según tamaño del genoma de bacterias, virus y viroides (Sanjuán et al., 2010).

La enorme cantidad de individuos que posee una población de virus hace difícil que se pueda identificar una única molécula de genoma viral, pero sí hallarse una secuencia consenso, es decir, la secuencia promedio de los individuos que la componen. Así, la población tendría un número elevado de mutantes, o variantes genéticas, denominado espectro de mutantes. A este espectro de mutantes se le denomina cuasiespecie viral (Domingo, 2006, Domingo et al., 2008).

La secuencia maestra coincide con la de mayor eficacia biológica para el virus y tiene existencia real en su población, sin embargo, en muchos casos ésta es difícil de determinar y es útil en los diseños experimentales recurrir al concepto estadístico de secuencia consenso, que puede o no tener existencia biológica, pero que nos aporta información sobre qué combinación promedio de mutaciones existen en la población en ese momento, y poder compararla con otras secuencias promedio anteriores o posteriores a lo largo del proceso evolutivo de la población estudiada (Domingo, 2006, Domingo et al., 2008).

La estrategia de los virus consiste en crear diversidad genética permanentemente, ya que es importante para su población esquivar los mecanismos de defensa (barreras físicas, mecanismos de inmunidad) de su huésped, teniendo una maquinaria replicativa que proporciona un espectro de mutantes que sea capaz de responder con rapidez a estos cambios

ambientales. Esta diversidad genética está determinada por dos factores: rondas de replicación y perturbación del equilibrio poblacional, ya sea por deriva genética o selección natural (Whitlock, 2004). En el primer factor debemos tener en cuenta que, a pesar de ser el mismo virus, no replicará el mismo número de veces en su huésped (o huéspedes) habitual que en uno nuevo. En el segundo factor, debemos tener en cuenta que, a menos que se perturbe este equilibrio, es decir, que cambie la secuencia de nucleótidos de la secuencia consenso, la población de virus no evolucionará y esto sucederá debido a la acción depuradora de la selección negativa.

En lo que se refiere a la genética de la cuasiespecie viral, la secuencia consenso permanecerá constante si el patógeno está bien adaptado y no hay cambios ambientales, no así el espectro de mutantes, que es el que sí varía como resultado de la estocasticidad mutagénica. Si la secuencia consenso permanece inalterada, decimos que el virus está en equilibrio poblacional (Holmes y Moya, 2002). Este equilibrio dependerá del balance entre la mutación, la selección -positiva o negativa-, y la deriva genética; es decir, que en un régimen evolutivo gobernado por la deriva hay mayor probabilidad de que se fije cualquier alelo, independientemente de su valor de aptitud, pero en el caso de un régimen donde la selección sea la fuerza predominante, esto se traducirá en que la probabilidad de que se fije el alelo más apto aumenta conforme sea más mayor la fuerza selectiva. Es importante recalcar que la naturaleza del suceso de una mutación es estocástica, es decir, sucede por azar y que la mayor parte de mutaciones son deletéreas, es decir, tienen efecto negativo o incluso letal en la eficacia del virus (Carrasco et al., 2007; Sanjuán et al, 2010). Las mutaciones deletéreas suelen eliminarse por selección natural. Si son beneficiosas porque la eficacia biológica aumenta y están favorecidas por la selección natural, con el tiempo pueden aumentar su frecuencia en la población y ser fijadas en ésta. La selección escoge mutaciones, pero en ningún caso suceden debido a ella.

Respecto a la deriva genética, es un proceso aleatorio que puede cambiar las frecuencias alélicas con el tiempo de manera que la población evolucione en ausencia de selección natural. Su efecto es más acusado en poblaciones pequeñas en las que se experimentan cuellos de botella. Es un proceso común en patógenos, ya que, de modo habitual, estos colonizan con pocos individuos un nuevo huésped.

Los cuellos de botella poblacionales suceden durante la transmisión de los virus entre huéspedes o entre distintas células de un mismo individuo. Cada vez que esto sucede, se introduce cierta indeterminación en el comportamiento de la cuasiespecie viral, ya que la población debe regenerar su diversidad genética a partir de unas pocas partículas infecciosas o incluso solo una (fig. 4).

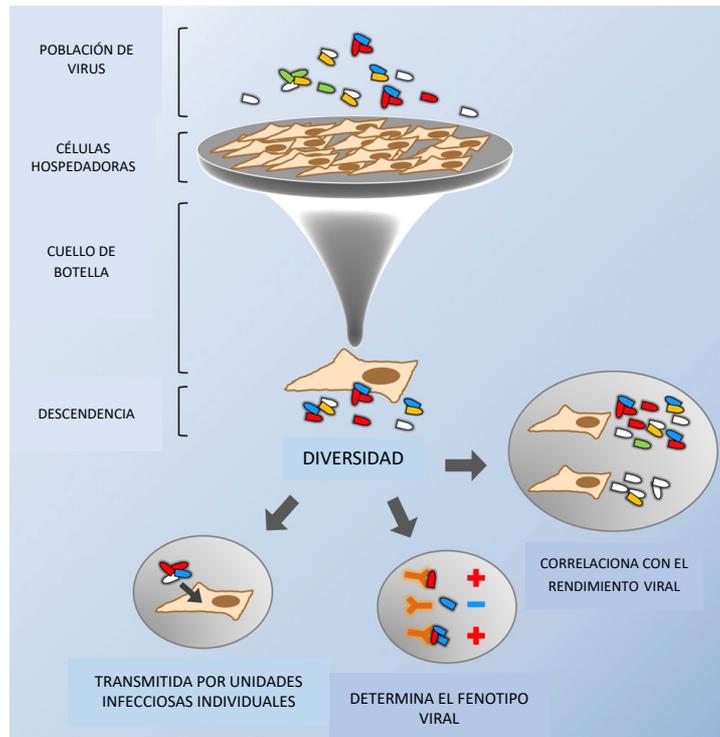


Fig. 4. Esquema de los efectos de cuellos de botella en las poblaciones de virus (Combe et al., 2015).

Cuando añadimos la variable tamaño efectivo de la población (N_e), que se puede entender como el número de individuos replicantes que contribuyen a la siguiente generación, los pases sucesivos conducirán a un aumento de la eficacia biológica conforme mayor sea N_e (Miralles et al., 1999). La evolución que emprendan estos genomas ancestrales influye en el espacio de secuencias que existirá después del cuello de botella, y además éste a su vez influirá en la composición de la población que aparecerá después de que los genomas que hayan sobrevivido al él y comiencen a replicar, para dar lugar a otra población (Lalić et al, 2010; Elena y Rodrigo, 2012). Estos cuellos de botella están relacionados con la deriva genética, de modo que en el caso de amplios espectros de mutantes donde la secuencia consenso tenga baja frecuencia, la transmisión permitirá la amplificación de un mutante independientemente de la eficacia biológica que tenga en el nuevo huésped.

En general, en lo que se refiere a los factores genéticos y ambientales importantes para la emergencia de un virus, son principalmente su potencial genético de variación y también las probabilidades que tenga de hacer un salto a una nueva especie huésped potencial; en el caso de virus de plantas, desde un reservorio silvestre a una planta cultivada. Esto puede implicar un aumento inicial de la virulencia del virus respecto al huésped original, debido a su adaptación al nuevo huésped y la consecuente especialización a éste. La virulencia puede ser medida con diferentes procedimientos (reducción de peso del huésped, cantidad de lesiones, etc) pero en cualquier caso, significaría que en términos comparativos el nuevo huésped ha sufrido mayor daño debido a la infección que el huésped original. Las mutaciones fijadas en el nuevo huésped tendrán un coste pleiotrópico cuya consecuencia sería la pérdida de eficacia biológica en el huésped original (Agudelo Romero et al., 2008).

1.2. Interferencia clonal

Una pregunta esencial en biología evolutiva es cómo la tasa de mutación, el tamaño de la población, la magnitud de los efectos mutacionales beneficiosos y la carga de mutaciones perjudiciales interactúan para determinar la tasa a la que evolucionan las poblaciones. Los experimentos de laboratorio realizados con virus (Miralles et al., 1999), bacterias (De Visser et al., 1999, De Visser y Rozen, 2005) y levaduras (Lang et al., 2013)

han demostrado que, por encima de ciertos límites, el tamaño de la población tiene un efecto de rendimiento decreciente sobre las tasas de evolución, lo que significa que hay poca ganancia en la tasa de evolución al aumentar el suministro de mutaciones beneficiosas que coexisten. Este fenómeno se conoce como interferencia clonal (Gerrish y Lenski, 1998; Desai y Fisher, 2007; Brunet y Rouzine, 2008). También se ha demostrado que la interferencia clonal juega un papel importante durante la diseminación epidemiológica y la diversificación antigénica del virus de la gripe A (Strelkova y Lässig, 2012).

Básicamente, la interferencia clonal significa que los alelos beneficiosos en linajes coexistentes dentro de una población grande deben competir entre sí en su camino hacia la fijación y, por lo tanto, solo prevalecerá el mejor de ellos, ralentizando de esta manera la tasa de evolución. Después, aparecerá el segundo alelo y aumentará su frecuencia de fijación, pero ya en el fondo genético de la primera (suponiendo que todavía sea beneficioso en ella). Por lo tanto, en régimen de interferencia clonal, los alelos beneficiosos se fijarán secuencialmente. La velocidad a la que los alelos beneficiosos se fijan en la población viene dada por

$$v \approx s^2 \ln(N_e^2 U_b \langle s \rangle) / \ln^2(\langle s^2 \rangle N_e U_b) \quad (1)$$

donde $\langle s \rangle$ es el efecto beneficioso promedio, U_b es la tasa a la cual se producen las mutaciones beneficiosas y N_e el tamaño efectivo de la población (Desai y Fisher, 2007). De hecho, una de las ventajas de la reproducción sexual es agrupar en el mismo genoma ambos alelos beneficiosos, relajando así la interferencia clonal. En poblaciones pequeñas, los alelos beneficiosos también se fijarán de forma secuencial, pero por una razón diferente: porque la probabilidad de que aparezcan mutaciones beneficiosas y de que sobrevivan a la deriva cuando son infrecuentes es baja (Gerrish y Lenski, 1998). La tasa de evolución en tal régimen de mutación-selección es dada por la relación más simple

$$v = \langle s^2 \rangle N_e U_b \quad (2)$$

lo que indica que la tasa de evolución debería aumentar linealmente con la disponibilidad de los alelos beneficiosos $N_e U_b$ y su efecto cuadrático promedio $\langle s^2 \rangle$.

Los cuellos de botella poblacionales son eventos generalizados durante la transmisión de virus de un huésped a otro, pero también entre diferentes tejidos dentro de un individuo infectado (Zwart et al., 2011). Cuellos de botella muy severos activan el trinquete de Müller, un proceso que resulta en un aumento en la carga genómica de mutaciones deletéreas, con una disminución concomitante en la eficacia biológica (Chao, 1990; de la Iglesia y Elena, 2007) que teóricamente puede llevar a las poblaciones a la extinción (Lynch et al., 1993). De hecho, se ha demostrado con el virus de la estomatitis vesicular, que el tamaño del cuello de botella que activa el trinquete de Müller depende de la eficacia biológica del genotipo utilizado en los experimentos y de la variación genética beneficiosa presente en el inóculo (Novella et al., 1995, 2008; Dutta et al., 2008). En poblaciones suficientemente grandes, dicha variación se amplifica rápidamente y elimina las variantes perjudiciales, lo que ralentiza e incluso revierte el proceso de pérdida de eficacia biológica.

Aunque en general una unidad infecciosa viral es suficiente para desencadenar la infección (Zwart et al., 2011, 2012; Forrester et al., 2012), muchas propiedades relevantes de la infección, como la cantidad total de virus acumulado, la respuesta inmune del huésped y la gravedad de los síntomas dependen directamente del tamaño del inóculo (Zwart et al., 2012; Lafforge et al., 2012).

Hasta ahora, la mayoría de los estudios mencionados que exploran la interacción entre N_e , U_b y v se han realizado en sistemas experimentales simplificados excesivamente, como cultivos celulares (Chao, 1990; Duarte et al., 1992; Lynch, 1993; de la Iglesia y Elena, 2007; Dutta et al., 2008) o *in vitro* con medios artificiales (De Visser et al., 1999, 2005).

2. Selección dura y blanda en las poblaciones virales

En términos generales, hay tres formas en que el estudio de la evolución de virus de RNA ha procedido, y puede hacerlo en el futuro: teórico, experimental y comparativo. Si bien los tres enfoques tienen sus propios pros y contras, aquí en su mayoría tomaremos el método experimental. La evolución experimental ha sido una de las formas de estudiar la evolución de los virus de RNA más utilizada hasta la fecha (Sanjuán, 2007; Elena et al., 2008). Tal es el éxito de la evolución experimental que se ha utilizado para revelar los mecanismos de cambio evolutivo en general, y de los virus de

RNA en particular (Elena y Sanjuán, 2007; Elena et al., 2008). El poder de los análisis experimentales de los virus de RNA es en gran medida una función de su capacidad de tratamiento para los estudios de laboratorio, por lo que la evolución se puede seguir en tiempo real y en una variedad de fondos genéticos y ambientales considerable. Además, a menudo existe un vínculo directo y simple entre el genotipo y su fenotipo: la eficacia biológica relativa, que es fácil de evaluar midiendo la cinética de crecimiento durante los experimentos de competición. La principal limitación de los estudios de evolución experimental es que la evolución *in vitro* a menudo es muy diferente de la evolución en la naturaleza, particularmente para sistemas distintos a los bacteriófagos, lo que hace difícil generalizar desde tipos celulares individuales hasta organismos completos, y luego a escala epidemiológica. Sin embargo, esta debilidad de los estudios de evolución experimental de virus se supera mediante el uso de virus de plantas. Para estos virus, los experimentos de evolución se pueden ejecutar usando huéspedes completos y vivos que son relativamente fáciles de manipular y morfológicamente bien caracterizados, pero con una organización espacial compleja de tejidos, procesos de desarrollo complejos que implican diferentes tipos de células y varias defensas antivirales que entran en juego. Sin mencionar que los problemas éticos asociados con la experimentación animal no existen, y que para algunos sistemas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Elena y Sanjuán, 2007) la cantidad disponible de información genómica y fisiológica permite una disección precisa de las respuestas del huésped a la infección viral (Krishna y Gloor, 2001; Lafforge et al., 2011).

La diversidad genética de las especies influye en la dinámica de los ecosistemas (Loreau, 2001). Una gran diversidad dentro de una especie determinada significa ecosistemas más productivos, más resiliencia frente a las perturbaciones y una recuperación más rápida después de las perturbaciones (Reusch et al, 2005). Los parásitos son uno de los factores perturbadores más comunes de los ecosistemas (Poulin, 1998) y, por lo tanto, son un factor a considerar al estudiar los efectos de la diversidad genética del huésped. Las epidemias pueden llevar a la extinción de la población (Pounds, 2006; Rauch, 2006), pero incluso sin epidemias, los parásitos pueden reducir la densidad, el crecimiento y la productividad del huésped y, por lo tanto, afectar el funcionamiento de los ecosistemas (Pounds et al, 2006). Además, la diversidad genética del huésped para los genes implicados en la resistencia contra la infección también influye en la evolución de los parásitos (Altermatt y Dieter, 2008; Keesing et al, 2006).

Las poblaciones de huéspedes con baja diversidad genética en loci relacionados con la resistencia, muestran una mayor prevalencia de infecciones que poblaciones con gran diversidad. Las evidencias que apoyan esta idea provienen de la agricultura, donde se demostró que los cultivos genéticamente homogéneos son más susceptibles a las enfermedades que los cultivos heterogéneos (Mundt, 2002). Se ha acumulado consenso adicional a lo largo de los años para muchos otros organismos. En un extremo, las poblaciones formadas solamente por individuos susceptibles tienen una alta probabilidad de extinción. En el otro extremo, las poblaciones compuestas únicamente de individuos resistentes tendrán la tasa de infección más baja. Sin embargo, las poblaciones naturales están compuestas por individuos con diferentes grados de susceptibilidad. Cómo la diversidad genética del huésped influye en la evolución de los microparásitos es el tema de este estudio.

Dado que los virus evolucionan más rápido que sus huéspedes multicelulares, las posibilidades de generar mutantes de escape mientras se replican en un genotipo de huésped permisivo son altas, poniendo en peligro la viabilidad de poblaciones formadas por individuos resistentes solo al virus no mutado (Martínez et al., 2012). De hecho, este proceso puede conducir a la adaptación local del virus, donde tienen una eficacia biológica mayor en su huésped de partida, pero menor en los otros (Bedhomme et al., 2012; Hillung et al., 2014). La adaptación local a un genotipo huésped particular reduce la probabilidad de una transmisión exitosa a uno diferente, lo que ralentiza la tasa de propagación epidémica. Si bien la heterogeneidad en la susceptibilidad ralentiza la propagación de la infección, demasiada diversidad permitirá la infección por una gama más amplia de virus (Van Baalen, 2006). Por lo tanto, el resultado a largo plazo de la interacción entre las poblaciones del huésped y del virus depende del grado de diversidad genética en ambos contendientes (Elena et al., 2011; Elena y Rodrigo, 2012).

La interacción entre los genotipos del huésped y los genotipos del parásito se ha modelado en el contexto de dos enfoques diferentes. En un extremo, el modelo de gen por gen (GFG), donde un genotipo de parásito puede infectar a todos los genotipos del huésped y existe un genotipo de huésped universalmente susceptible (Flor, 1971). La resistencia se produce cuando un gen de "resistencia" del huésped se corresponde con al menos un gen de "avirulencia" del parásito. El polimorfismo en infectividad y resistencia se puede mantener solo si la virulencia implica un coste para el patógeno.

En el lado opuesto, el modelo de alelos coincidentes (MA) se basa en sistemas de autoreconocimiento en invertebrados. La infección no es posible a menos que el parásito posea todos los alelos que coincidan con los del huésped (Frank, 1993). En este caso, el polimorfismo en infectividad y resistencia se mantiene mediante una selección negativa dependiente de la frecuencia. El enfoque clásico para estudiar estos modelos ha sido probar varios genotipos de huéspedes y parásitos en un experimento de infección cruzada y usar técnicas estadísticas de tipo ANOVA para evaluar si existe un efecto estadístico significativo de la interacción huésped por parásito.

En los últimos años, la teoría de redes se ha aplicado al estudio de la interacción entre bacterias y fagos (Flores et al., 2011 y 2013). Este enfoque ha revelado (i) que las redes de infección muestran una estructura anidada característica causada por la existencia de virus generalistas que infectan a la mayoría de los huéspedes y huéspedes muy permisivos disponibles para la mayoría de los virus (fig. 5). (ii) Las redes son antimodulares, ya que los grupos de virus tienden a infectar grupos de huéspedes no superpuestos (fig. 5). El GFG predice matrices de infectividad anidadas (Almeida-Neto et al., 2008; Valverde et al., 2017), ya que el espectro de huéspedes del virus especialista es un subconjunto del rango de virus generalistas. Por el contrario, MA predice que las matrices de infección han de ser modulares, ya que la infección es probable para los virus y el huésped del mismo módulo, pero rara para los que pertenecen a otros módulos.

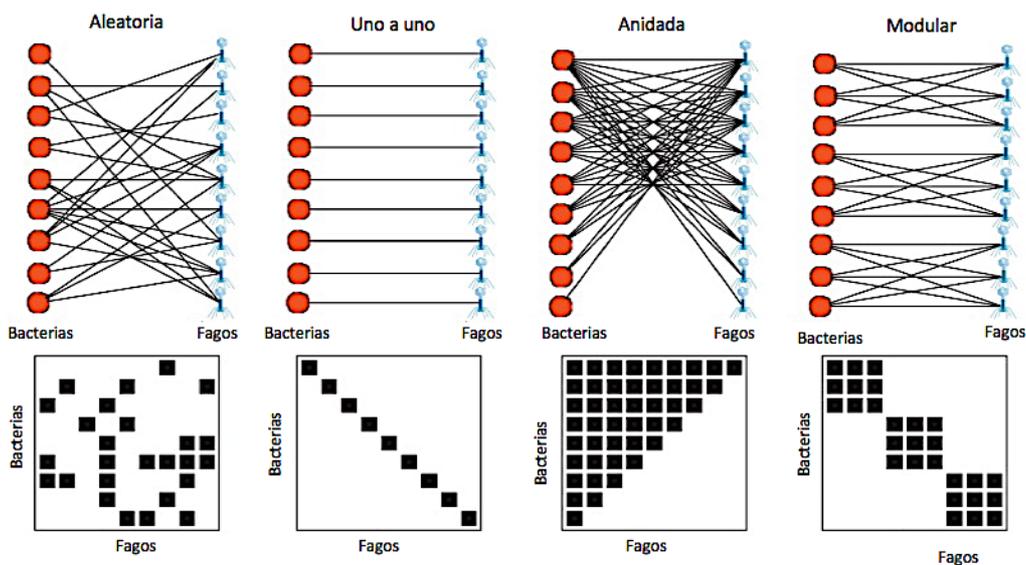


Fig. 5. Redes de interacción fago-bacteria. De izquierda a derecha: aleatoria, uno a uno, anidada y modular (Weitz et al., 2013).

Todo esto está relacionado en términos evolutivos con la susceptibilidad de los posibles huéspedes del parásito, ya que un huésped con una susceptibilidad reducida a la infección por virus (hiposusceptible) representa una situación de selección dura para la población de virus. Cuando este tipo de selección está en funcionamiento, se producen fuertes cuellos de botella, ya que la mayoría de los genotipos virales no pueden replicarse. En consecuencia, el tamaño efectivo de la población es muy pequeño, la deriva genética se vuelve más importante y no necesariamente las mutaciones más aptas se fijan en la población. En huéspedes con mayor susceptibilidad (hipersusceptibles), la situación corresponde a la selección blanda, donde la mayoría de los genotipos virales son viables y contribuyen a la próxima generación (Chao et al., 2000). El tamaño efectivo de la población es grande y la selección es eficiente para escoger los genotipos más aptos. Debido a ello, los procesos evolutivos pueden generar poblaciones generalistas (los integrantes de la población de virus serán heterogéneos genéticamente y podrán infectar a la mayor parte de huéspedes o a todos), o más especialistas, lo que significa que hay un genotipo predominante que puede infectar a pocos huéspedes o si se alcanza el mayor grado de especialización, sólo a uno de ellos.

Uno de los métodos más usados para medir presiones selectivas en estudios de evolución es la tasa de cambio no sinónimo (comparada o no con la de cambio sinónimo), ya que ésta mide cuántos cambios de aminoácido ha habido tras la existencia de una presión selectiva determinada. Aunque los cambios pueden suceder en todo el genoma del virus, hay regiones más variables porque de suceder este cambio, para el virus es más fácil escapar al fondo genético que le es desfavorable. En el caso de los potyvirus, como el TEV o el TuMV, existen varios genes variables que tienen que ver con estos mecanismos como *VPg*, que codifica para la proteína del virus relacionada con el movimiento entre células de la planta y esencial para la infección sistémica, ya que es un factor de virulencia, pero siendo su función principal la multiplicación viral; de hecho, junto con la proteína de la cubierta del virus CP, son los únicos productos de expresión que se hallan en la partícula viral madura (Nicolas et al., 1997). La importancia de *VPg* en la patogénesis está relacionada con la formación de un complejo con el producto del gen *Nla-Pro*, la principal proteasa del virus, ya que este complejo puede inducir una disminución de la traducción de proteínas sintetizadas en la infección primaria necesarias para la resistencia del huésped. La idea en esencia es que un patógeno debe evadir las defensas del huésped, que pueden encontrarse fuera o dentro de la célula,

y si esto es así, será más probable que pueda replicar, por lo que es esperable que la presión selectiva sobre esa clase de genes sea alta. De acontecer mutaciones beneficiosas en estas regiones, el virus aumentaría sus posibilidades de escapar a las defensas de la planta, adaptándose al nuevo ambiente y dejando atrás las dificultades para desencadenar la infección sistémica. El mecanismo de patogénesis está definido como el proceso mediante el que la infección inicial de la población viral es capaz de causar la enfermedad en el huésped.

El producto de expresión de *VPg* en potyvirus se ha visto importante para la patogénesis porque interacciona con factores de inicio de la traducción como eIF4E, llegando a desaparecer los síntomas en virus mutantes de este gen. Si la mutación en *VPg* es apta para el virus en el fondo genético de la planta, en el virus mutado el producto de *VPg* sí podría interaccionar con el factor de traducción y completar el ciclo de patogénesis (Leonard et al., 2000; Gallois et al., 2010).

La respuesta defensiva de los huéspedes puede ser entonces una fuerza selectiva que diversifique genéticamente la población del virus, o cambie las frecuencias de las distintas variantes genéticas que la componen. Esta dinámica es esencial para comprender la evolución del virus y, en los procesos experimentales en los que se realizan pases seriados, también cobra gran importancia la deriva genética.

3. Mecanismos de resistencia a la infección en plantas

En los potyvirus, además de los mecanismos de inmunidad intracelular como presión selectiva también existen rutas de defensa de la planta que son activadas en presencia de patógenos (estrés biótico) (Faulkner y Robatzek, 2012) o estrés abiótico (calor, temperatura) y que pueden suponer un ambiente más restrictivo para el virus en términos replicativos o de eficacia biológica. Algunas de estas rutas incluyen hormonas (Divi et al., 2010) e inducen la expresión de genes de resistencia (Carr, 2007; Denance et al., 2013; Ross et al., 2014; Alazem y Lin, 2015; Boualem et al., 2016; Shigenaga y Argueso, 2016; Calil y Fontes, 2017).

El ataque de un patógeno puede desencadenar en la planta la respuesta hipersensible (HR) (Valkonen, 1997). El reconocimiento del patógeno por parte de la planta crea condiciones desfavorables para éste, de forma

primaria, en la zona en la que el patógeno ha tomado un primer contacto con la planta. Algunas estrategias de la planta son impedir la diseminación de proteínas del patógeno (enzimas, toxinas) o la muerte celular o tisular localizada.

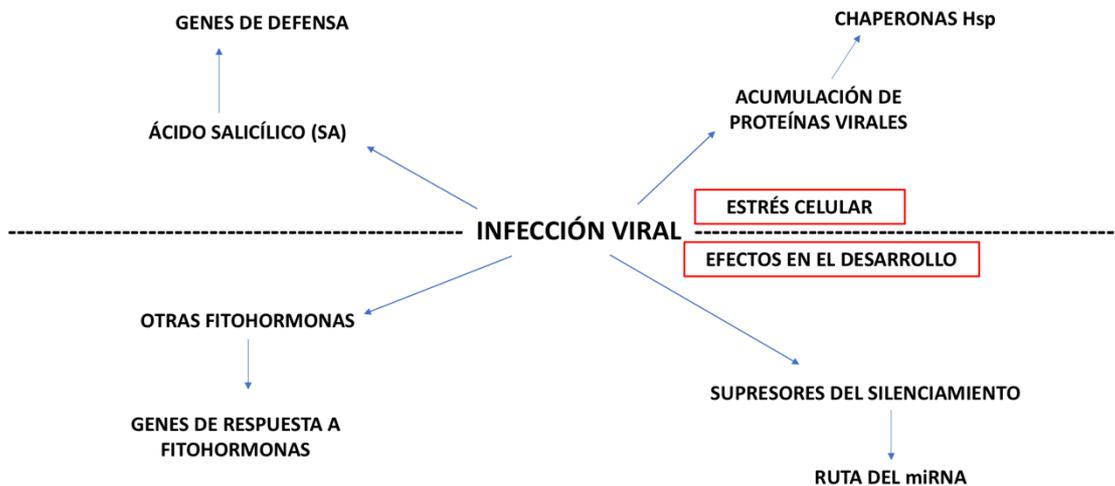


Fig. 6. Esquema general de los mecanismos asociados a la infección viral en plantas.

La respuesta inmediata puede inducir algunos genes, pero es la respuesta local más avanzada en el tiempo la que lleva a la síntesis de hormonas y por tanto la que lleva a la expresión de genes relacionados con patogénesis (PR) que además de acumularse y debido a su síntesis sostenida en el tiempo, pueden llevar a la respuesta sistémica de la planta y a la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Glazebrook, 1996, 1999; Love et al., 2005).

Por otro lado, las plantas pueden desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR), relacionada también con las rizobacterias [Pieterse et al., 2000], pero que tiene nexos en común con la SAR, relacionada con la síntesis de ácido salicílico (SA) (Singh, 2004). Esta respuesta inducida está relacionada con la síntesis de ácido jasmónico (JA) y/o etileno (ET), pero ambas convergen en el *NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENES 1 (NPR1)*, un factor de transcripción que regula ambas rutas, pudiendo estar relacionadas o no con el mismo proceso o varios al mismo tiempo (figs. 6 y 7) (Shigenaga y Argueso, 2016).

La síntesis de SA lleva a la activación de tioredoxinas que reducen los residuos conservados de cisteínas en NPR1, que debido a ello cambia su conformación a sus formas monoméricas, relocalizándose al núcleo desde el citosol. Una vez en el núcleo, interactúa con factores de transcripción de la clase bZIP (*basic leucine zipper*), llamados TGAs e implicados en la

activación de genes de resistencia a la patogénesis (Després et al., 2000; Johnson et al. 2003; Tada et al., 2008).

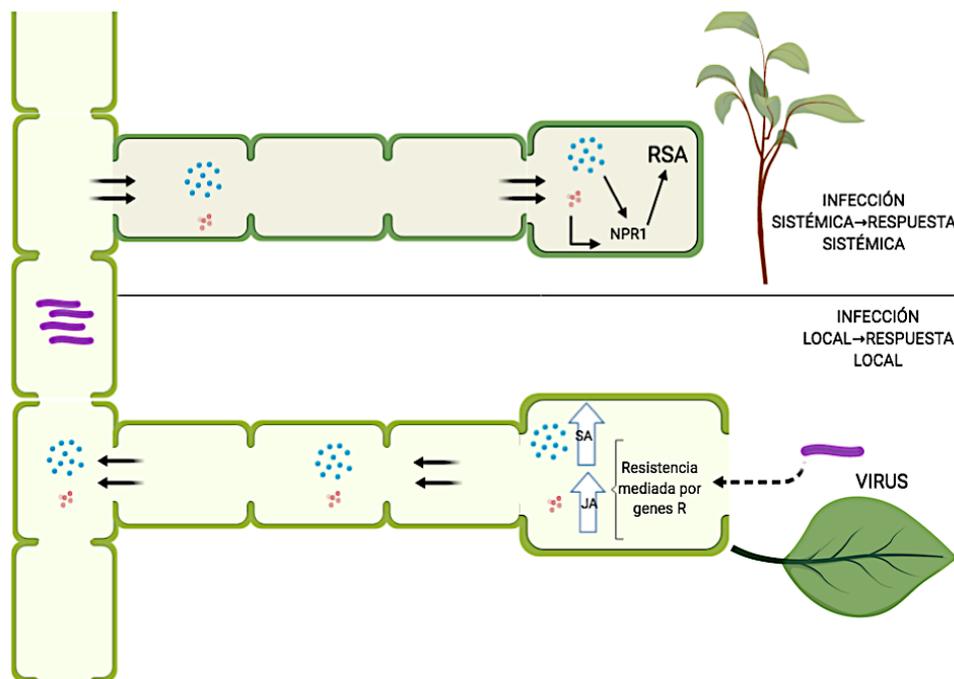


Fig. 7. Esquema general del papel de las hormonas vegetales en la resistencia sistémica adquirida (SAR).

En el nivel celular, la detección del patógeno por parte de la planta conlleva la existencia de un patrón molecular asociado al patógeno característico llamado PAMP (Vidhyasekaran, 2014). El reconocimiento es llevado a cabo por proteínas receptoras transmembrana con dominio extracelular de unión a ligando e intracelular proteína-quinasa, llamadas RLKs, que comienzan con el reconocimiento y llevan a la activación de la ruta de transducción de señales. Esta activación comienza una cascada de reacciones mediada por proteína-quinasa dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) y MAPKs (proteína-quinasa activadas por mitógeno) para generar a su vez SA, JA y/o ET, hormonas principales de defensa de la planta (Palermo et al., 2008; Denance et al., 2013).

El SA se acumula en lugares próximos a la infección y deriva de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, es un compuesto fenólico sintetizado por las plantas en respuesta a multitud de patógenos biotróficos (Vlot et al., 2009) cuya presencia es esencial para desencadenar la resistencia local. Esta hormona comienza a acumularse durante la respuesta local y está relacionada con la respuesta sistémica (SR), la regulación de la activación transcripcional y la síntesis de proteínas PR, que son enzimas degradativas. Es responsable también de activar la SAR en tejidos distales a la infección,

lo que puede evitar ataques secundarios y la propagación del virus más allá de la zona primaria de infección (fig. 7). El SA es requerido para la respuesta inmunitaria innata ya sea activada por PAMPs o por inmunidad desencadenada por efectores, ETI (Katagiri y Tsuda, 2010). En la fig. 8 se indica la relación entre ambas, surgida por mecanismos coevolutivos patógeno-huésped.

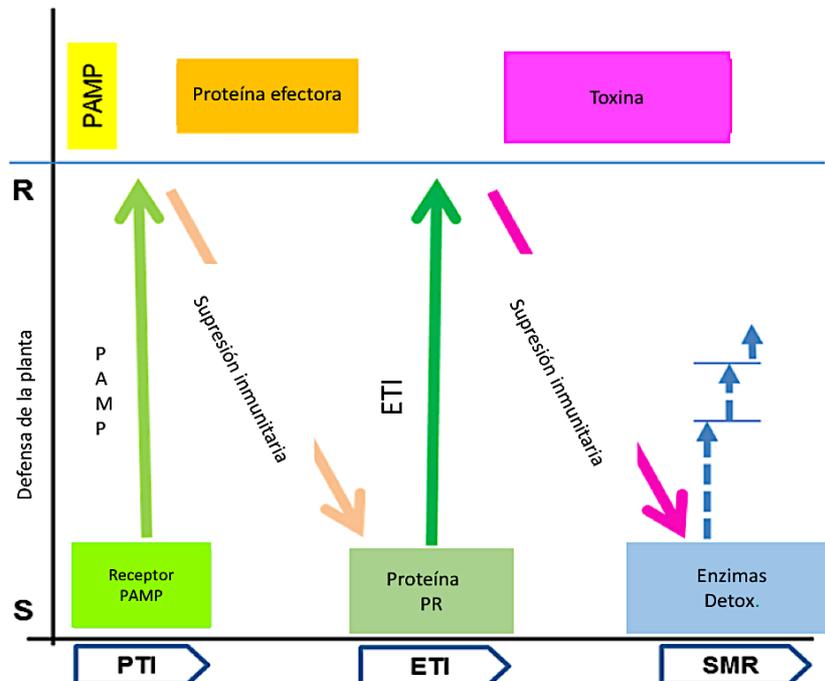


Fig. 8. Mecanismos de inmunidad intracelular en plantas y su relación temporal tras la infección (Jones y Dangl, 2006). SMR (resistencia mediada por pequeñas moléculas).

Los patrones PAMP (fig. 8) llevan a un tipo de inmunidad, la inmunidad activada por PAMPs (PTI), que puede ser suprimida por algunos patógenos debido a la coevolución patógeno-huésped mediante efectores (Carius et al., 2001). La PTI es la primera fase de inmunidad intracelular y de ser suprimida por el patógeno, lleva a que la planta sea susceptible debido a la acción efectora; sin embargo, existe una segunda capa de inmunidad intracelular, también generada por mecanismos adaptativos coevolutivos pero esta vez beneficiosos para la planta, que puede permitirle reconocer los efectores mediante proteínas con dominios de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucinas (NLR), desencadenando la ETI y activando la síntesis de SA (Cui et al., 2015) que a su vez activaría los elementos corriente abajo de la cascada de transducción (factores de transcripción, traducción, etc). *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1)* codifica una lipasa nucleocitoplasmática que interacciona con NLRs requerida en el núcleo para desencadenar la HR induciendo receptores inmunitarios, por lo que es un factor de resistencia (Reuber et al., 1998). EDS1 interacciona tanto en el

núcleo como en el citoplasma con otro regulador de la defensa de la planta, *PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 (PAD4)* (Meier et al., 2019). En un experimento con dobles mutantes, se concluyó que ambos actúan al mismo nivel de la ruta de transducción, ya que los dobles mutantes *pad4/cpr5* y *eds1/cpr5* no tenían fenotipos estadísticamente diferentes (Clarke et al., 2001). En lo que concierne a CPR5 (expresión constitutiva del gen *PR5*), es una proteína transmembrana también relacionada con PAD4 y con la HR (Kirik et al., 2001), cuyos mutantes tienen activada constitutivamente la ruta del SA, ya que el genotipo silvestre utiliza el producto de *CPR5* para reprimir la acumulación de SA y regular el estrés y el crecimiento de la planta, y por tanto los mutantes no pueden reprimir su acumulación y son resistentes a la acción de patógenos como los potyvirus. Las rutas de inmunidad activas consumen recursos y pueden ralentizar considerablemente el crecimiento de la planta (Meng et al., 2017), lo que hace que los mutantes de *cpr5* tengan un fenotipo típicamente más pequeño en tamaño y con manchas cloróticas.

Mutaciones en la ruta del SA deterioran la defensa de la planta incluso en presencia de PRs (Dinesh-Kumar et al., 2000; Baebler et al., 2014). La aplicación de SA aumenta la capacidad defensiva de la planta. Los efectos del SA en la planta son diversos y dependientes del patosistema virus-huésped del que se trate; por ejemplo, en tabaco y arabidopsis, la resistencia inducida por SA tras la infección con CMV inhibe el movimiento sistémico viral, en calabaza resulta en un menor título viral, lo que indica que afecta más al movimiento celular que al sistémico (Mayers et al., 2005).

Las infecciones virales en plantas susceptibles inducen simultáneamente hormonas que pueden ser o no antagónicas y que pueden acumularse secuencialmente (Alazem y Lin, 2015). La SAR es activada por virus, la formación de la lesión local en el sitio inicial aumenta la concentración de SA, y la señal es transportada por vía floemática. Para generar la SAR es necesario que existan lesiones necróticas como parte de la HR o como síntoma de la enfermedad, aumentando la concentración de SA y emitiéndose SA volátil hacia partes distales de la planta; de esta manera se sintetizan PRs tras la activación de sus genes en partes no invadidas de la planta.

La propagación del virus es restringida por dos vías relacionadas, el silenciamiento génico y la ruta del SA. Las hormonas pueden controlar la ruta del silenciamiento génico a nivel transcripcional o post-transcripcional.

El SA es antagónico al JA y el ET y estos a su vez inhiben el SA a través de factores como *JASMONATE INSENSITIVE 1 (JIN1)* o la ruta de las MAPK, sin embargo, el ET y el JA tienen efectos sinérgicos entre sí. Todo ello está esquematizado en la fig. 9 (Moissiard y Voinnet, 2006; Denance et al, 2013; Alazem y Lin, 2015; Csorba y Burgyán, 2015; Shigenaga y Argueso, 2016).

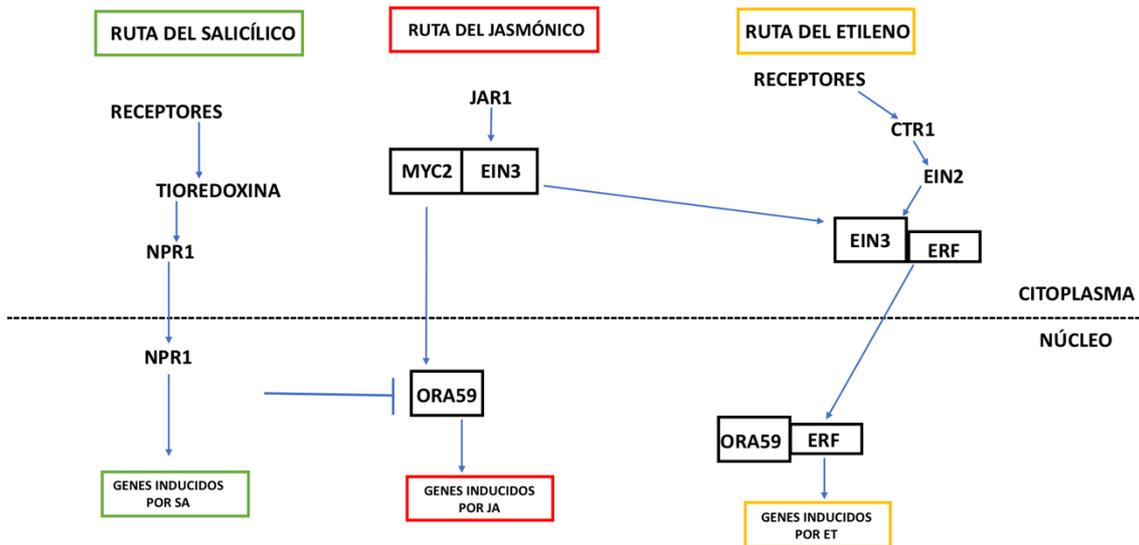


Fig. 9. Principales factores de las rutas de transducción de señales de SA, JA y ET.

La represión de la replicación viral mediada por SA parece estar relacionada con el silenciamiento génico (Alamillo y García, 2006; Campos et al., 2014; Yu y Kumar, 2003) en tabaco y arabis. RNAs de doble cadena (dsRNA), que en el caso de los potyvirus son intermediarios necesarios para la replicación del genoma. Estas estructuras son procesadas en siRNAs virales (RNAs pequeños interferentes) por endonucleasas tipo DICER (DCLs) (García-Ruiz et al., 2010; Laressergues et al., 2006; Moissiard y Voinnet, 2006). Estos RNAs virales son procesados en fragmentos de 21-22 nucleótidos e incorporados a complejos efectores inducidos por RNA (RISC) (Dzianott y Bujarski, 2012). El complejo formado por RISC y estos fragmentos tienen como diana RNAs virales que degrada por restricción o inhibición traduccional (Akbergenov et al., 2006; Aregger et al., 2012; Chellappan, 2005) (fig. 10). El SA puede actuar corriente arriba en la ruta del silenciamiento, amplificando su acción, pero no está claro qué componentes ni en qué punto de su ruta actúan regulando el silenciamiento, aunque existen evidencias de que los genes que codifican para las DCLs y sus productos, parecen ser independientes de la ruta del SA en algunos patosistemas, y que este actúa sobre el silenciamiento por otras vías (Lewsey y Carr, 2009), al menos en el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), sin embargo, en el caso

del virus del mosaico del tomate (ToMV) el SA sí parece actuar sobre el silenciamiento a través de las DCLs 1 y 2 en plantas de tomate (Campos et al., 2014).

El JA es un tipo de oxilipina que deriva del ácido linoléico oxigenado (Petek et al., 2014). Aumenta con el ataque por patógenos tanto local como sistémicamente y es necesario para activar genes que codifican para inhibidores de proteasas (PI) y de algunos genes que codifican para PRs (Lorenzo et al., 2004), igual que sucede con el ET (Glazebrook, 1999) regulando la ISR. Aparece en estadios tempranos de la infección por el virus Y de la patata (PVY) y el virus X de la patata (PVX) (García-Marcos et al., 2013; Pacheco et al., 2012), ya que sus genes son modulados en la primera fase de la infección. Plantas tratadas con JA y posteriormente con SA aumentan su resistencia (Zhu et al., 2014), pero cómo el JA regula la ruta del SA es algo que todavía se desconoce. La aplicación exógena de JA o sus derivados lleva a la producción de proteínas de defensa que se generan típicamente en las infecciones por patógenos necrotróficos, como las defensinas o tioninas, ya que este es un regulador positivo de la inmunidad en el caso de estos patógenos necrotróficos, pero negativo en el caso de los patógenos biotróficos (Thomma et al., 1998). Un factor de transcripción esencial para comprender cómo funciona la ruta del JA es MYC2 (Lorenzo y Solano, 2005) regulador negativo de los genes de respuesta a la infección por patógenos necrotróficos y positivo del daño tisular por insectos (Lorenzo et al., 2004). En el genotipo silvestre es requerido para suprimir la síntesis de SA, pero muchas otras funciones han sido descubiertas (Dombrecht et al., 2007), como su implicación negativa en la ruta del triptófano y positiva en la síntesis de flavonoides o ascorbato (dos de los grupos de moléculas principales especies reactivas del oxígeno - ROS). El mutante *jin1* muestra resistencia a patógenos fúngicos necrotróficos y dada la multitud de funciones en las que podría influir MYC2, el alelo mutado también podría influir en otras rutas (positiva o negativamente) como la síntesis de hormonas, metabolismo del triptófano o metabolismo de las especies ROS, responsables del estrés oxidativo que se genera con la infección por virus y que la planta contrarresta sintetizando antioxidantes como el ascorbato o las antocianinas (flavonoides), en el genotipo silvestre no mutado.

El ET es sinérgico a la acción del JA (Penninckx et al., 1996, 1998) y está involucrado en ciertas fases del desarrollo, como la senescencia y la defensa contra patógenos, aunque solo se han descrito unos pocos casos en que

éste esté involucrado en defensa contra virus como el CaMV o TMV (Geri et al., 2004). Es una hormona que se sintetiza a partir de la metionina y es activa en estado gaseoso. Para activarse y que comience la ruta de señalización, debe unirse al menos a uno de sus receptores (ETRs, ERSs o EINs), que son quinasas localizadas en la membrana del retículo endoplasmático, que a su vez activan los factores de transcripción de la ruta del ET en el núcleo (Merchante et al., 2013). Su acción principal en lo referente a virus parece ser la acción sinérgica que tiene con el JA y por tanto antagónica con el SA igual que este último, ya que la aplicación de JA y ET induce la expresión de sus genes de forma significativamente mayor cuando se aplican juntos que por separado (Lorenzo et al, 2004; Divi et al 2010).

En resumen, las rutas anteriormente mencionadas pueden suponer un caso de selección fuerte para el virus si se trata de rutas cuya resistencia está activa o selección débil si no es así. Esto sería crucial en la evolución del virus durante el proceso experimental, ya que podría encontrarse con un ambiente hiposusceptible a su infección si se da el primer caso o hipersusceptible en el segundo. En el primero el tamaño efectivo de la población será mucho menor que en el segundo y es esperable que se fije cualquier alelo, independientemente de si es o no el más apto en esas circunstancias; y en contraposición tendríamos el segundo caso, donde ese tamaño es mucho mayor y esto aumenta también la probabilidad de que se fijen los alelos que el virus necesita para adaptarse a esas condiciones (Kelley et al, 2005).

Además, como decía, la complejidad genética del huésped lleva a que, en presencia del patógeno, éste active mecanismos moleculares que están relacionados con la presencia de hormonas que a su vez activan rutas de transducción de señales. Estas rutas pueden activar la expresión de genes de resistencia para que la planta disponga de proteínas de resistencia contra el patógeno. Son importantes factores de transcripción y traducción en este proceso que pueden estar regulados por la presencia del patógeno.

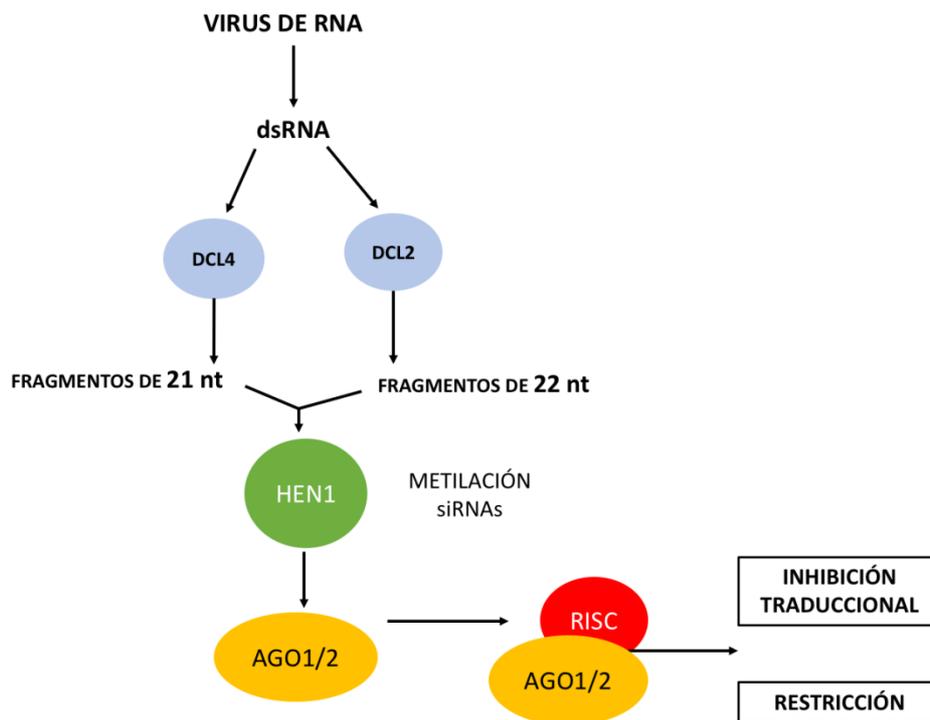


Fig. 10. Ruta del silenciamiento en plantas como respuesta a las infecciones virales (Csorba et al., 2015).

Uno de estos factores de traducción es el eIF4F, formado por eIF4E y eIF4G (Moury et al., 2014a, 2014b). Mutaciones en estos factores llevan a la resistencia contra el virus y existe evidencia genética de que los potyvirus tienen requerimientos específicos de estas dos isoformas, ya que interactúan con la VPg de TuMV (Estevan et al., 2014; Khan y Goss, 2012; Nicaise et al., 2007; Lellis et al. 2010). En teoría, si el virus requiere este factor de traducción para multiplicarse, en mutantes deficientes de algunas de las isoformas, se encontraría en un huésped hiposusceptible (fig. 11). Como explicaba anteriormente, en estos ejemplos de fondos genéticos de plantas resistentes, el tamaño efectivo del virus es muy pequeño y su capacidad para fijar los alelos que le permitirían adaptarse en esas circunstancias es menor que en un fondo menos resistente a la infección, por lo que es más probable que se fije cualquier mutación independientemente de si es o no la más apta en esas condiciones ambientales.

Factores de transcripción como las fosfatasas de unión al DNA (DBPs) son únicas en las plantas y se ha comprobado que tienen un papel importante en la resistencia contra algunos potyvirus (Carrasco et al., 2007 y 2014) como el virus de la Sharka (PPV) en *A. thaliana*. Además, este factor de transcripción regula el eIF(iso)4E. En los mutantes en los que disminuye la

concentración de DBP o es inexistente también lo hace el factor de traducción, lo que sugiere un mecanismo subyacente de regulación post-transcripcional.

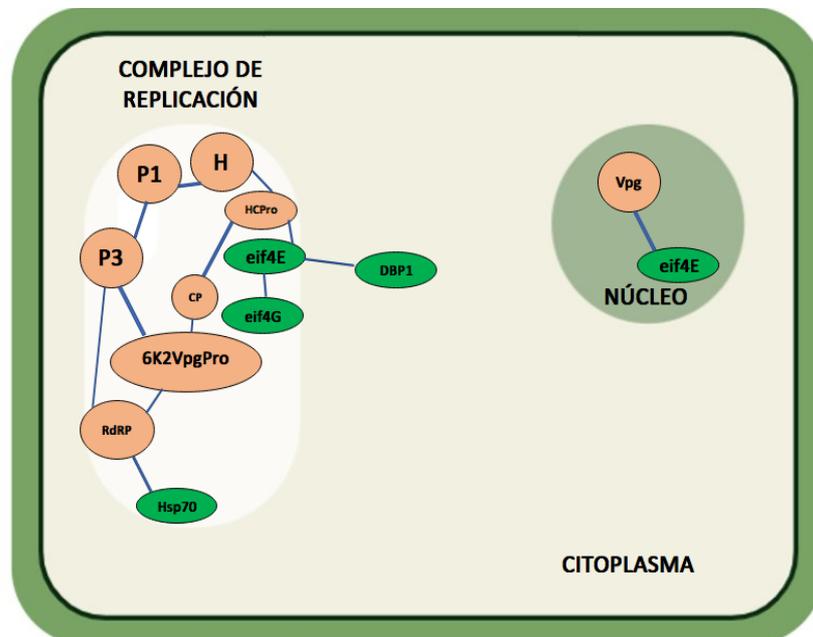


Fig. 11. Interactoma de la proteína viral VPg con diferentes factores de la célula vegetal y con otras proteínas del virus. DBP y eIF4G son factores de transcripción y traducción, respectivamente. Las proteínas de la planta figuran en verde.

El producto del gen *DNA-BINDING PROTEIN PHOSPHATASE 1 (DBP1)* en concreto es activado mediante fosforilación por la familia de las MAPK, que son quinasas fosforiladas secuencialmente cuyos módulos típicos tienen tres MAPKs, una MAPKKK, una MAPKK y una MAPK. Este factor, a su vez, cuando está activo regula negativamente otra MAPK, la MPK11 que se activa durante la respuesta inmune. Existen pequeños polipéptidos importantes para la función de DBP, llamados DIP (proteínas que interactúan con DBP), cuyos mutantes deficientes hacen que la planta sea hipersusceptible a potyvirus como el PPV o el TuMV (Castelló et al., 2010 y 2011).

Por otro lado, en el grupo de las proteínas que el virus necesita para multiplicarse están la familia de los reguladores de la proteína-quinasa dependiente de RNA (PKR), que se activa por fosforilación y a su vez activa factores de traducción tanto en mamíferos, como en plantas en respuesta al estrés. En concreto, el factor P58^{IPK} es un inhibidor o regulador negativo de la PKR que además interactúa con el dominio helicasa de potyvirus como el TEV o tobamovirus como el TMV *in vitro* e *in vivo* (García et al., 2007). La proteína tiene dominios de tipo J y TPR que tienen diferentes

funciones; en el caso de los dominios J, por un lado, el transporte y secreción de chaperonas (HSP70, HSP90), por otro la señalización por estrés y además otras interacciones proteína-proteína; y en el caso de los TPR, la unión e interacción con otras proteínas. En mamíferos, la PKR se activa como respuesta a la infección por virus para fosforilar el factor de traducción eIF-2 α , desencadenante de la muerte celular como respuesta inmune local. Si P58^{IPK} está activo inhibe la PKR y no hay muerte celular. P58^{IPK} se necesita en plantas para desarrollar los síntomas porque es un factor de virulencia (Bilgin et al., 2003). Disminuye significativamente el título viral en plantas silenciadas, por lo que parece ser importante que no haya muerte celular para desarrollar la infección sistémica (Komatsu et al., 2010).

Las chaperonas de la familia de las HSP70 y HSP90 también inhiben la PKR negativamente. Las HSP90 están muy conservadas en eucariotas y contribuyen a estabilizar o activar otras proteínas relacionadas con rutas de transducción de señales, movimiento y/o inmunidad (Verchot, 2012). En plantas y animales existe un grupo de proteínas, las NLR, que son sensoras de patógenos que contribuyen a la inmunidad activando respuestas de defensa (Kadota y Shirasu, 2012; Zhang et al., 2010). Para que la chaperona HSP90 actúe a este nivel se necesitan los cofactores HSP70 y HSP40 y además dos cofactores SGT1 (supresor del alelo G2 de *SKP1*) y RAR1 para que las NLRs sean funcionales (Fu et al., 2009; Ye et al., 2012).

Las HSP90 forman dímeros y tienen un dominio de unión a nucleótidos (NBD) en el extremo N-terminal que participa en la hidrólisis de ATP, un dominio medio de unión al sustrato y a el cofactor HSP70 y HSP40, y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal.

Las dos cochaperonas se coordinan para reclutar el sustrato para la HSP90 y este interacciona con el dominio medio (MD). La hidrólisis de ATP permite el cambio conformacional y la maduración del sustrato. En el caso de las proteínas NLR, el complejo RAR1-SGT1-HSP90 es necesario para el plegado y estabilización de estas, que es el estado maduro para realizar las funciones de inmunidad (Verchot, 2012) (fig. 12).

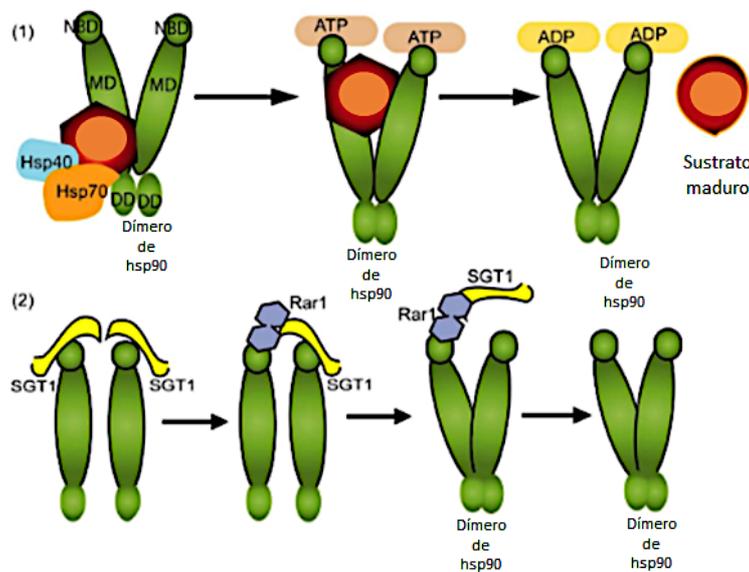


Fig. 12. Cambios conformacionales y de actividad de las chaperonas HSP90 (Verchot, 2012).

Mutaciones en los genes que codifican para las HSP90 pueden llevar a la pérdida de la función defensiva derivada de la acción de las NLRs en el PVX o TMV (Botër y Amigues, 2007). Dado que se trata de un complejo de proteínas que requiere cofactores y cochaperonas, y que gran parte del proceso permanece poco claro, algunos trabajos han explorado las diferentes funciones y tipos de regulación que puedan tener los diferentes componentes. En algunos casos SGT1 aparece como un regulador negativo de las NLRs (Botër et al., 2007). En otros su sobreexpresión lleva a una mayor acumulación del PVX (Verchot, 2012). En cuanto a HSP90, existen evidencias de su papel positivo en el virus del mosaico del bambú (BaMV) (Huang et al., 2012), en el virus del mosaico necrótico del trébol rojo (RCNMV) (Mine et al., 2012) y en el flock house virus (FHV) (Kampmueller y Miller, 2005) (fig. 13).

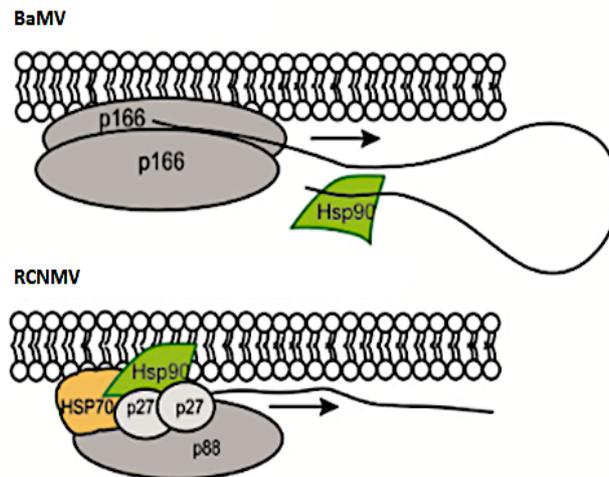


Fig. 13. Interacción de la chaperona HSP90 on el complejo de replicación del BaMV (Verchot, 2012).

4. Modelo experimental

Conocer qué mecanismos rigen los procesos de adaptación viral a huéspedes con diferentes niveles de respuesta a la infección y que puedan resultar en linajes generalistas o especializados en su huésped de partida, utilizando la evolución experimental como herramienta, son los objetivos de esta tesis. Para ello, he utilizado el patosistema virus-planta para estudiar los diferentes procesos evolutivos de interés.

4.1. Los potyvirus del grabado del tabaco (TEV) y del mosaico del nabo (TuMV)

El TEV es un virus ampliamente utilizado como parásito estricto en patosistemas que se usan como modelos de estudio en evolución experimental, por ejemplo, en experimentos de competición, estudios de la eficacia biológica viral y ha servido para comprender cuáles son y cómo funcionan los mecanismos evolutivos de los potyvirus en general (Carrasco et al., 2007; Agudelo-Romero et al., 2008; Elena et al., 2008).

En el caso del TuMV también encontramos que ha servido como modelo en evolución experimental en gran cantidad de trabajos de relevancia. Por ejemplo, en lo referente a sus mecanismos de adaptación (Oshima et al., 2002; Tan et al., 2005; Elena, 2017), como modelo del estudio de interacciones moleculares virus-huésped (Elena y Rodrigo, 2012) o para el estudio de la coevolución (Montes et al., 2010; Vijayan et al., 2017).

4.2. La planta como huésped experimental: *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), *Nicotiana tabacum* y *Capsicum annuum* (*Solanaceae*)

A. thaliana ha sido utilizada como modelo de huésped en patosistemas con nematodos (Sijmons et al., 1991), hongos (Edgar et al., 2006) y otros parásitos en general (Mauch-Mani y Slusarenko, 1993), además de ser también un modelo para estudiar las rutas implicadas en los mecanismos de inmunidad en plantas (Nishimura y Dangl, 2010). A todo ello se le suma la gran cantidad de mutantes disponibles (Estelle y Somerville, 1986). En lo que concierne a las rutas de resistencia en plantas, *A. thaliana* ha servido para desarrollar la hipótesis GFG (Flor, 1971), esencial para comprender cómo las plantas desarrollan mecanismos de resistencia contra patógenos que están codificados en genes de resistencia (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995). Algunos de estos genes han sido estudiados gracias a mutantes y sus productos génicos que forman parte de la inmunidad PAMP, estudios en los que este huésped también ha sido imprescindible (Alonso et al., 2003; Weigel and Nordborg, 2005). Cabe destacar la importancia de *A. thaliana* en los trabajos relacionados con las rutas del SA, JA y en la SAR, donde NPR1 es uno de los factores centrales y JA y SA han sido descritos como antagónicos (Glazebrook, 2005).

En lo que se refiere a tabaco (*N. tabacum*) y pimiento (*C. annuum*), ambos forman parte de la historia evolutiva natural del TEV. Por un lado, el tabaco es su huésped natural, por otro, el pimiento es una especie de su misma familia y que funciona como huésped alternativo, lo que los convierte en un excelente sistema para hacer estudios comparativos entre ambos huéspedes, más allá del estudio de los mecanismos evolutivos en uno u otro. Los trabajos con *N. tabacum* como modelo en patosistemas planta-parásito incluyen bacterias como *Xylella fastidiosa* (Andreote et al., 2006), virus (Lalić et al., 2011) y otros parásitos, en materias tan variadas como bioquímica y biología molecular (Dorokhov et al., 1999) o biología evolutiva (Lalić et al., 2011); y para *C. annuum* encontramos trabajos interesantes en los que ha sido usado para estudiar la especialización (Agudelo-Romero et al., 2008), interacciones planta-patógeno (Takács et al., 2014), mecanismos de resistencia contra hongos como *Phytophthora infestans* (Oelke et al., 2003), análisis del transcriptoma de algunas familias como los geminivirus (Góngora-Castillo et al., 2012) y trabajos con TEV con más de un huésped de referencia para estudiar el efecto de las mutaciones en la eficacia biológica (Lalić et al., 2011).

OBJETIVOS

1. Probar la hipótesis de disminución similar del tamaño de la población en la tasa de adaptación de un virus de RNA vegetal que infecta huéspedes multicelulares. Para ello, realizar un experimento de evolución en tabacos y pimientos y tres concentraciones distintas de inóculo, creando cinco linajes por huésped y tamaño de inóculo hasta un total de 15 pases. Estudio de los rasgos fenotípicos carga e infectividad y cálculo de las tasas de evolución de cada linaje, para cada inóculo y huésped.
2. La hipótesis de la selección dura o blanda predice que las poblaciones virales que han evolucionado en huéspedes hiposusceptibles (ambiente restrictivo para el virus) tengan una eficacia menor que en el huésped silvestre, no así las hipersusceptibles (ambiente permisivo), donde previsiblemente será mayor, dejando en un lugar intermedio a ambos aquellos más parecidos al fenotipo silvestre. Para probar esta hipótesis estudiaremos carga viral, infectividad y AUDPS.
3. Selección de los genotipos de *A. thaliana* en tres categorías: significativamente más susceptibles que el genotipo silvestre, tan susceptibles como el genotipo silvestre y significativamente menos susceptibles que éste. Se seleccionarán tres ejemplos de cada categoría para los experimentos de evolución de TuMV. Esta selección se ha realizado en base a los rasgos fenotípicos estudiados pero también se han tenido en cuenta las rutas de defensa de la planta a la que pertenecen las mutaciones y el interés científico que estos pudiesen tener para el proyecto de investigación. Realización del experimento de evolución de las poblaciones virales en los genotipos mutantes seleccionados, creando cinco linajes de virus por cada genotipo de planta huésped hasta un total de 12 pases.
4. Para evaluar en qué medida la adaptación fue específica a cada genotipo o, por el contrario, las poblaciones virales evolucionadas fueron generalistas, realizamos un experimento de infección cruzada donde cada población evolucionada en su genotipo mutante de partida será inoculada en cada uno de los nueve genotipos problema de nuevo una única vez (matriz de infección). En este caso se medirán infectividad y severidad de síntomas y se calculará también el AUDPS

5. para cada población viral a partir de los valores de infectividad. Bajo la hipótesis de compensaciones selectivas, esperamos que los rasgos relacionados con la eficacia biológica serán mayores en el huésped en el que evolucionaron que en los de la matriz, lo que sugiere que las mutaciones responsables de la adaptación a cada ecotipo ejercerán un efecto pleiotrópico negativo en los huéspedes de la matriz.
6. Secuenciación de los genomas consenso para cada población de linajes ancestral y también evolucionados a pase 12. Una observación muy común en los experimentos de evolución con virus de RNA es que los linajes evolucionaron en un huésped/entorno común fijan un subconjunto similar de mutaciones. Estas convergencias son consecuencia del alto grado de compactación de los genomas virales, que limitan el número posible de soluciones adaptativas a un problema evolutivo particular. Para determinar en qué medida esta observación se aplica a las poblaciones virales que evolucionan y se adaptan dentro de individuos de una población huésped que difieren en su susceptibilidad a la infección, caracterizaremos los genomas de consenso de todos los linajes evolucionados. De acuerdo con experimentos anteriores con el patosistema potyvirusA. *thaliana*, esperamos que se fije un número limitado de mutaciones por genoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Descripción de los huéspedes

1.1. *N. tabacum* y *C. annuum*

En un primer experimento hemos usado tabaco (*N. tabacum* L. cv Xanthi NN, fig. 14A) y pimiento (*C. annuum* L. cv Marconi, fig. 14B), ambos miembros de la familia *Solanaceae* y huéspedes naturales del TEV. En ambos huéspedes, TEV produce síntomas sistémicos de diferente intensidad. Para todos los pasos experimentales, las plantas se mantuvieron en un invernadero BSL2 a 25 °C y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad.

La infectividad de cada muestra viral a lo largo de los experimentos de evolución se evaluó como la frecuencia de plantas que muestran síntomas de infección 14 días después de la inoculación (dpi). Se utilizó el estimador de LaPlace para el parámetro Binomial $p = (x + 1)/(n + 2)$ en lugar del clásico estimador de máxima verosimilitud porque proporciona estimaciones más robustas para tamaños de muestra n pequeños (Agresti, 1998).



Fig. 14. (A) Planta sana de *N. tabacum* cv Xhanti y (B) Planta sana de *C. annuum* cv Marconi.

1.2. *A. thaliana*

En un segundo conjunto de experimentos, disponemos de la siguiente colección de genotipos mutantes de *A. thaliana* (L.) Heynh para genes que codifican proteínas que intervienen en diferentes rutas de defensa de la planta. En la Tabla 1 se indica la ruta a la que pertenecen, el tipo de mutación y el efecto esperado en comparación con el genotipo silvestre

Col-0. Realizaremos un bioensayo previo (selección de genotipos) para hacer comprobaciones de virulencia, infectividad y carga viral de TuMV en cada uno de los genotipos. Algunos de los genotipos los escogimos por tener mutaciones que afectan a varias rutas de defensa, y otros por tener genes que mostraron ejercer efectos positivos o negativos principalmente a la infección de potyvirus, pero también al virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

Tabla 1. Lista de genotipos mutantes de *A. thaliana* Col-0.

Mutante	Gen	Ruta	Tipo de mutación	Efecto esperado en TuMV
<i>sid2-1</i>	<i>At1g74710</i>	SA	Mutación puntual	+
<i>pad4-1</i>	<i>At3g52430</i>	SA	Mutación puntual	+
<i>eds5-1</i>	<i>At4g39030</i>	SA	Mutación puntual	+
<i>npr1-1</i>	<i>At1g64280</i>	SA	Mutación puntual	+
<i>cpr5-2</i>	<i>At5g64930</i>	SA	Mutación puntual	-
<i>coi1-40</i>	<i>At2g39940</i>	JA	Mutación puntual	+
<i>jin1</i>	<i>At1g32640</i>	JA	Mutación puntual	+
<i>jin4</i>	<i>At2g46370</i>	JA	Mutación puntual	+
<i>etr1-1</i>	<i>At1g66340</i>	ET	Mutación puntual	-
<i>etr1-3</i>	<i>At1g66340</i>	ET	Mutación puntual	-
<i>ein2-1</i>	<i>At5g03280</i>	ET	Mutación puntual	-
<i>eds4-1</i>	<i>At3g52430</i>	ISR (ET)	Mutación puntual	-
<i>eds8-1</i>	-	ISR (JA)	Mutación puntual	-
<i>dcl2</i>	<i>At3g03300</i>	Silenciamiento	Inserción T-DNA	+
<i>dcl4</i>	<i>At5g20320</i>	Silenciamiento	Inserción T-DNA	+
<i>dcl2 dcl4</i>		Silenciamiento	Inserción T-DNA	+
<i>hsp90.1</i>	<i>At5g52640</i>	Chaperona hsp90	Inserción T-DNA	-
<i>hsp90.2</i>	<i>At5g56030</i>	Chaperona hsp90	Inserción T-DNA	-
<i>hsp90.3</i>	<i>At5g56010</i>	Chaperona hsp90	Inserción T-DNA	-
<i>hsp90.4</i>	<i>At5g56000</i>	Chaperona hsp90	Inserción T-DNA	-
<i>hsp90.6</i>	<i>At3g07770</i>	Chaperona hsp90	Inserción T-DNA	-
<i>i4g1</i>	<i>At3g60240</i>	Traducción	Inserción T-DNA	-
<i>i4g2</i>	<i>At5g57870</i>	Traducción	Inserción T-DNA	-
<i>i4g1 i4g2</i>		Traducción		-
<i>dbp2</i>	<i>At2g25620</i>	Transcripción	Inserción T-DNA	+
<i>dip2</i>	<i>At5g03210</i>	Transcripción	Inserción T-DNA	+
<i>P58^{PK}</i>	<i>At5g03160</i>	Inhibidor de PKR	Inserción T-DNA	+

Los 13 primeros genotipos contienen mutaciones en las rutas de defensa del SA, el JA o el ET. Todos ellos han mostrado diferencias en lo referente a

la susceptibilidad comparadas con el genotipo silvestre Col-0 que estaban infectados con CaMV (Love et al, 2007). El mutante *cpr5-2*, en el cual la ruta de defensa del SA está activada constitutivamente, ha mostrado ser más resistente a la infección (hiposusceptible) que las plantas silvestres infectadas con CaMV (Love et al, 2007). Los mutantes *etr1-1*, *etr1-3*, *ein2-1*, *eds4-1*, y *eds8-1* también han mostrado ser hiposusceptibles a la infección por este mismo virus (Rogers et al., 1997).



Fig. 15. Plantas control de *A. thaliana* (de izquierda a derecha arriba: *npr1-1*, *cpr5-2* y *jin1*; centro: *eds 8-1*, *dcl2 dcl4* y *hsp 90.1*; abajo: *i4g2*, *dbp2* y *p58^{ipk}*).

Además, los mutantes *dcl2*, *dcl4* y el mutante doble *dcl2 dcl4*, cuyos genes se corresponden con endonucleasas involucradas en la ruta silenciamiento, contribuyendo a la producción de siRNAs virales a partir de intermediarios dsRNA de la replicación del virus, siendo DCL4 el enzima principal y DCL2 compensando la actividad de DCL4 cuando ésta última es inhibida.

Todos los productos de los genes mutantes de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP) se encuentran codificados en el cromosoma V y tienen una localización nucleocitoplasmática, excepto HSP90.6 que se localiza en la mitocondria (Krishna y Gloor, 2001).

Los mutantes *i4g1*, *i4g2* y el doble mutante *i4g1 i4g2* codifican, respectivamente, para los factores de traducción eIF4E y eIF(iso)4E e interactúan directamente con la proteína viral VPg. (Estevan et al., 2014; Moury et al., 2014).

Los genes *dip2* y *dbp* codifican para la fosfatasa 1 de unión al DNA y para la proteína 2 de interacción con el DNA respectivamente, dos factores de transcripción cuya supresión supone una mayor susceptibilidad de *A. thaliana* a la infección por potyvirus (Castelló et al., 2010, 2011). Mutantes para *dip2* muestran un incremento del factor eIF4G de inicio de la traducción.

Por último, la proteína P58^{IPK} es un inhibidor de la PKR, que se ha visto tiene un papel antiviral esencial en células de mamífero (García et al., 2007). Los genotipos nulos de esta proteína han demostrado ser hipersusceptibles a la infección de PVX (Bilgin et al., 2003).

En la fig. 15 se muestran plantas sanas de los genotipos que finalmente se seleccionaron para el experimento de evolución.

2. Evolución experimental

2.1. TEV en *N. tabacum*, *C. annuum* y *Chenopodium quinoa*

En este experimento se testarán los efectos del tamaño de inóculo de TEV en diferentes huéspedes, y para ello se han creado cinco linajes por huésped y tres tamaños de inóculo por cada linaje y huésped de evolución.

El punto de partida para inocular es el plásmido pMTEV que contiene el genoma de TEV de un aislado de tabaco (Bedoya y Daròs, 2010). Se generó una reserva de tejido infectado de TEV a partir de tejido infectado ya previamente en *Nicotiana benthamiana*. Se inocularon un conjunto de 12

plantas de tabaco, añadiendo a 100 mg de tejido infectado 1 ml de tampón fosfato (50 mM, pH = 7, 3% PEG2000). Posteriormente, se centrifuga a 9000 rpm durante dos minutos y se pasa a otro tubo el sobrenadante. Para inocular la hoja, se añade 1 ml de tampón fosfato a 100 mg de Carborundum y de esta solución se añaden 100 μ l a cada tubo con el tejido infectado. Inoculo 3 hojas de cada planta de tabaco, cada una con 10 μ l de este último tubo. El control será inoculado con el tubo que sólo tiene tampón y Carborundum de la misma forma. Una vez transcurridos 7 dpi, se mezclan todas las plantas para triturarlas y congelarlas, separándolas en tubos. También se guardan los controles como control de tejido sano para realizar la curva patrón de las cuantificaciones por RT-qPCR.

El siguiente paso fue reservar cinco muestras para titulación en el huésped de lesiones locales *Chenopodium quinoa* Willd y otras cinco para RT-qPCR, diluyendo cada una de ellas para inocular quenopodios (y realizar la titulación) y cuantificar diluyendo las muestras de la misma manera que para inocular los quenopodios, todo ello realizado según lo especificado en la Tabla 2 y la Figura 16.

Tabla 2. Diluciones para inoculación y cuantificación de TEV.				
DILUCIÓN	V _{TOTAL}	V _{EXTRACTO}	V _{H2O}	DILUCIÓN DE PARTIDA
SD	250 mg		250 μ l	
1 : 2	100 μ l	50	50	SD
1 : 10	100 μ l	10	90	SD
1: 20	100 μ l	10	90	1 : 2
1 : 50	100 μ l	5	95	1 : 10
1 : 100	100 μ l	10	90	1 : 10
1 : 200	100 μ l	10	90	1 : 20

El volumen sin diluir (SD) se obtiene de 250 mg de tejido en 250 μ l de agua.

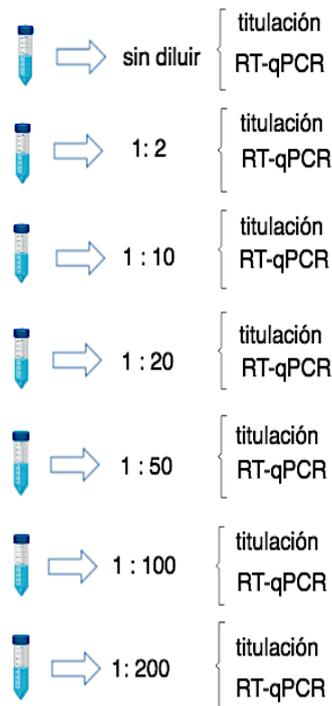


Fig. 16. Diluciones utilizadas de TEV para estimar el número de unidades infecciosas en *C. quinoa* y el número de genomas mediante RT-qPCR.

Para el experimento de evolución en tabacos y pimientos, utilicé tejido infectado de la reserva con tamaños diferentes de inóculo de rango amplio y el objetivo de estudiar el efecto del cuello de botella en la eficacia media y la varianza de la población. El tamaño de inóculo dependerá de la dilución. El protocolo de inoculación es el siguiente: se pesaron 200 y 100 mg de tejido infectado y se añadieron a cada uno de ellos 200 μ l y 1 ml de tampón fosfato, respectivamente. Centrifugo 2 min a 9000 rpm y se retira el sobrenadante. Se preparó una dilución 1:10 a partir de la 1 \times (100 mg/ml) cogiendo 100 μ l de esta y añadiendo 900 μ l. Tanto para la 1 \times como para la 0.1 \times inocularon 10 μ l en una hoja. Para la 10 \times 20 μ l en total en dos hojas diferentes (10 + 10). Primero se inocularon cinco tabacos para cada dilución y también cinco para la 10 \times de pimientos, ya que estas combinaciones se infectan fácilmente. En el caso de la 1 \times y 0.1 \times de pimientos se inocularon 10 y 20 plantas, respectivamente, para estar segura de que al menos hay una planta infectada. El proceso lo esquematizo en la fig. 17.

Se definieron tres regímenes evolutivos que diferían en el tamaño del inóculo; es decir, en la disponibilidad de posibles mutaciones beneficiosas

presentes en el inóculo, N_eU_b . El primer tratamiento correspondió al inóculo resultante de la adición de 500 μl de tampón de inoculación (fosfato potásico 50 mM, pH 7, PEG2000 3%, Carborundum 10%) a 500 mg de tejido infectado homogeneizado con N_2 líquido en un mortero; de ahora en adelante me referiré a este tratamiento como 10N. El segundo tratamiento consistió en añadir 900 μl de tampón de inoculación a 100 mg de tejido homogeneizado, y lo denominaré tratamiento N. Para el tercer tratamiento, hicimos una dilución de 1:10 del tamaño del inóculo N añadiendo 900 μl de tampón de inoculación a 100 μl de este extracto, y me referiré a este tratamiento como inóculo N/10. 10 μl fueron inoculados en cada planta, excepto en el caso del tamaño del inóculo 10N, en el que se inocularon dos hojas con 10 μl cada una.

Se crearon cinco linajes evolutivos independientes para cada uno de estos tres tratamientos y especies huéspedes y realizados 15 pases seriados de evolución. A los 14 dpi, la parte aérea de cada planta se recolectó, homogeneizó, diluyó repitiendo el paso mencionado anteriormente y se utilizó para inocular el siguiente lote de plantas. Este protocolo se repitió un total de 15 veces.

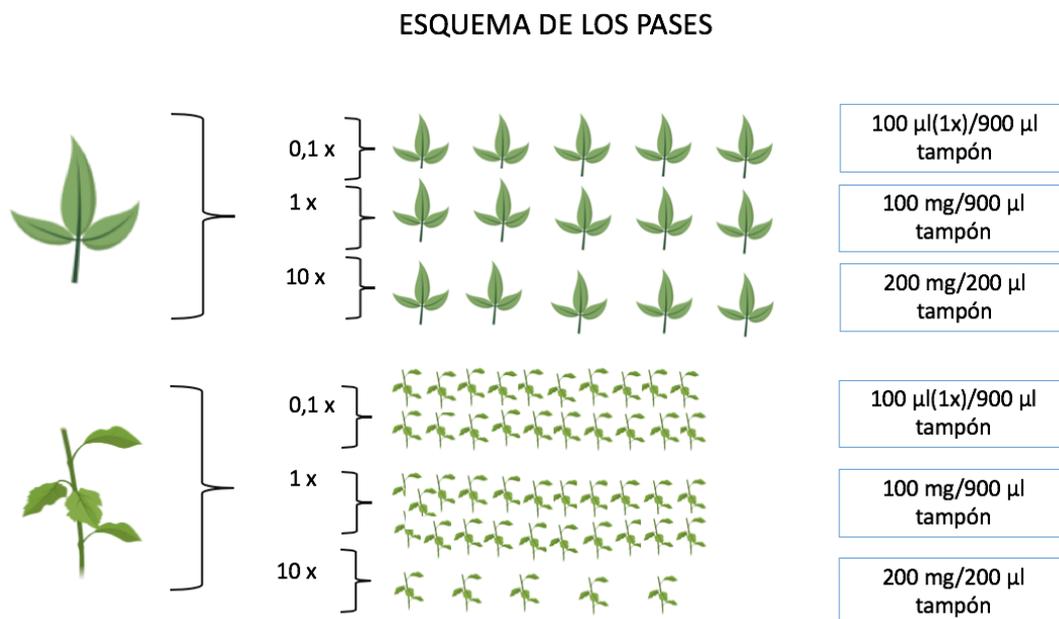


Fig. 17. Esquema de los 15 pases realizados. Cada pase se realiza preparando tejido de una planta infectada del pase anterior. En el caso de la dilución 10 \times se inoculan 20 μl , 10+10, en 2 hojas diferentes. En el resto 10 en una sola hoja, para obtener la concentración deseada.

2.2. TuMV en *A. thaliana*

El experimento de evolución consistió en 12 pases seriados. Entre la inoculación y la recogida de datos de infectividad dejamos pasar 12 dpi, y cada uno de los 12 días se recogieron datos de número de plantas infectadas. Para la infectividad y la progresión de síntomas observamos un problema ambiental en los fitotrones que afecta a estas variables prácticamente en todos los genotipos, entre los pases 7 y 10. Disponemos de una relación de estos problemas y en esas fechas, teniendo en cuenta que había plantas ya inoculadas, pero también la siguiente colección que íbamos a inocular:

22/08/17 Hay una fuga de refrigerante y el fitotrón se pone durante varias horas a casi 30 °C.

28/09/17 Se calienta por la noche y cuando llega a 34 °C, salta la alarma.

03/11/17 Se para completamente.

Seguramente estos problemas quedan reflejados en los gráficos de infectividad y el área bajo la curva de progresión de síntomas (*AUDPS*) calculada con la ecuación 3, como una bajada entre esos pases de ambos rasgos fenotípicos del virus, a excepción de algún genotipo al que parecen no afectar estos cambios de temperatura.

Se generaron cinco linajes independientes por cada uno de los nueve genotipos seleccionados y se realizan 12 pases del virus, de modo que hay 45 linajes o poblaciones de virus que evolucionarán independientemente. Las muestras de la población resultante de cada pase serán almacenadas, siendo sus características fenotípicas medidas, por un lado, la infectividad y las *AUDPS* en todos los pases (0-12) y la carga o título viral medida mediante RT-qPCR a pase 0 (población ancestral), pase intermedio (5) y el último (pase 12).

$$AUDPS = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} (y_{i+1} + y_i)(t_{i+1} - t_i) + \frac{(y_n + y_1)(t_n - t_1)}{2(n-1)}$$

Ecuación 3. Fórmula del *AUDPS* (Simko y Piepho, 2012), donde t es el tiempo en días, y es la infectividad para cada linaje y n es el número de medidas para cada linaje de evolución.

El procedimiento de la primera inoculación es similar al del experimento 1 con pequeñas variaciones. Por un lado, añadimos 1 ml de tampón fosfato a 100 g de tejido de *N. benthamiana* previamente infectado con TuMV y

centrifugamos 2 min a 9000 rpm. Retiramos el sobrenadante y lo pasamos a otro tubo. Por otro añadimos 1 ml de tampón al tubo del Carborundum y una vez en el invernadero, añadimos 100 ml de éste al tubo preparado en primer lugar. Todo ello para cada linaje de cada genotipo. En los pases sucesivos esto lo haremos con las plantas infectadas de cada genotipo (fig. 18).

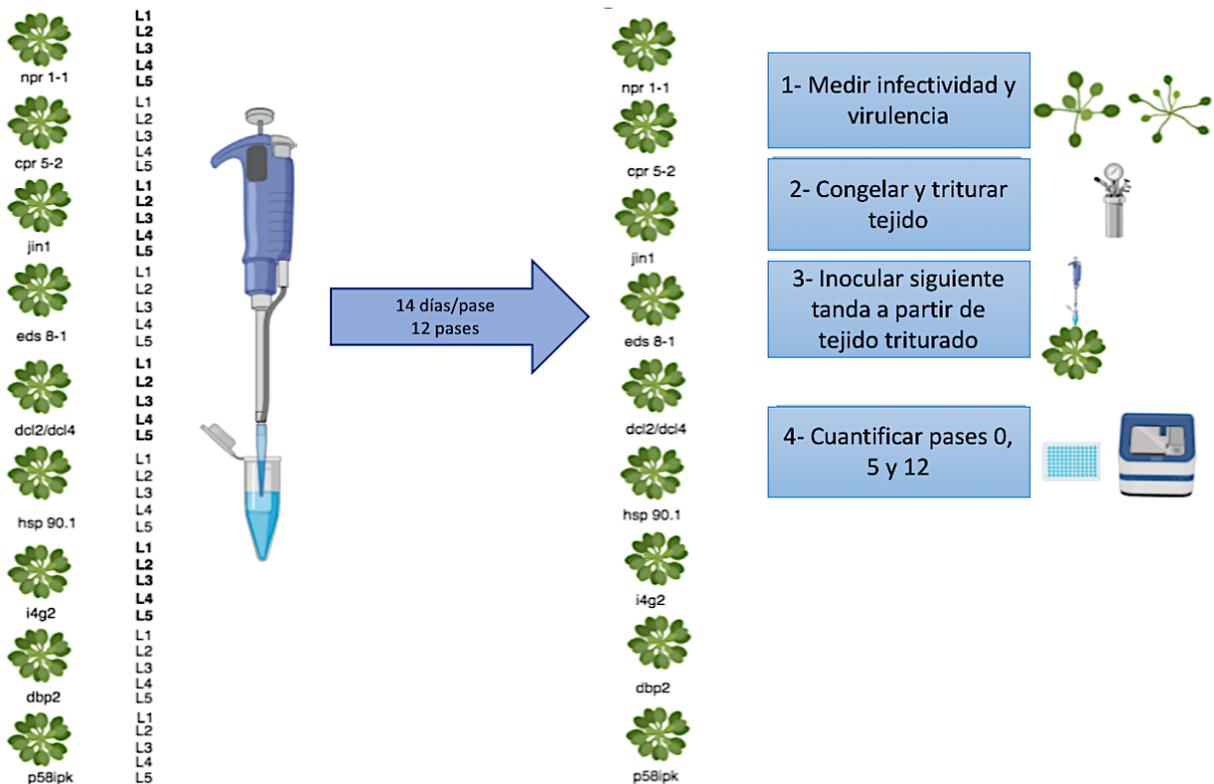


Fig. 18. Esquema de los pases del experimento de evolución en huéspedes de distinta susceptibilidad.

3. Extracción de RNA

La extracción total de RNA a partir de 100 mg de tejido molido por planta se realizó usando un Mini Kit de aislamiento de plantas (Agilent) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de RNA total en los extractos se determinó espectrofotométricamente usando un NanoDrop ND100 (Thermo Scientific) y se ajustó a 40 - 55 ng/ μ l para cada muestra.

En el caso de *A. thaliana*, inoculamos colecciones de 20 plantas por cada genotipo cuando las hojas de la roseta central tengan más de 1 mm (Boyes et al., 2001). Los síntomas (hojas curvadas, venación blanca, amarilleo) serán monitorizados diariamente en una escala de 0-4 (severidad de síntomas) y también el porcentaje de plantas infectadas cada día

(infectividad), además del peso a 15 dpi (si en ese momento estuviesen todas las plantas infectadas) o 16 dpi (independientemente del número de infectadas, ya que es el día tope de finalización del experimento) para calcular la virulencia como reducción del peso fresco de la planta respecto al control silvestre (FW) con la fórmula:

$$V = 1 - FW / FW_{control} \text{ (Bedhomme et al., 2012)}$$

La infectividad de cada muestra viral a lo largo de los experimentos de evolución se evaluó como la frecuencia de las plantas que muestran síntomas de infección entre 9 y 14 dpi. Se usó el estimador de Laplace para el parámetro Binomial.

4. PCR cuantitativa (RT-qPCR)

4.1. Transcripción del plásmido pMTEV

En primer lugar, se realiza una digestión del plásmido pMTEV con el enzima *Bgl*II para su linearización. Los volúmenes que he utilizado de cada reactivo son 2 μ l del tampón H (10 \times), 10 μ l del plásmido, 7 μ l de H₂O-DEPC y una unidad del enzima (el volumen total es de 20 μ l). El tiempo y la temperatura de digestión son los especificados para el enzima: 2 h a 37 $^{\circ}$ C. Una vez terminada la digestión, añado 200 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico, centrifugo 5 min a velocidad máxima y recupero la fase superior, añadí 1 μ l de glucógeno 1:10 y 2 volúmenes de etanol 96%. Este tubo lo guardo 2 h a -20 $^{\circ}$ C. Terminado el tiempo doy un golpe de calor a 65 $^{\circ}$ C para desnaturalizar el enzima. El siguiente paso es centrifugar 15 min a 4 grados y eliminar el sobrenadante, para después hidratar con 700 μ l de etanol 70%. Centrifugo 5 min a 4 $^{\circ}$ C. Añado acetato sódico 3 M y EDTA 0.5 M y 2 volúmenes de etanol 100%. Para transcribir el plásmido sigo el protocolo del *kit* AMBION (MegaScript T7 transcription kit, Thermo Fisher) añadiendo 10 μ L 2 \times NTPs, 2 μ l tampón 10 \times , 2 μ l de la mezcla de enzimas, 5 μ l plásmido digerido y 1 μ L agua-DEPC. El tiempo y temperatura de transcripción son 2 h a 37 $^{\circ}$ C. Una vez terminado el tiempo de transcripción, añado 1 μ l de DNasa turbo durante 15 min. Para precipitar el transcrito añado solución de LiCl+DEPC (0.5:1) y dejo la mezcla 1 h a -20 $^{\circ}$ C y centrifugo 15 min a 4 $^{\circ}$ C para eliminar la fase acuosa. Añado al precipitado 700 μ l de etanol 70% y centrifugo 5 min a 4 $^{\circ}$ C. El último paso es eliminar el sobrenadante y secar al aire.

4.2. Construcción de patrones (común a ambos experimentos)

La masa molecular relativa del genoma del virus (ya sea la secuencia completa o sólo una parte de ella, según protocolo) es el punto de partida para calcular los puntos de la curva patrón para realizar la cuantificación del título viral por RT-qPCR. Partiendo de una concentración determinada de virus, la multiplicaremos por el volumen total para obtener su peso en gramos. Esta cantidad se divide por la masa molecular del virus para obtener los moles y después, multiplicando por el número de Avogadro obtener el número de moléculas. De ser el volumen distinto a 1 μl , dividiremos esta cantidad de moléculas por él para saber cuántas hay en 1 μl . Una vez calculadas las moléculas en 1 μl , y dependiendo del bioensayo, deberemos diluir de forma seriada tantas veces como sea necesario (y usar el factor de dilución adecuado según el experimento) hasta obtener el primer punto de la curva (se recomiendan al menos 7 puntos). Seguiré diluyendo al menos seis veces más, y mezclo cada uno de esos puntos con el mismo volumen de extracto de planta sana a una concentración de 100 ng/ μl .

4.3. Transcripción del plásmido pUC19 para TuMV

Hemos usado el plásmido pUC19 linearizado con *SmaI* (fig. 19), que contiene clonado el promotor de la RNA polimerasa SP6, el cistron que codifica para la proteína CP y el 3' UTR del TuMV; aislado YC5 variante de secuencia AF530055.2.

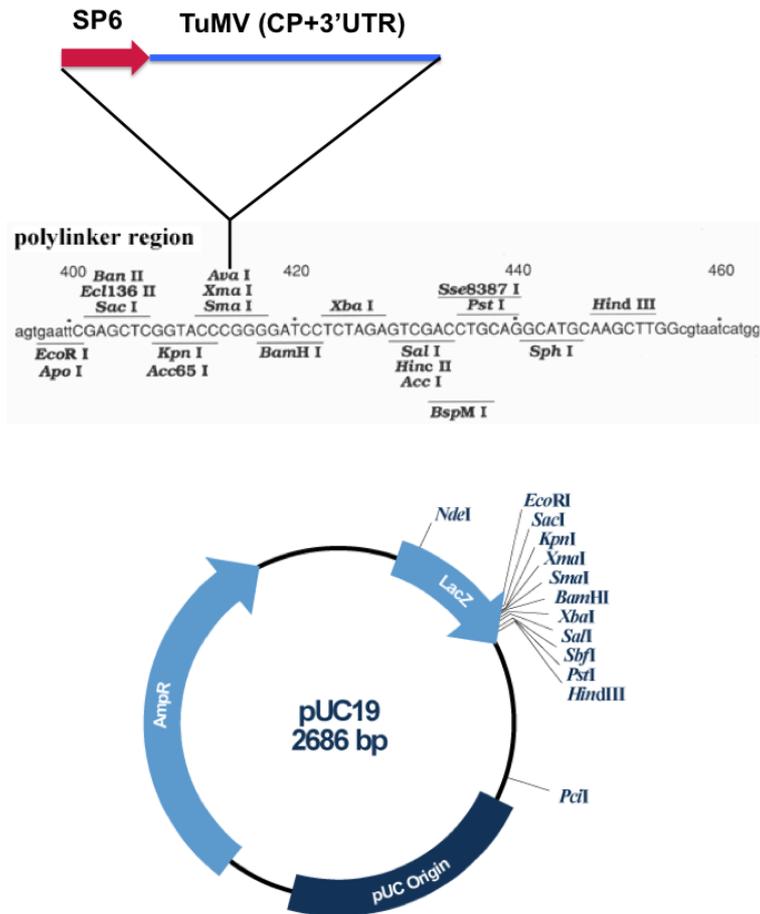


Fig. 19. Plásmido pUC19 que contiene el extremo 3' del genoma de TuMV (CP + 3' UTR) para construcción de patrones.

A continuación, se describe la secuencia clonada en el plásmido que permite obtener un RNA transcrito de un fragmento de TuMV, que sirvió como molde para la RT-qPCR. Para realizar la transcripción se empleó la RNA polimerasa SP6 y el plásmido se linearizará con la enzima *Bam*HI. El producto de RNA de la reacción además de contener una G extra en su extremo 5' incorporado por la SP6, tendrá añadido en el 3' la secuencia GGGG, como resultado del sitio de digestión del plásmido. Por lo tanto, el tamaño del RNA transcrito será de 1081 nucleótidos, a tener en cuenta para poder calcular su peso molecular.

GATTTAGGTGACACTATAGGCAGGTGAGACGCCTGATGCAGTTTGTACAGATGAGCAGAAGCAGGCGGAA
 AAGGAGAAGAAGGAGAGAGAGAAGGCCAGAAAAGGAACGAGAGAGGCAGAAAACAGTTGGCGCTCAAGAAAG
 GCAAGGATGTTGCGCAAGAAGAGGGGAAACGCGACAGGGAAGTGAACGCCGGAACCTCTGGAACCTTCAG
 TGTACCCAGACTTAAGAGCCTAACCAAGCAAAATGCGCGTGCCAAGATACGAGCAGAGAGTGGCTTTAAAC
 CTTGATCATCTAATCTTATACACGCCGGAGCAGACGGATCTATCCAACACACGGTCAACGCCAAAGCAGT
 TTGACACATGGTTTGAAGGTGTAATGGCCGATTACGAACTGACGGAGGACAAAATGCAAATTTCTCAA
 TGGTTTAATGGTCTGGTGCATTGAGAACGGAACCTCCCCGAACATAAACGGAATGTGGGTGATGATGGAC
 GCGATGATCAGGTGGAATTTCCGATCAAACCGCTCATTTGACCACGCCAAACCCACATTTAGGCAAATAA
 TGGCCCATTTTCAGTGACGTAGCTGAAGCGTACATTGAAAAGCGTAACCAAGACCGACCATAACATGCCACG

ATATGGTCTTCAGCGCAATTTAACCGACATGAGCCTAGCTCGATACGCGTTTGACTTCTATGAAATGACT
 TCTAGAACTCCAATACGTGCGAGAGAAGCACACATCCAGATGAAAGCAGCAGCACTGCGTGGCGCAAATA
 ACAATTTGTTTCGGCTTGGATGGAAACGTTGGTGCACGGTAGAGAACACGGAGAGGCATACGACCGAGGA
 CGTTAATCGGAACATGCATAACTTACTTGGCGTTAAGGGGTTA **TGA**AGTTGTATGTTGGTAGACTATAAG
TATTTAAGTTTACTCGTTAGTATTCTCGCTTATGGGAAATATGTAAGTTTGTAAAGCAGCCAGTGTGAC
TTTGTGATGTGTGTTGTTGTTACTTTCTATATTTTCGCCGAACATTTTATTGGTGTTAGCGCATGTGGTG
 AGGATCATCCTCGATTGCCTTAACATTTGATATGATGCAAGGGAC **GGG**

Subrayado en rosa se indica la secuencia del promotor de SP6, en verde el codon de parada de la traducción de la poliproteína de TuMV y en azul el 3' UTR. En rojo se indica la secuencia añadida por el sitio de corte del plásmido.

4.4. RT-qPCR

También hemos medido la carga o título viral mediante RT-qPCR. Para realizarla, primero realizamos una extracción del RNA total de la parte aérea de la planta (sin la hoja inoculada), introduciéndola en N₂ líquido y triturándola en un molino Retsch MM400. Pesamos 60-80 mg de tejido de cada muestra y seguimos el siguiente protocolo de extracción indicado por el fabricante, con algunas modificaciones para nuestro proyecto. Para 60-80 mg utilizamos 700 µl de solución opaca y 7 µl de β-mercaptoetanol por muestra. En el paso cinco en vez de un lavado 30 segundos hacemos dos y en los pasos cinco y seis utilizamos 450 µl de la solución de lavado en vez de 500 µl para obtener muestras más concentradas. El paso siete lo fijamos a 30-35 µl de agua DEPC.

Para el TEV, cada uno de estos extractos de RNA normalizados se utilizó para cuantificar la concentración de por RT-qPCR utilizando cebadores y los métodos descritos previamente (Frank, 1993). Las amplificaciones se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real OneStep Plus (Applied Biosystems) según el siguiente perfil: 5 min a 42 °C, 10 s a 95 °C, y 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 34 s a 60 °C. El estadio de fusión será 15 s a 95°C, 1 min 60 °C y 15 s a 95°C. He realizado 3 réplicas por reacción para cada muestra y los resultados de la cuantificación se examinaron adicionalmente utilizando StepOne, Software v.2.2.2 (Applied Biosystems). Las medidas resultantes tienen unidades de genomas de TEV por ng de RNA total.

Para TuMV, sobre la base de la secuencia del aislado YC5, variante AF530055.2, se diseñaron estos cebadores para RT-qPCR que amplifican en la secuencia del cistron *CP*. Se indica en subrayado y marcado en verde el codón parada y en azul la secuencia 3' UTR viral. Son una modificación de los cebadores empleados en las cuantificaciones realizadas en el trabajo de Martínez et al. (2011).

CP+3'UTR, 1.076 pb

GCAGGTGAGACGCCTGATGCAGGTTTGACAGATGAGCAGAAGCAGGCGGAAAAGGAGAAGAAGGAGAGAGA
 GAAGGCAGAAAAGGAACGAGAGAGGCAAAAACAGTTGGCGCTCAAGAAAGGCAAGGATGTTGCGCAAGAAG
 AGGGGAAACGCGACAGGGAAGTGAACGCCGGAACCTCTGGAACCTTCAGTGTACCCAGACTTAAGAGCCTA
 ACAAGCAAAATGCGCGTGCCAAGATACGAGCAGAGAGTGGCTTTAAACCTTGATCATCTAATCCTATACAC
 GCCGGAGCAGACGGATCTATCCAACACACGGTCAACGCGAAAAGCAGTTTGACACATGGTTTGAAGGTGTAA
 TGGCCGATTACGAACTGACGGAGGACAAAATGCAAAATTATTCTCAATGGTTTAAATGGTCTGGTGCATTGAG
 AACGGAACCTCCCCGAACATAAACGGAATGTGGGTGATGATGGACGGCGATGATCAGGTGGAATTCCCGAT
 CAAACCGCTCATTGACCACGCCAAACCCACATTTAGGCAAAATAATGGCCATTTTCAGTGACGTAGCTGAAG
 CGTACATTGAAAAGCGTAACCAAGACCGACCATAACATGCCACGATATGGTCTTCAGCGCAATTTAACCGAC
 ATGAGCCTAGCTCGATACGCGTTTGACTTCTATGAAATGACTTCTAGAATC**CAATACGTGCGAGAGAAGC**
ACACATCCAGATGAAAGCAGCAGCACTGCGTGGCGCAAATAACAATTTGTTTCGGCTTGGATGGAAACGTTG
 GTGCAACGGTAGAGAACACGGAGAGGCATACGACCGAGGACGTTAATCGGAACATGCATAA**CTTACTTGGC**
GTTAAGGGGTTA**TGA**AGTTGTATGTTGGTAGACTATAAGTATTTAAGTTTACTCGTTAGTATTCTCGCTTA
 TGGGAAATATGTAAGTTTGTAAAGCAGCCAGTGTGACTTTGTGATGTGTGTTGTTTACTTTCTATATT
 TTCGCCGAACATTTTATTGGTGTAGCGCATGTGGTGAGGATCATCCTCGATTGCCTTAACATTTGATATG
 ATGCAAGGGAC

F117 (directo): 5' -CAATACGTGCGAGAGAAGCACAC-3'

F118 (reverso): 5' -TAACCCCTTAACGCCAAGTAAG-3'

En el caso de TuMV, las amplificaciones se realizaron con un sistema de PCR en tiempo real OneStep Plus (Applied Biosystems) según el siguiente perfil: 5 min a 42 °C, 10 s a 95 °C, y 40 ciclos de 5 s a 95 °C y 34 s a 60 °C. El estadio de fusión será 15 s a 95°C, 1 min 60 °C y 15 s a 95°C. Hemos realizado tres réplicas por reacción para cada muestra y los resultados de la cuantificación se examinaron adicionalmente utilizando StepOne, Software v.2.2.2 (Applied Biosystems). Las medidas resultantes tienen unidades de genomas de TuMV por ng de RNA total.

5. Secuencias consenso y mutaciones de la población de virus ancestrales y evolucionados

Para generar la secuencia consenso de cada mutante y linaje de los países 0 y 12, se obtuvieron productos de RT-PCR utilizando la transcriptasa inversa Hi-Fi AccuScript (Agilent Technologies) y la DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific). Para amplificar cada genoma viral se sintetizaron 3 amplicones que solapan de 3114 (extremo 5'-fragmento R1), 3697 (región central, fragmento R2) y 3287 (extremo 3'-fragmento R3) pb, utilizando 3 parejas de cebadores. Para la retrotranscripción se utilizó una concentración de cada muestra de RNA de 150-300 ng y 0.25 µM de los siguientes cebadores:

5'-CGAGTAGTATCTTATAGCACAGCGCTCCGACC-3' para R1 hasta P3
 5'-TGTCTGGAATCGGTAGCAAATGTAGCTGAGTTGTG-3' para el fragmento
 2R hasta N1a
 5'- -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCCCTTGCATCATATCAAATG-3') para el
 fragmento 3R hasta el extremo 3' del genoma

La mezcla de RNA y cebadores se desnaturizó 5 min a 65 °C y se enfrió en hielo. Posteriormente se añadió una mezcla del tampón Accuscript Hi-Fi 1, 1mM de dNTPs, 8 mM de DTT, 4U de Ribolock RNase inhibitor (Thermo Scientific) y 0.5 µL de Accuscript Hi-Fi (Agilent Technologies). El volumen final es de 10 µL. Las condiciones de reacción fueron 90 min. a 42 °C y 5 min. a 70 °C para inactivar el enzima.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen de 50 µL que contiene una mezcla de tampón Phusion 1X, 0,4 mM de los dNTPs, 0.2 µM de cada cebador, 0.5-1 µL de DMSO, 2 unidades de DNA polimerasa Phusion (Thermo Scientific) y 1 µL de volumen de cada retrotranscripción para cada PCR.

Para sintetizar el primer amplicón (1R) se usaron los cebadores 1R-P3 anteriormente obtenido y 1F-5UTR (5'-GCAAACGCAGACCTTTCGAAGCACTCAAGC-3', con las siguientes condiciones: desnaturización de 30 s a 98 °C, 3 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 67 °C, 2 min a 72 °C; 3 ciclos de 10 s a 98 °C; 20 s a 65 °C, 2 min a 72 °C, 32 ciclos de 10 s a 98 °C; 20 s a 63 °C; 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Para sintetizar el segundo amplicón (2R) se usaron los cebadores 2F-P3 (5'-TGGGAGCTTGCGGATGGTGGATACACAATTC-3') y 2R-N1a, obtenido anteriormente, con las condiciones: desnaturización de 30 s a 98°, 15 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 67 °C, 2 min a 72 °C, 23 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 65 °C, 2 min a 72 °C, 32 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 63 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Por último, para sintetizar el tercer amplicón (3R) se usaron los cebadores 3F-N1a (5'-TGGGAGCTTGCGGATGGTGGATACACAATTC-3') y 1R-P3, sintetizado anteriormente, con las condiciones: desnaturización de 30 s a 98 °C, 15 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 67 °C, 2 min a 72 °C, 23 ciclos de

10 s a 98 °C, 20 s a 65 °C, 2 min a 72 °C, 32 ciclos de 10 s a 98 °C, 20 s a 63°, 2 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR resultantes o bien se purificaron directamente o a partir de geles de agarosa si fue necesario cortar la banda del amplicón y para ello se utilizó el kit MSB Spin PCRapace (Stratec Molecular).

Las muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación de DNA del IBMCP (www.ibmcp.csic.es/en/services/dna-sequencing-unit) y una vez recibidas las secuencias de los 3 fragmentos, fueron ensamblados con el programa Genious R9.0.2.

La secuencia de TuMV CP+3' UTR, 1076 pb es la misma que figura en la sección para RT-qPCR, y los cebadores son: F108 (directo): 5'-TACGTGCGAGAGAAGCACACATCCAG-3' y F109 (reverso): 5'-AACACACATGACAAAGTCACACTGGCTGC-3'

Los genomas virales se amplificaron utilizando la DNA polimerasa de Phusion (Thermo Scientific, Waltham), 1 µl de las reacciones de RT y los cebadores.

El protocolo de PCR para los amplicones fue el siguiente: desnaturalización inicial 30 s a 98 °C, cinco ciclos con un paso de desnaturalización de 10 s a 98 °C, paso de fusión de 20 s a 57 °C y paso de alargamiento de 30 s a 72 °C seguido de 27 ciclos en las mismas condiciones, excepto que la etapa de hibridación se realizó a 65 °C. Los tamaños de amplicones, se confirmaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las secuencias consenso de todos los linajes evolucionados en los pases 0 y 12 se obtuvieron utilizando la secuenciación de Sanger y un analizador genético ABI 3130 XL (Applied Biosystems) en la Unidad de Secuenciación de DNA del IBMCP. Las secuencias se ensamblaron utilizando el software GENEIOUS versión 11 (www.geneious.com; consultado por última vez el 12 de julio de 2018).

6. Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 25 (IBM).

6.1. Modelos lineales generalizados

En la tesis se usaron modelos lineales generalizados (GLMs) tanto en la parte dedicada a estudiar el TEV en tabacos y pimientos, como en el proyecto con TuMV en genotipos de *A. thaliana* de diferente susceptibilidad a la infección.

En el primer caso, para el experimento con tabacos y pimientos, obtuvimos datos del título viral en los pases 0, 3, 5, 8, 11, 13 y 15, y también de la infectividad. Como se calcularon las tasas de evolución mediante el modelo autoregresivo ARIMA (ver apartado 6.4) para ambos rasgos fenotípicos, y además se realizaron el experimento tal y como ya he mencionado, sometiendo a las poblaciones de cada linaje de TEV a tres regímenes evolutivos diferentes en lo que se refiere a N_e (1/10×, 1× y 10×), se analizaron los efectos de N_e en v , es decir, en la tasa evolutiva de cada uno de los dos rasgos fenotípicos del virus estudiado. El modelo factorial empleado es el siguiente:

$$v_{ijk} = \mu + \alpha_i H + \beta_j N + \gamma_{ij} H \times N + \varepsilon_{ijk} \quad (4)$$

Donde H y N son factores que se asumen ortogonales y que se corresponden con el tipo de huésped (tabaco o pimiento) y el tamaño efectivo de la población (1/10×, 1× y 10×), respectivamente, μ es el valor de la gran media y ε_{ijk} el error asociado a cada medida que se asume Gaussiano.

En este experimento también hemos usado el GLM para comprobar si el número de unidades infecciosas (LFU) varía entre huéspedes, según la siguiente ecuación

$$\log(LFU_{ijk} + 1) = \mu + \alpha_i H + \beta_{ij} R(H) + \gamma_k \log(gRNA) + \delta_{ij} H \times \log(gRNA) + \theta_{ijk} R(H) \times \log(gRNA) + \varepsilon_{ijk} \quad (5)$$

La relación entre genomas de TEV ($gRNA$) y LFU es lineal en escala log-log. H es una variable factor en la que se engloba cada uno de los tres huéspedes (pimientos, tabacos y quenopodios), R es cada una de las réplicas biológicas y el $\log(gRNA)$ es una covariable. El modelo también incluye las interacciones entre la covariable y los dos factores. μ y ε_{ijk} tienen el mismo significado que en la ecuación 4.

Similar al modelo GLM anterior (ecuación 5), en el experimento de evolución de TuMV en huéspedes de distinta susceptibilidad, el modelo usado ha sido:

$$AUDPS = \mu + G_i + P_j + (G \times P)_{ij} + L(G)_k + (L(G) \times P)_{ijk} + \varepsilon_{ijk} \quad (6)$$

Donde G , L y P son factores que se corresponden con el genotipo en el que ha evolucionado cada linaje L y en cada pase de evolución P , todos ellos son factores también, es decir, variables categóricas. μ y ε_{ijk} significan lo mismo que en la ecuación 4. Para modelizar la infectividad (I) la ecuación sería la misma sólo que en este caso la variable de respuesta sería I en vez de $AUDPS$.

6.2. Modelos autoregresivos integrados de media móvil (ARIMA)

Para el experimento de evolución de TEV en tabacos y pimientos, he utilizado el ARIMA(1, 0, 0) para calcular las tasas de evolución de la carga viral y la infectividad, dos componentes esenciales de la eficacia biológica, que medí en los pases 0, 3, 5, 8, 11, 13 y 15. Los datos de las series de tiempo resultantes se ajustaron a un modelo de la forma

$$X(t + 1) - \rho(t)X(t) = X(0) + vt, \quad (7)$$

donde X representa el valor del rasgo fenotípico que se analiza en el tiempo t , ρ mide la correlación entre los valores observados en dos puntos de tiempo consecutivos (autosimilitud en la serie temporal) y v corresponde a la tasa neta de cambio del rasgo fenotípico, es decir, la tasa de evolución. Dado que estamos interesados en explorar el efecto de N sobre v , hemos estimado un valor de v independiente para cada uno de los cinco linajes evolucionados bajo cada uno de los tres regímenes evolutivos. Estos datos luego se ajustaron al modelo de GLM factorial mostrado en la ecuación 1.

De la misma forma, hemos usado este modelo ARIMA(1, 0, 0) para analizar las series temporales generadas en el experimento de evolución de TuMV en genotipos de *A. thaliana* de distinta susceptibilidad para calcular las tasas de evolución de las $AUDPS$ y la I , y a su vez comprobar si existe correlación significativa entre ambas; y si para cada una de ellas existen diferencias en sus tasas de adaptación para cada genotipo, siendo importante comprobar si esto está relacionado con la hipersusceptibilidad.

7. Matriz de infección en el patosistema TuMV y *A. thaliana*

La matriz de infección se utilizará para construir redes de infección bipartitas. Una red de infección se considera bipartita cuando contiene dos agentes que interactúan, en este caso, aislados virales y genotipos de plantas. Esta red se puede representar como una matriz booleana de tamaño $m \times n$. Aquí m es el número de linajes virales independientes y n es el número de genotipos de huésped distintos. La matriz F primero se transformará en una matriz booleana que indica si un linaje viral dado se desempeña significativamente mejor (1) o peor (0) que el genotipo silvestre Col-0.

El grado de anidamiento de la matriz de infección se calculará utilizando el algoritmo de cálculo de temperatura implementado en BINMATNEST (Rodríguez-Gironés y Santamaría, 2006). La temperatura T de una matriz de interacción se calcula reordenando las columnas de los genotipos del huésped y las filas de los linajes de virus, de modo que la mayoría de las interacciones ocurran en la parte superior izquierda de la matriz. T cuantifica el grado en que una matriz está perfectamente anidada ($T = 0$) o si la matriz carece de orden y los elementos que representan interacciones significativas se distribuyen al azar ($T = 100$). Las redes bipartitas se pueden descomponer en componentes separados de manera que no se encuentren infecciones cruzadas entre los componentes.

La modularidad de las redes de infección bipartitas se calculará utilizando el Algoritmo Estándar de Módulos Inducidos Recursivamente Bipartitos (Barber, 2007), que utiliza una heurística de búsqueda local para maximizar la modularidad bipartita Q . Q representa la frecuencia con la que un orden particular de aislados de virus y genotipos del huésped se corresponde con interacciones que se encuentran principalmente dentro de un módulo ($Q = 1$ o modular), fuera de los módulos ($Q = -1$ o antimodular), o en algún lugar intermedio ($-1 < Q < 1$).

La significación estadística de T y Q se evaluará utilizando el modelo nulo general propuesto por Bascompte et al. (2003). En este modelo, la probabilidad de que cada celda esté ocupada es el promedio de las probabilidades de ocupación de su fila y columna. Biológicamente, esto significa que la probabilidad de generar una interacción es proporcional al nivel de generalización (grado) tanto del virus aislado como del genotipo de la planta.

En conjunto, estos análisis nos permitirán probar qué modelo de interacción virus-huésped explica mejor la evolución de TuMV en *A. thaliana*: MA o GFG, explicados anteriormente en la Introducción.

RESULTADOS

1. Efectos del tamaño de inóculo sobre la tasa de evolución del TEV

La carga viral y la infectividad, dos componentes esenciales de la eficacia biológica, se midieron en los pases 0, 3, 5, 8, 11, 13 y 15 del experimento de evolución. Los datos de la serie temporal resultante se ajustaron a los modelos ARIMA(1,0,0) mostrados en la ecuación (7) de la sección 6.2 de Material y Métodos. En el apartado 2.1 de esta misma sección se explican detalladamente los protocolos utilizados para realizar el experimento.

Como estamos interesados en explorar el efecto de N_e sobre v , hemos estimado un valor de v independiente para cada uno de los cinco linajes evolucionados en cada uno de los tres regímenes evolutivos. Estos datos fueron ajustados al modelo ANOVA factorial indicado en la ecuación (4) de la sección 6.1 de Material y Métodos.

1.1. El número de genomas por unidad infecciosa varía entre las distintas especies huésped

La fig. 20 muestra la relación observada entre el número de genomas de TEV (gRNA) y el número de unidades infecciosas (LFU). La relación es lineal en una escala log-log. Los datos se ajustaron al siguiente modelo lineal mediante la técnica GLMM:

$$\log((LFU)_{ijkl} + 1) = \mu + \alpha_i H + \beta_{ij} R(H) + \gamma_k \log(\text{gRNA}) + \delta_{ij} H \cdot \log(\text{gRNA}) + \theta_{ijk} R(H) \cdot \log(\text{gRNA}) + \varepsilon_{ijkl} \quad (8)$$

donde, como antes, el factor H representa las tres especies de huéspedes utilizadas en estos experimentos (quinoa, tabaco y pimiento), el factor R representa las réplicas biológicas del experimento realizado para cada huésped (es decir, R está anidado dentro de H), y el $\log(\text{gRNA})$ se incorpora en el modelo como una covariable. El modelo también incluye las interacciones entre la covariable y los dos factores. μ y ε_{ijkl} tienen el mismo significado que en la ecuación (4). La importancia de cada factor en el modelo se evaluó mediante pruebas de razón de verosimilitud.

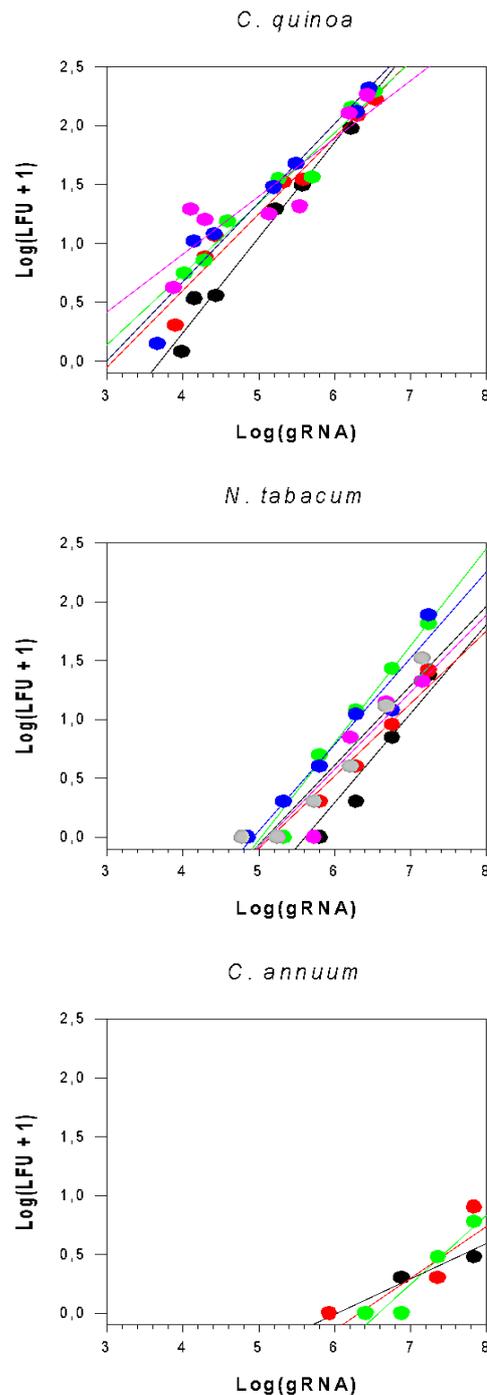


Fig. 20. Relación entre genomas de TEV (gRNA) y unidades infecciosas (LFU). Cada color representa una réplica distinta del experimento. Cada gráfica corresponde al huésped indicado.

Existen diferencias netas entre las tres especies de huéspedes ($\chi^2 = 36.640$, 2 g.l., $P < 0.001$), lo que indica que, en promedio, se necesitan diferentes números de gRNA TEV para iniciar una infección, siendo la quinoa el huésped que requiere menos dosis y el pimiento el que requiere de más genomas para generar una LFU. Obviamente, la covariable tiene un efecto

neto en el número de unidades infecciosas ($\chi^2 = 163.013$, 1 g.l., $P < 0.001$): cuanto más gRNA de TEV se inoculan, más focos de infección se producen. R no tuvo un efecto significativo en el número de unidades infecciosas por sí mismo ni en la interacción con la covariable (en ambos casos, $P \geq 0.084$), lo que indica la alta reproducibilidad de los resultados. Más interesante aún, la pendiente de las líneas de regresión varía entre las especies huéspedes (término de interacción significativo entre H y la covariable $\log(\text{gRNA})$): $\chi^2 = 10.650$, 2 g.l., $P = 0.005$), lo que indica que aumentos equivalentes en la dosis de gRNA no producen incrementos similares en la cantidad de unidades infecciosas en cada huésped. En promedio, las pendientes son más acusadas para el pimiento, lo que sugiere que se deben inocular más gRNA para lograr la misma cantidad de unidades infecciosas, y menos pronunciadas para el tabaco y la quinoa (no hay diferencias entre ellas: prueba de Tukey, $P > 0.05$). De hecho, se deben inocular 30.4 gRNAs de TEV más en pimiento para generar un número equivalente de LFUs que en tabaco. Por lo tanto, a partir de estos resultados, concluimos que para que los experimentos de evolución se realicen en condiciones equivalentes de N en ambos huéspedes, es necesario inocular aproximadamente 30 veces más gRNA de TEV en pimiento que en tabaco.

La fig. 21 contiene los datos de la serie temporal para los dos componentes de la eficacia Darwiniana que hemos evaluado, carga viral e infectividad. Los datos para cada linaje evolutivo se ajustaron al modelo ARIMA(1,0,0) que se muestra en la ecuación 7 para generar estimaciones independientes de v . La fig. 21 muestra las estimaciones promedio de estas tasas de evolución para cada carácter fenotípico, huésped experimental y tamaño del inóculo.

En el caso de la carga viral, los datos se muestran en la fig. 21A, y se ajustaron al modelo ANOVA descrito en la ecuación 4. Un efecto altamente significativo se asoció con el factor H ($F_{1,24} = 60.812$, $P < 0.001$). En promedio, las tasas de evolución fueron más altas en el nuevo huésped, pimiento, que en el original, tabaco. Más interesante aún, N_e también tuvo un efecto general significativo en las tasas de evolución ($F_{2,24} = 5.652$, $P = 0.010$), con tasas de evolución más lentas asociadas a tamaños de inóculo más pequeños ($N/10$) y aumentando en magnitud a medida que aumenta el N_e . No se ha encontrado una interacción significativa entre H y N ($F_{2,24} = 1.457$, $P = 0.253$), lo que sugiere que el efecto de N_e sobre v fue similar para ambos huéspedes experimentales.

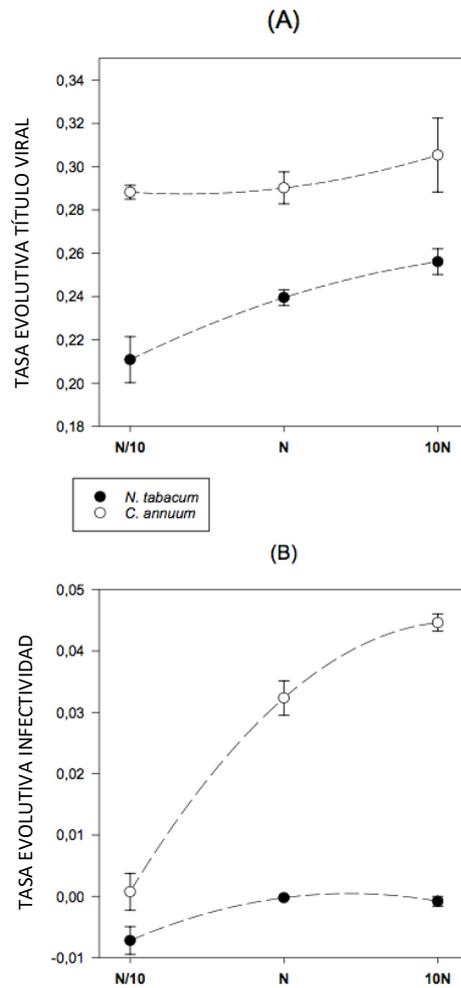


Fig. 21. Efecto de H (especie huésped) y N_e en la tasa de evolución de (A) título viral y (B) infectividad. Las barras de error representan ± 1 SD.

En cuanto al segundo carácter de eficacia, la infectividad, los datos que se muestran en la fig. 21B también se ajustaron al modelo ANOVA que se muestra en la ecuación (4). H tuvo un efecto altamente significativo ($F_{1,24} = 297.719$, $P < 0.001$), nuevamente con los linajes evolucionados en el nuevo huésped pimiento caracterizado por tasas de evolución más rápidas que los linajes evolucionados en el huésped natural tabaco. N_e también tuvo un efecto positivo global significativo sobre v ($F_{2,24} = 87.751$, $P < 0.001$), con tasas que aumentaron en magnitud con N_e . En el caso de la infectividad, se ha encontrado una interacción $H \cdot N$ significativa ($F_{2,24} = 43.884$, $P < 0.001$), con incrementos en N_e que tienen efectos más grandes en el nuevo huésped que en el natural.

La hipótesis de la interferencia clonal discutida en la Introducción predice un efecto de rendimiento decreciente de la cantidad de variación genética

beneficiosa contenida en el inóculo (N en nuestra notación) sobre la tasa de evolución ν . Para comprobar esta hipótesis, ajustamos un modelo lineal y otro cuadrático a cada conjunto de datos en la fig. 21 como se hizo en Miralles et al. (1999). El modelo lineal que representa la hipótesis nula de que ν es directamente proporcional a la disponibilidad de la variación beneficiosa según lo descrito por la ecuación 2 y el modelo cuadrático que ilustra el efecto de los rendimientos decrecientes (una curvatura cóncava con N creciente). En el caso de la carga viral (fig. 21A), la hipótesis nula no podría rechazarse para ninguno de los dos huéspedes de acuerdo con una prueba de la F parcial que compara la bondad de ajuste de ambos modelos anidados ($F_{1,12} = 0.450$, $P = 0.515$ para tabaco y $F_{1,12} = 0.245$, $P = 0.630$ para pimiento). Por el contrario, en el caso de infectividad (fig. 21B), la hipótesis nula fue rechazada en ambos casos, ya que la bondad de ajuste mejoró significativamente al agregar un término cuadrático con coeficiente negativo ($F_{1,12} = 4.800$, $P = 0.049$ para tabaco y $F_{1,12} = 9.719$, $P = 0.009$ para pimiento). Por lo tanto, a partir de estos resultados, concluimos que la tasa de adaptación depende tanto de la especie huésped, siendo más rápida en huéspedes nuevos, como del tamaño del inóculo. Sin embargo, el efecto esperado de la interferencia clonal solo se pudo detectar para uno de los caracteres de eficacia estudiados, la infectividad.

2. Selección de genotipos mutantes de *A. thaliana* para el experimento de evolución en huéspedes de susceptibilidad variable

Para la selección de genotipos que emplear en el posterior experimento de evolución, dispusimos de una colección que *a priori* representa diversos tipos de selección (fuerte o débil), y que denominamos hipo o hiper-susceptibles a la infección del TuMV, respectivamente (Tabla 1). Todos los mutantes mostrados en la Tabla 1 estaban sobre el fondo genético de referencia Col-0. En primer lugar, evaluamos la virulencia de TuMV en cada uno de los mutantes como la reducción de peso comparada con el genotipo silvestre. El resultado es que tres de los genotipos mostraban más peso que el genotipo silvestre (*eds5-1*, *pad4-1* y *coi1-40*). Los dos primeros pertenecen a la ruta del SA y el segundo a la del JA y tienen mutaciones puntuales. Todos los demás tienen menos peso que el genotipo silvestre y las diferencias entre genotipos suponen un 93% de la varianza observada total en virulencia ($F_{20,84} = 71.820$, $P < 0.001$).

Según se muestra en la fig. 22, los genotipos en los que TuMV muestra una reducción significativa de la virulencia relativa al silvestre, son *sid2-1*, *jin1*, *eds4-1*, *dcl4*, *hsp90.1*, *i4g2* y *dbp2*. En el mutante *p58^{ipk}* tiene mayor virulencia que en el genotipo silvestre y en el resto de genotipos, TuMV muestra una virulencia estadísticamente indistinguible de la del genotipo silvestre.

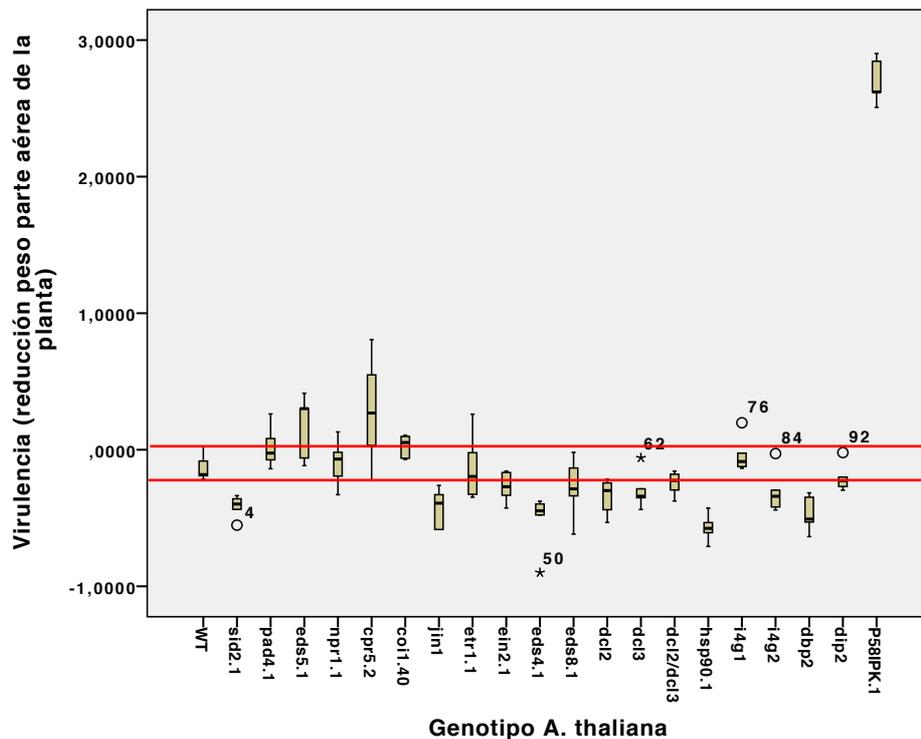


Fig. 22. Virulencia por genotipos. Las barras representan el error estándar de la media.

A continuación, evaluamos la severidad de los síntomas de la infección empleando una escala semicuantitativa dividida en tres categorías (fig. 23): 1-2 si no se aprecian síntomas, 2-3 si son síntomas intermedios y 3-4 si se observan síntomas severos con hojas total o parcialmente cloróticas. Comparando estos valores con los síntomas que induce TuMV en el genotipo silvestre de *A. thaliana*, los distintos genotipos se clasifican del siguiente modo: (1) los genotipos *jin1*, *hsp90-1* y *p58^{ipk}* muestran síntomas más severos que el silvestre, (2) los genotipos *i4g2*, *etr1-1*, *ein2-1*, *eds8-1*, *dcl4*, *dcl2* *dcl4* y *dbp2* son menos severos que en el genotipo silvestre y (3) los síntomas inducidos por TuMV en el resto de genotipos no fueron estadísticamente distinguibles de los presentados por plantas silvestres infectadas. Las diferencias entre genotipos para esta variable suponen un 75.88% de la varianza total observada ($F_{20,84} = 17.643$, $P < 0.001$).

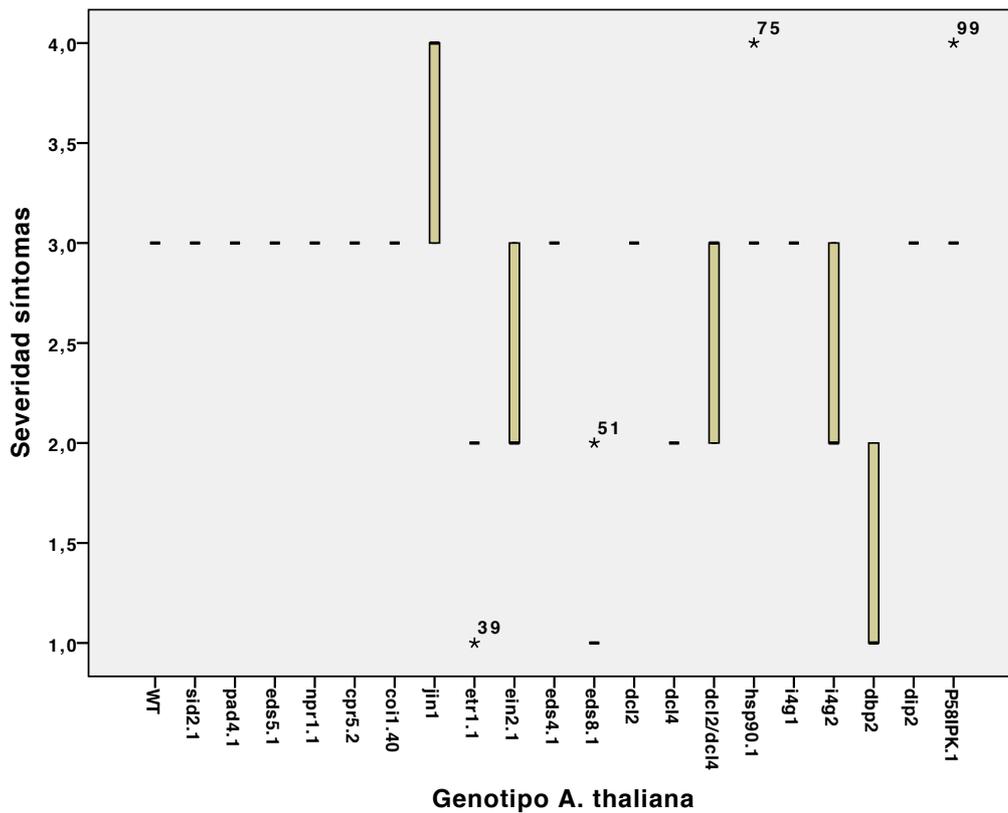


Fig. 23. Severidad de síntomas por genotipo. Los asteriscos representan valores raros (outliers).

En lo referente a los caracteres *AUDPS* e infectividad, dos variables que correlacionan positivamente ya que la infectividad se estima a partir del punto final de las curvas de aparición de síntomas ($r = 0.772$, 21 g.l., $P < 0.001$), los resultados obtenidos fueron los siguientes. Para el *AUDPS* (fig. 26) solo hay tres genotipos de *A. thaliana* para los que el área sea mayor que en plantas silvestres infectadas, estos son *jln1*, *cpr5-2* y *hsp90-1*, lo que indica que la enfermedad progresa mucho más rápido en estos que en plantas silvestres. Nótese que dos de estos tres genotipos, *jln1* y *hsp90-1*, también presentan mayor severidad de síntomas. En el resto de genotipos la progresión de síntomas parece ser más lenta que en plantas silvestres. En el caso de la infectividad (fig. 24, obtuvimos un 100% de plantas silvestres infectadas, un valor también observado para *p58^{ipk}*, *i4g1*, *dcl2* *dcl4* y *npr1-1*. En todos los demás genotipos, la infectividad siempre fue menor: 95% en *hsp90.1*, *jln1* y *coi1-40*; del 90% en *sid2-1*, *pad4-1*, *eds4-1* y *dcl2*. Baja hasta el 85% en *i4g2* y *dip2*, y es del 80 % en *cpr5-2*, *dcl4* y *dbp2*. Los tres genotipos en los que TuMV muestra menor infectividad son *ein2-1* (70%), *eds8-1* (55%) y *etr1-1* (40%).

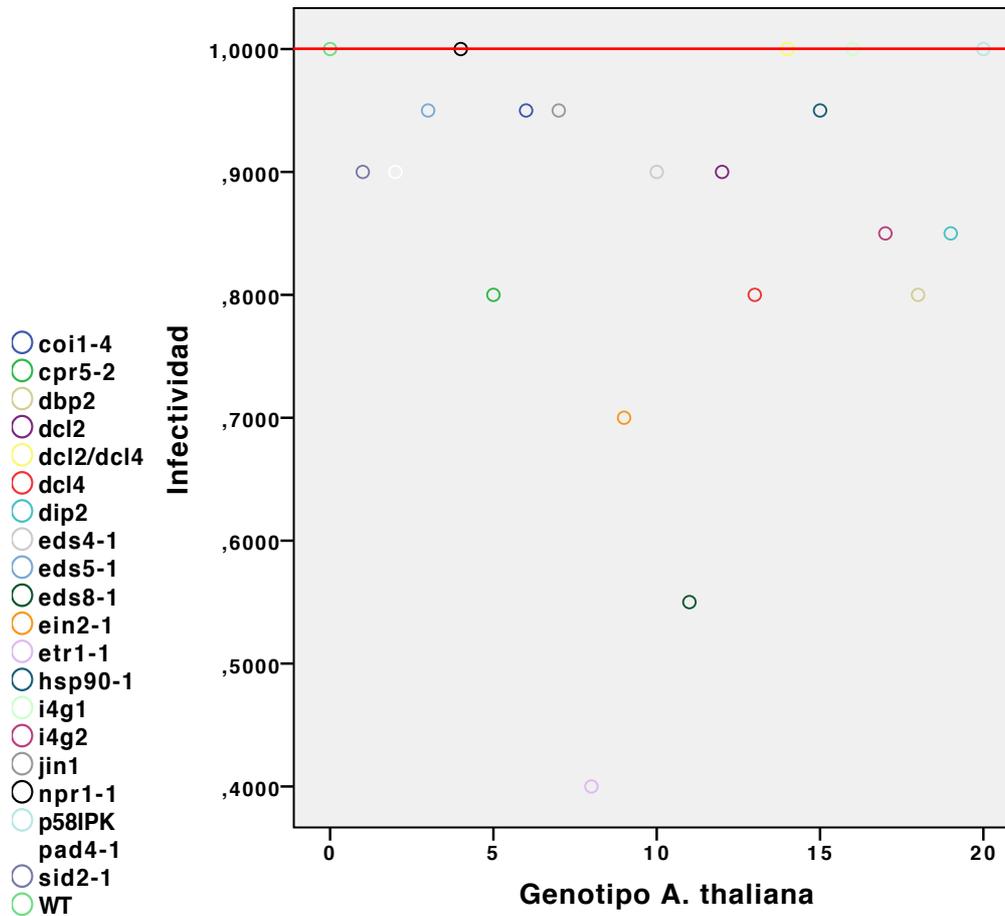


Fig. 24. Frecuencia de plantas infectadas por genotipo.

Por último, también procedimos a estimar la carga viral en cada genotipo mediante RT-qPCR. Hemos observado grandes diferencias entre genotipos (78.99% de la varianza total para el carácter), pero también diferencias a tener en cuenta entre plantas de un mismo genotipo (19.33% de la varianza total observada). Tal y como muestra en la fig. 25 podemos considerar diferencias estadísticamente significativas entre plantas silvestres y los genotipos *pad4-1*, *eds5-1*, *npr1-1*, *coi1-40*, *etr1-1*, *ein2-1*, *eds4-1*, *eds8-1*, *dcl2*, *dcl4*, *hsp90-1*, *i4g1* e *i4g2*.

En la Tabla 13 del Material Suplementario se recogen los datos de carga media de cada genotipo y su control, que se han tomado de las tres réplicas por planta en la RT-qPCR. La Tabla también muestran los datos que obtuvimos de plantas asintomáticas, sin embargo, estas plantas no se tuvieron en cuenta para los análisis, ya que no pudimos usarlas para medir otros rasgos fenotípicos debido a la ausencia de síntomas.

Tabla 3. ANOVA del título viral en la colección de genotipos mutantes.

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	F	P
Intersección	Hipótesis	2.625x10 ¹³	1	2.625x10 ¹³	859.142	< 0.001
	Error	2.568x10 ¹²	84.073	3.055x10 ¹⁰		
genotipo	Hipótesis	1.358x10 ¹³	20	6.793x10 ¹⁰	22.113	< 0.001
	Error	2.582x10 ¹²	84.046	3.072x10 ¹⁰		
planta(genotipo)	Hipótesis	2.604x10 ¹²	84	3.101x10 ¹⁰	34.988	< 0.001
	Error	1.816x10 ¹¹	205	8.862x10 ⁸		

Hemos observado diferencias significativas entre genotipos (Tabla 3, $P < 0.001$; 20 g.l., 78.99% de la varianza observada) y diferencias entre plantas de un mismo genotipo ($P < 0.001$; 20 gl, 18.33% de la varianza). En la fig. 25 están representados los valores del título viral para cada genotipo estudiado. De hecho, una prueba *post hoc* de Bonferroni ($P < 0.05$) agrupa los genotipos en los siguientes grupos disjuntos (entre paréntesis se indica el valor medio y el rango de valores de carga viral en escala logarítmica):

Grupo 1: *i4g2* \lesssim *eds4-1* \lesssim *eds8-1* \lesssim *coi1-40* \lesssim *i4g1* \lesssim *dcl2* \lesssim *etr1-1* \lesssim *dcl4* \lesssim *npr1-1* (4.95; 4.68 – 5.14),

Grupo 2: *ein2-1* \lesssim *eds5-1* (5.32),

Grupo 3: *hsp90-1* (5.42),

Grupo 4: *pad4-1* (5.48),

Grupo 5: *sid2-1* \lesssim *dcl2* *dcl4* \lesssim *cpr5-2* \lesssim *dip2* (5.63; 5.59 – 5.67),

Grupo 6: *p58^{ipk}* (5.71),

Grupo 7: silvestre (5.75) y

Grupo 8: *jin1* \lesssim *dbp2* (5.83), el único que mostraría una carga viral superior a la del genotipo silvestre.

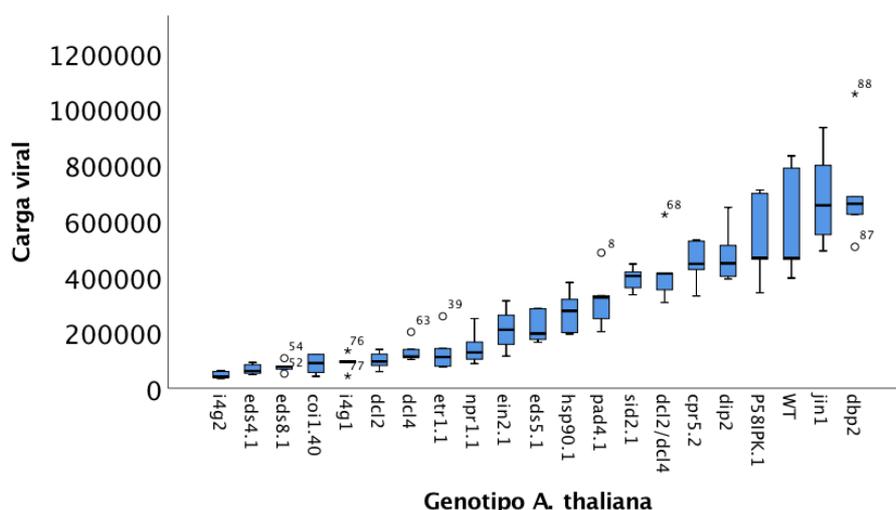


Fig. 25. Título viral promedio en cada genotipo problema. Las barras de error representan el error estándar de la media.

Para escoger los genotipos con los que realizaremos el experimento de evolución, debemos tener en cuenta todos los datos anteriores y elegir tres grupos de genotipos para cada categoría de intensidad de selección: fuerte (plantas hiposusceptibles), débil (plantas hipersusceptibles) y estadísticamente indistinguibles del genotipo silvestre.

Ya hemos visto que la *AUDPS* y la infectividad están positivamente correlacionadas. Además, la *AUDPS* también correlacionan positivamente con la severidad de los síntomas (síntomas más severos conforme avanza la enfermedad), así como ésta con la infectividad (a mayor infectividad, síntomas más severos en nuestro bioensayo). Por último, aunque en menor medida, la *AUDPS* también correlaciona con la carga viral ($r = 0.472$, 20 g.l., $P = 0.031$). Todas estas correlaciones quedan reflejadas en la Tabla 4 y la fig. 27.

Tabla 4. Correlaciones de las variables de estudio. La significatividad de cada prueba se indica a continuación.

	Virulencia	Severidad síntomas	Carga viral	<i>AUDPS</i>	Infectividad
Virulencia	1.000	0.127	0.074	0.193	0.246
		$P = 0,583$	$P = 0.750$	$P = 0.402$	$P = 0.283$
Severidad síntomas		1,000	0.329	0.772	0.668
			$P = 0.145$	$P < 0.001$	$P = 0.001$
Carga viral			1.000	0.425	0.212
				$P = 0.055$	$P = 0.356$
<i>AUDPS</i>				1.000	0.638
					$P = 0.002$
Infectividad					1.000

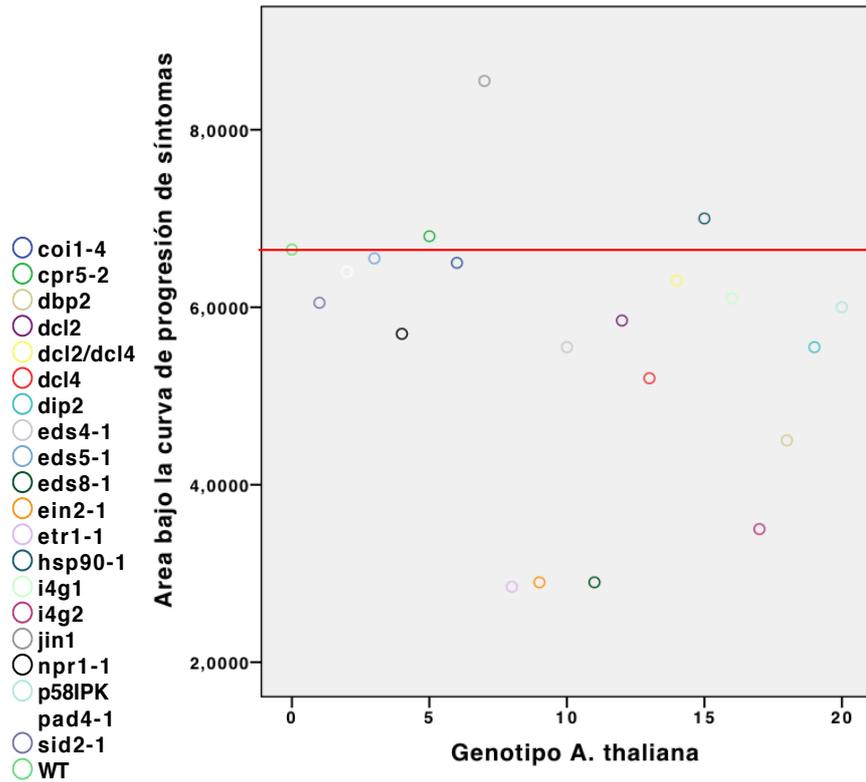


Fig. 26. AUDPS por genotipo. La línea roja indica el valor del genotipo silvestre.

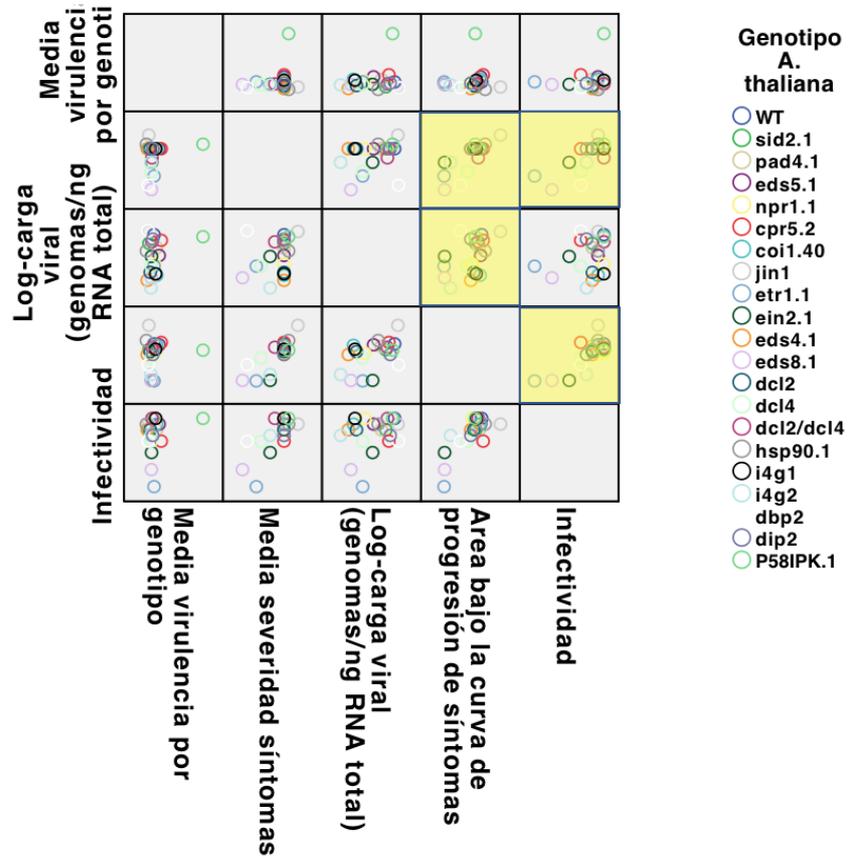


Fig. 27. Correlaciones entre los rasgos fenotípicos del virus. En amarillo, los resultados significativos estadísticamente.

Con el fin de acumular más información sobre la dinámica de aparición de síntomas y la relación entre los distintos caracteres medidos, realizamos un experimento adicional con los genotipos *dcl2 dcl4*, *hsp90.1*, *cpr5-2* y *eds8-1*, representativos de los grupos que se han comentado anteriormente.

En los gráficos de la fig. 28 se observa como en todos los genotipos el virus aumenta su título viral a excepción del doble mutante *dcl2 dcl4*, en el que éste baja a partir de 12 dpi. Sucede lo mismo con la severidad de síntomas (fig. 28B) mostrados en las plantas: en todas ellas se observa una severidad mayor excepto en este mutante, donde disminuye a partir de 12 dpi. *a priori*, esto sugiere que ambas variables correlacionan, lo que en efecto se ha comprobado (Tabla 4) y así se expresa en la fig. 28A.

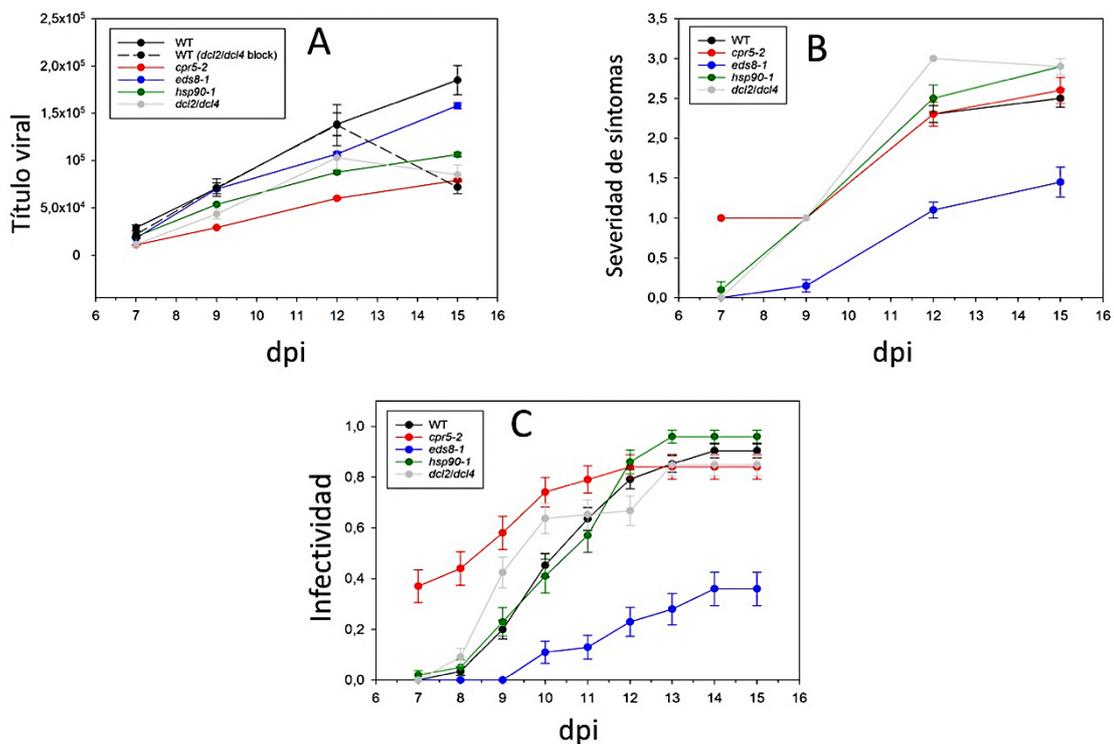


Fig. 28. Variación temporal de los tres rasgos fenotípicos medidos entre 6 y 12 dpi para genotipos representativos.

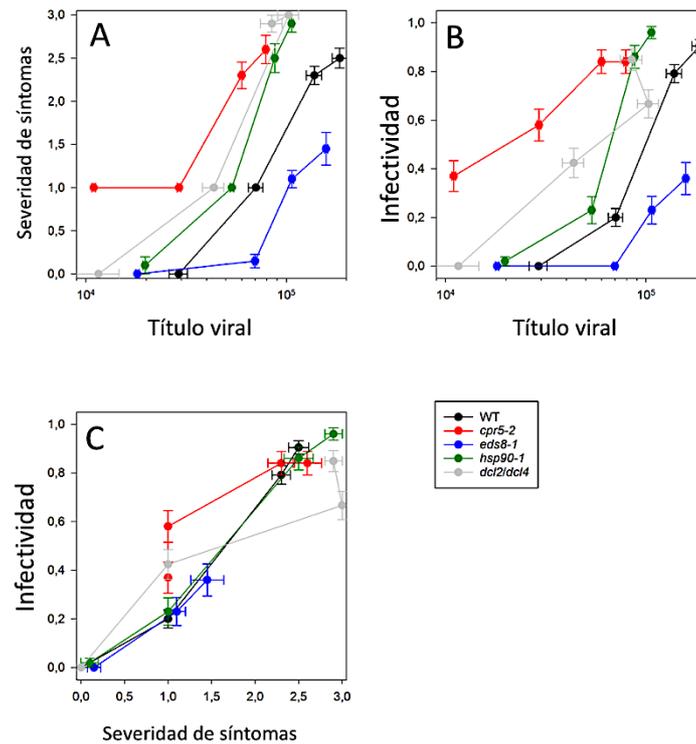


Fig. 29. Relaciones entre los 3 caracteres medidos usando carga absoluta y relativa obtenida durante el experimento.

Para la infectividad (fig. 28C) observamos que se alcanza el valor máximo del 100% para todos los genotipos; sin embargo, esto no sucede en el mismo momento. Para *cpr5-2* sucede antes, a los 12 dpi; para *hsp90.1* y *dcl2 dcl4* a los 13 dpi y *eds8-1* y las plantas silvestres no alcanzan este valor hasta los 14 dpi.

En el gráfico de carga viral frente a infectividad (fig. 29B), hemos observado que ambas correlacionan positivamente para *hsp90.1* y *eds8-1*, es decir, que un aumento de la carga supone también aumento de la infectividad, pero esto no sucede con *cpr5-2* ni *dcl2 dcl4*, en las que se observa una disminución en el título viral. Es el mismo caso que el gráfico de severidad de síntomas frente a infectividad (fig. 29C), ya que la severidad de síntomas y la carga viral correlacionan positiva y significativamente (Tabla 4).

Finalmente, hemos combinado todos los caracteres fenotípicos medidos mediante un análisis de clasificación jerárquica. La fig. 30 muestra los resultados de este análisis. Existen varios grupos de genotipos con respuestas similares a la infección con TuMV, así empleando como criterio mínimo de similitud entre genotipos el valor de distancia 5, éstos quedan clasificados en cinco grupos homogéneos (fig. 30). De cada uno de estos

grupos, hemos elegido al menos un representante con el criterio adicional de que las mutaciones afecten a distintas rutas de señalización y factores de resistencia a la infección, indicados en amarillo en la figura. Así pues, los genotipos seleccionados son *cpr5-2*, *hsp90.1*, *dcl2 dcl4*, *npr1-1*, *dbp-2*, *jin1*, *p58^{ipk}*, *eds8-1* e *i4g2*.

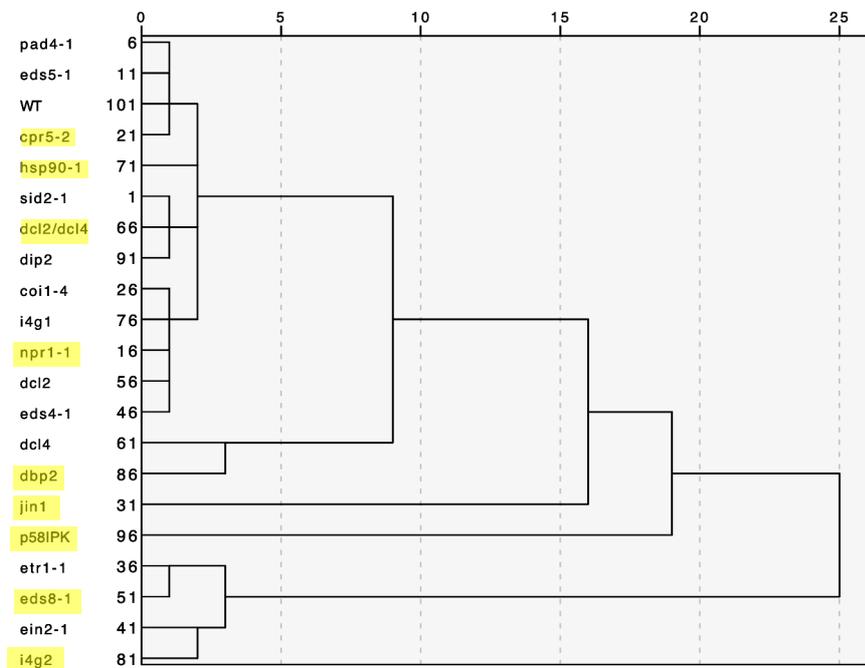


Fig. 30. Análisis canónico discriminante con los grupos obtenidos, y en amarillo los genotipos huéspedes escogidos de cada uno de ellos.

Estos genotipos tienen mutaciones que afectan a rutas de defensa del SA (*eds 8-1*, *cpr5-2* y *npr1-1*), del JA (*jin1*), silenciamiento (*dcl2 dcl4*) o que afectan a factores celulares que el virus debe secuestrar para completar su ciclo de infección. Entre ellos, chaperonas celulares (*hsp90.1*), factores de transcripción (*dbp2*) o traducción (*i4g2*) o el inhibidor negativo de la PKR (*p58^{ipk}*).

3. Evolución experimental de TuMV en genotipos de *A. thaliana* variables en susceptibilidad a la infección

En este capítulo se presentan y analizan los resultados de la evolución experimental, que se centran en estudiar los rasgos fenotípicos y sus cambios a lo largo de los pases y en el cálculo y análisis de las tasas evolutivas para infectividad y *AUDPS*. El capítulo concluye con la descripción de las mutaciones fijadas en los linajes evolucionados.

3.1. Infectividad, título viral, AUDPS y síntomas de los distintos linajes.

Los datos de infectividad total al final de cada pase (12 dpi) para cada genotipo y linaje también han sido tomados por separado para evaluar si existen diferencias significativas para este rasgo fenotípico de las diferentes poblaciones, tanto entre genotipos como entre linajes evolucionados en un mismo genotipo (fig. 31).

En el experimento de evolución, existen diferencias significativas entre genotipos en el número de plantas infectadas ($\chi^2 = 292.069$, 8 g.l., $P < 0.001$) y de los diferentes linajes o historias evolutivas dentro de cada genotipo ($\chi^2 = 210.504$, 36 g.l., $P < 0.001$). También hemos encontrado diferencias entre pases en el GLM ($\chi^2 = 366.297$, 12 g.l., $P < 0.001$).

3.1.1. Resultados evolución en *npr1-1*

En la fig. 32 se muestran los datos de infectividad y carga viral para cada pase de los linajes de TuMV evolucionadas en el genotipo *npr1-1*. En este genotipo, las poblaciones de los 5 linajes alcanzan el 100% de infectividad en el pase 11, con ciertas fluctuaciones a lo largo del experimento. La infectividad preliminar fue del 100% también y se alcanza en el pase 6 en todos los linajes, descendiendo en la mayoría de ellos hasta volver a recuperarla. En los pases 2 y 3 hay un descenso acusado en todos los linajes.

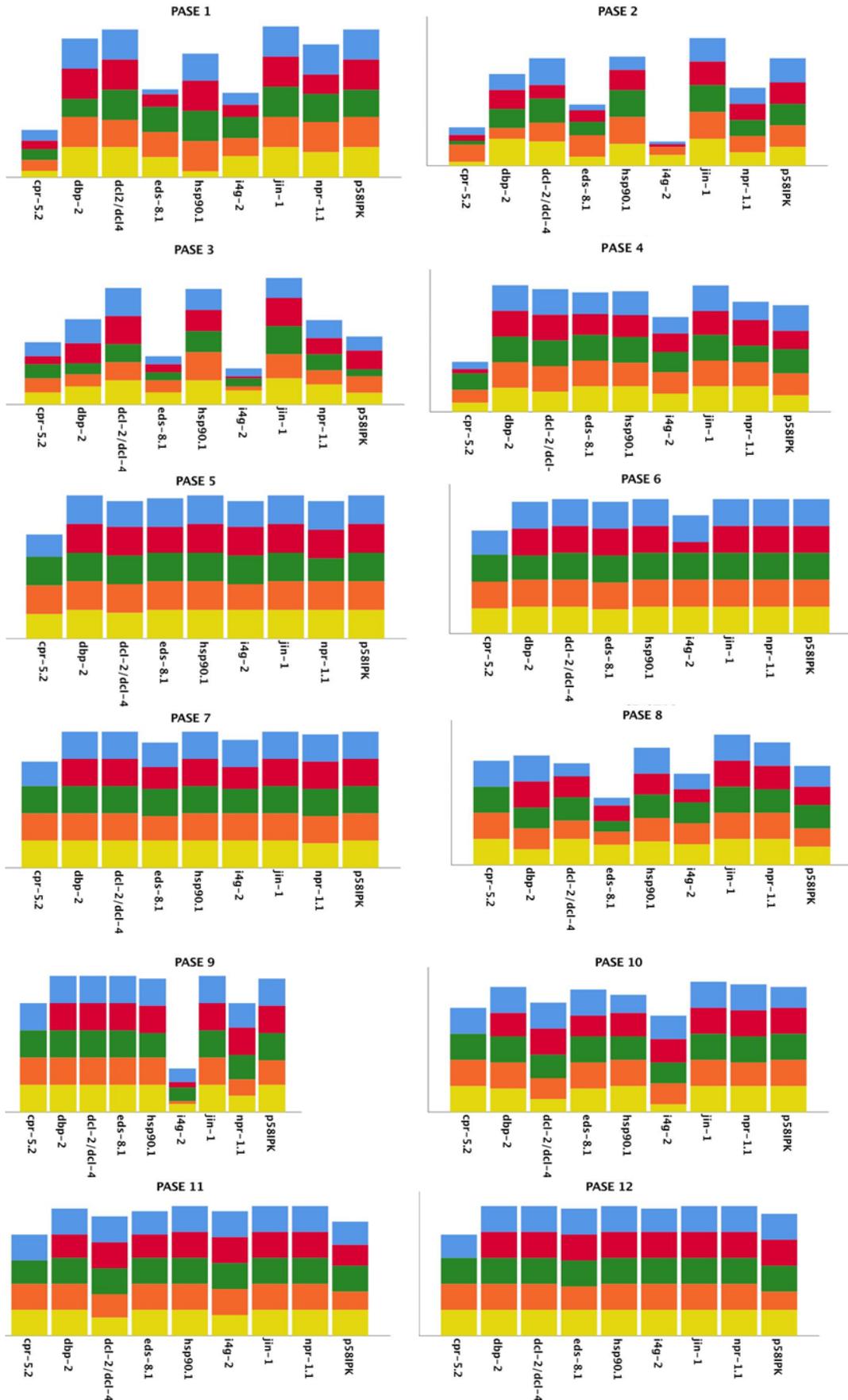


Fig. 31. Infectividad de los linajes en cada genotipo mutante y pase de evolución.

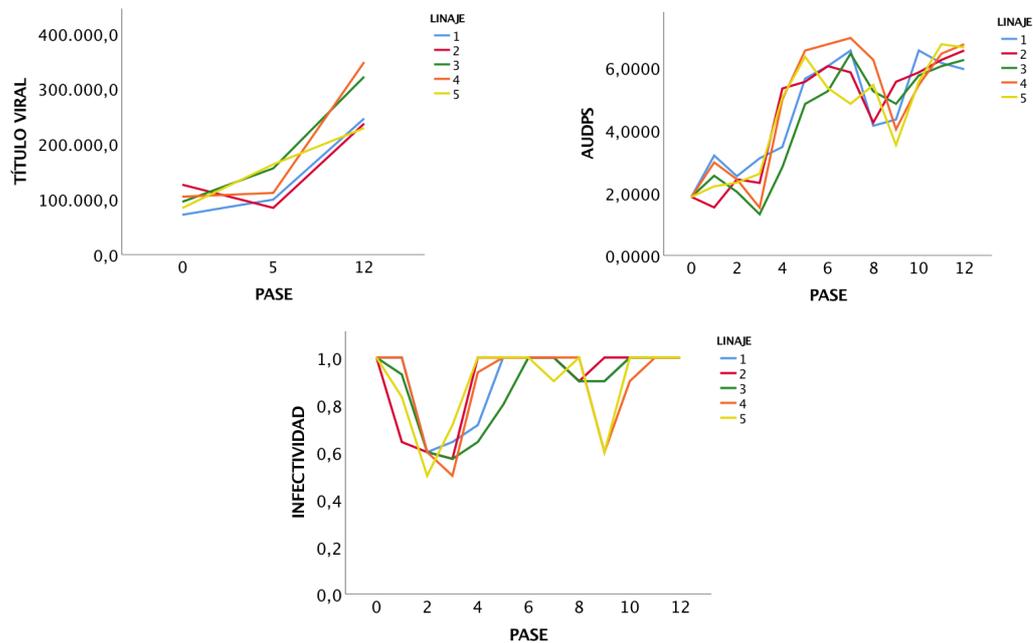


Fig. 32. Carga, AUDPS e infectividad de los linajes en *npr1-1* a lo largo de los pases.

Para *npr1-1* he encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 197.829$, 12 g.l., $P < 0.001$) y AUDPS ($\chi^2 = 597.477$, 12 g.l., $P < 0.001$). Para la carga, en la que sólo se dispone de datos para 3 pases (0, 5 y 12), hemos encontrado diferencias significativas entre pases ($\chi^2 = 117.516$, 2 g.l., $P = 0.001$), pero no linajes. La carga aumenta durante el experimento de evolución, siendo significativo el aumento absoluto entre el pase 0 y el 12 ($t = -5.633$, 4 g.l., $P = 0.005$), y también entre los pases 5 y 12 ($t = -7.257$, 4 g.l., $P = 0.002$).

3.1.2. Resultados evolución en *cpr5-2*

En la fig. 33 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionados en *cpr5-2*. En este genotipo se perdió un linaje a partir del pase 4, ya que como puede verse en los datos de infectividad de pases anteriores, hay un descenso progresivo de esta que lleva a la desaparición de la infección y de los síntomas. A pesar de los intentos de recuperarlo, lo más probable es que los sucesivos cuellos de botella entre el pase ancestral y los siguientes extinguiesen la población de este linaje, ya que no parece haber ninguna causa ambiental en el fitotrón en esas fechas ni esto ha sucedido con el resto de linajes independientes. En lo que se refiere al resto de linajes, prácticamente todos recuperan la infectividad del 80% característica del virus ancestral a partir del pase 5,

superando ese valor y llegando al 100% salvo en el caso del linaje 1, que aún así supera en un 10% la infectividad del virus ancestral.

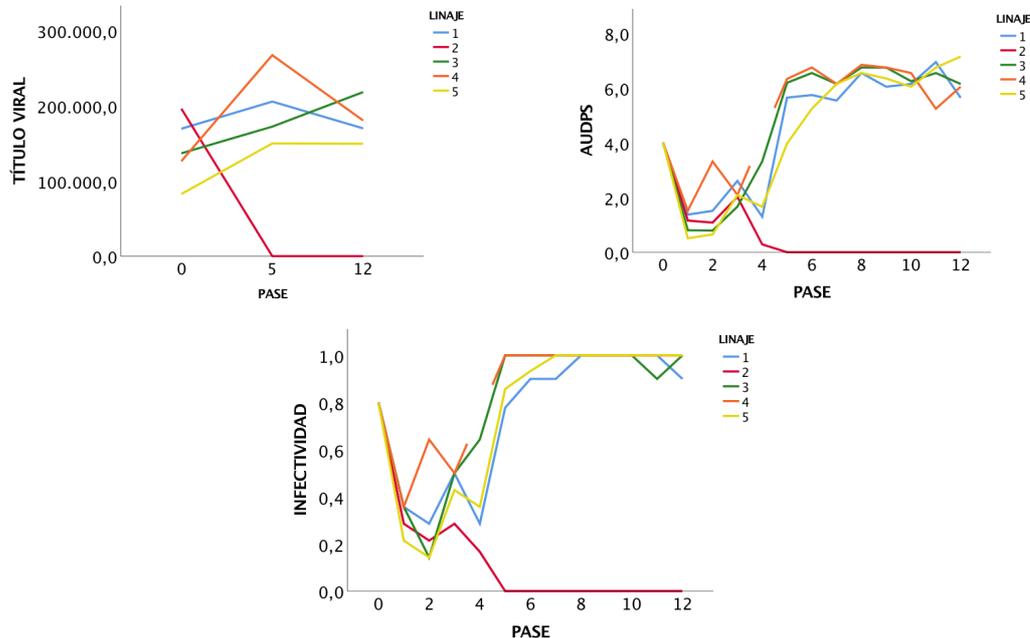


Fig. 33. Carga AUDPS, e infectividad de los linajes en *cpr5-2* a lo largo de los pases.

Para *cpr5-2* hemos encontrado diferencias entre pases y diferencias entre los 5 diferentes linajes para la infectividad ($\chi^2 = 79.587$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 135.731$, 4 g.l., $P < 0.001$, respectivamente) y AUDPS ($\chi^2 = 103.575$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 109.743$, 4 g.l., $P < 0.001$). Para la carga, ninguno de los dos factores es estadísticamente significativo. Tampoco son significativos el aumento y la disminución entre pases ni la variación absoluta a lo largo de todo este experimento.

3.1.3. Resultados evolución en *jin1*

En la fig. 34 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionados en el genotipo *jin1*. Este es el genotipo en el que se ha observado una infectividad más constante a lo largo de los 12 pases, comenzando con un valor del 95% y alcanzando el 100% en todos los casos a partir del pase 4. A este genotipo ni siquiera la afectaron los problemas técnicos en el fitotrón, sucedidos entre los pases 7 y 9.

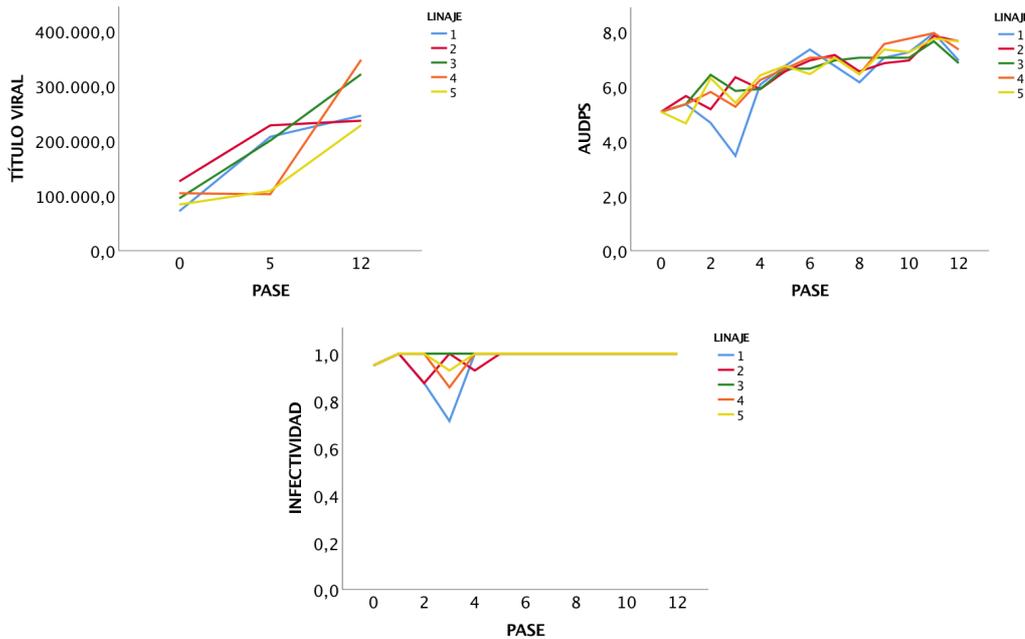


Fig. 34. Carga, AUDPS, e infectividad de los linajes *jin1* a lo largo de los pases.

Para el mutante *jin1* he encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 59.359$, 12 g.l., $P < 0.001$), AUDPS ($\chi^2 = 349.691$, 12 g.l., $P < 0.001$) y título viral ($\chi^2 = 61.472$, 2 g.l., $P < 0.001$). La carga aumenta durante el experimento de evolución, siendo significativo el aumento absoluto entre los pases 0 y el 12 ($t = -7.257$; 4 g.l., $P = 0.002$), y también entre los pases 5 y 12 ($t = -3.515$; 4 g.l.; $P = 0.025$).

3.1.4. Resultados evolución en *eds8-1*

En la fig. 35 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionados en el genotipo *eds8-1*. La infectividad del TuMV ancestral en este genotipo fue la más baja observada, entorno al 50%; sin embargo, y a pesar de los problemas técnicos en el fitotrón (que en este caso quedan reflejados en los datos del pase 8), los linajes del virus superaron valor ancestral, salvo alguna pequeña fluctuación, a partir del pase 9, estabilizándose dichos porcentajes.

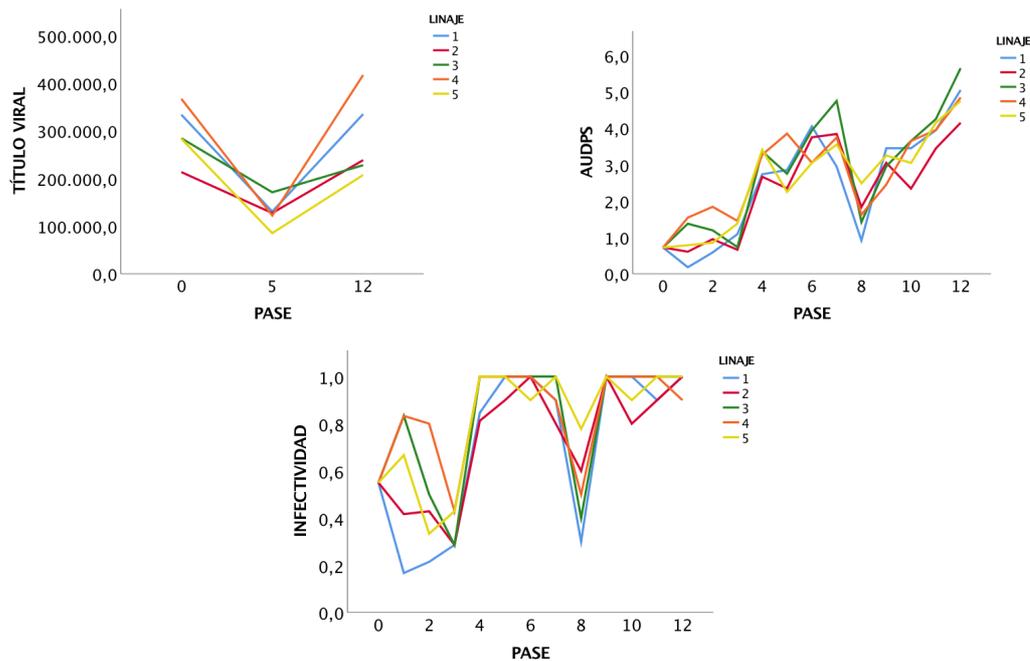


Fig. 35. Carga, AUDPS e infectividad de los linajes en *eds8-1* a lo largo de los pases.

Para el mutante *eds8-1* hemos encontrado diferencias entre pases y también entre los diferentes linajes para la infectividad ($\chi^2 = 386.376$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 18.149$, 4 g.l., $P = 0.001$), AUDPS ($\chi^2 = 726.994$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 14.465$, 4 g.l., $P = 0.006$) y título viral ($\chi^2 = 62.999$, 2 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 19.327$, 4 g.l., $P = 0.001$). Ninguna variación de la carga entre pases es estadísticamente significativa. Tampoco la variación total.

3.1.5. Resultados evolución en el doble mutante *dcl2 dcl4*

En la fig. 36 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV inoculados en el doble mutante *dcl2 dcl4*. La infectividad del virus ancestral en este genotipo fue del 100%; a lo largo del experimento la infectividad fluctuó en diversos pases, algo que achacamos en el caso del pase 8 a los fallos técnicos del fitotrón y en el resto, posiblemente, a las características genéticas de las poblaciones durante los cuellos de botella sucesivos. Al final del experimento se recuperó por completo la infectividad del 100%.

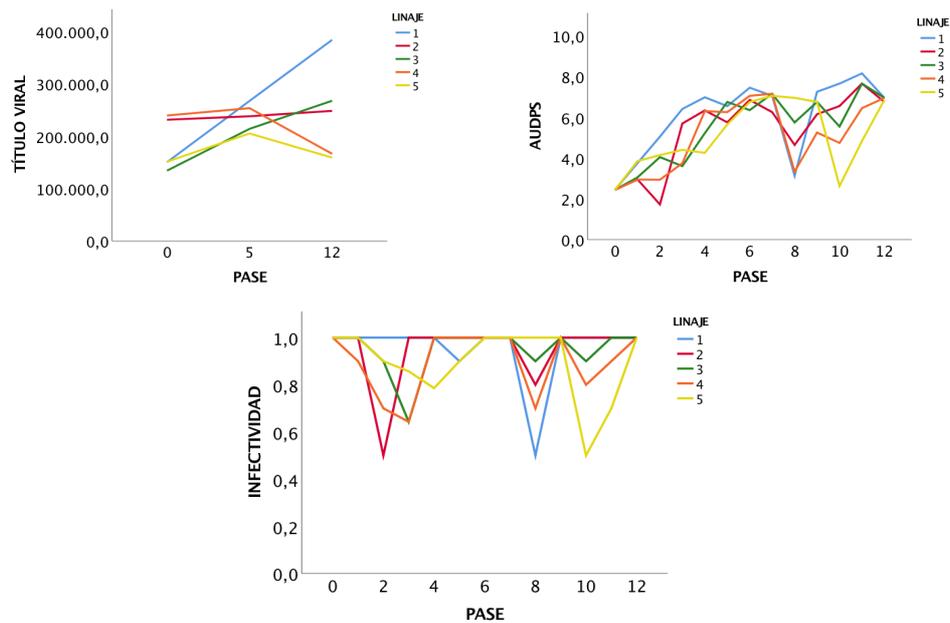


Fig. 36. Carga AUDPS, e infectividad de los linajes en *dcl2 dcl4* a lo largo de los pases.

En el mutante *dcl2 dcl4* he encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 40.907$, 12 g.l., $P < 0.001$), AUDPS ($\chi^2 = 198.212$, 12 g.l., $P < 0.001$). Ninguno de los dos factores es estadísticamente significativo en lo que concierne al título viral. Las variaciones parciales y total de la carga no son estadísticamente significativas en este genotipo.

3.1.6. Resultados evolución en *hsp90.1*

En la fig. 37 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionadas en *hsp90.1*. La infectividad del virus ancestral en este genotipo de *A. thaliana* fue del 100%, un valor que a lo largo del experimento fluctuó en diversos pases, algo que achacamos en el caso del pase 8 a los fallos técnicos del fitotrón y en el resto, posiblemente, a las características genéticas de las poblaciones durante los cuellos de botella sucesivos. Al final del experimento se recuperó por completo la infectividad ancestral.

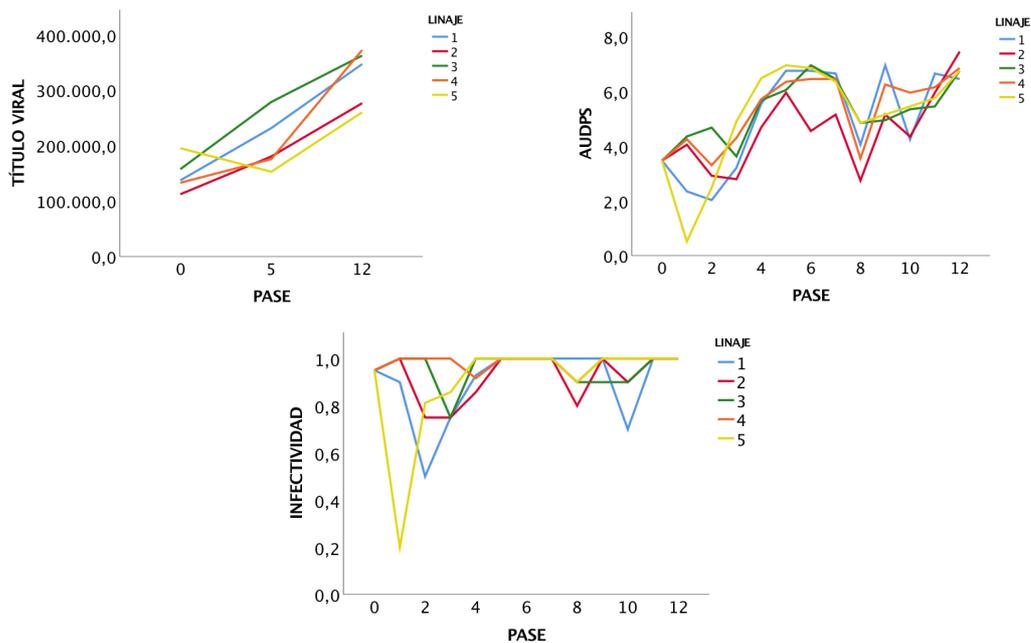


Fig. 37. Carga, AUDPS, e infectividad de los linajes en *hsp90.1* a lo largo de los pases.

En el mutante *hsp90.1* hemos encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 29.081$, 12 g.l., $P = 0.004$) y diferencias en el AUDPS tanto entre diferentes pases como entre los distintos linajes ($\chi^2 = 237.382$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 10.037$, 4 g.l., $P = 0.040$). Los dos factores son estadísticamente significativos también en lo que concierne al título viral ($\chi^2 = 86.782$, 2 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 11.604$, 4 g.l., $P = 0.021$). La carga aumenta durante el experimento de evolución, siendo significativo el aumento absoluto entre los pases 0 y el 12 ($t = -5.809$, 4 g.l., $P = 0.004$), y también entre los pases 5 y 12 ($t = -6.004$, 4 g.l., $P = 0.004$).

3.1.7. Resultados evolución en *i4g2*

En la fig. 38 se muestran los datos de infectividad para cada linaje y pase de las poblaciones de virus inoculadas en el genotipo *i4g2*. El porcentaje de infección preliminar fue del 85% de las plantas para las cinco poblaciones de virus, siendo en el primer pase entre el 40% y el 70% y no llegando a alcanzar porcentajes más elevados que el preliminar hasta el fin de experimento. Hay que tener en cuenta que este es el genotipo más resistente, por lo que los cuellos de botella son se esperan más fuertes que en el resto de genotipos, ya que el ambiente es más restrictivo para el virus. Hay dos pases, el pase 2 y el pase 9, en los que este efecto parece bastante crítico, aunque es muy probable que en el caso del pase 9 esto se haya

debido más al efecto ambiental causado por los fallos en el fitotrón, independientemente de que el cuello de botella haya influido en el resultado.

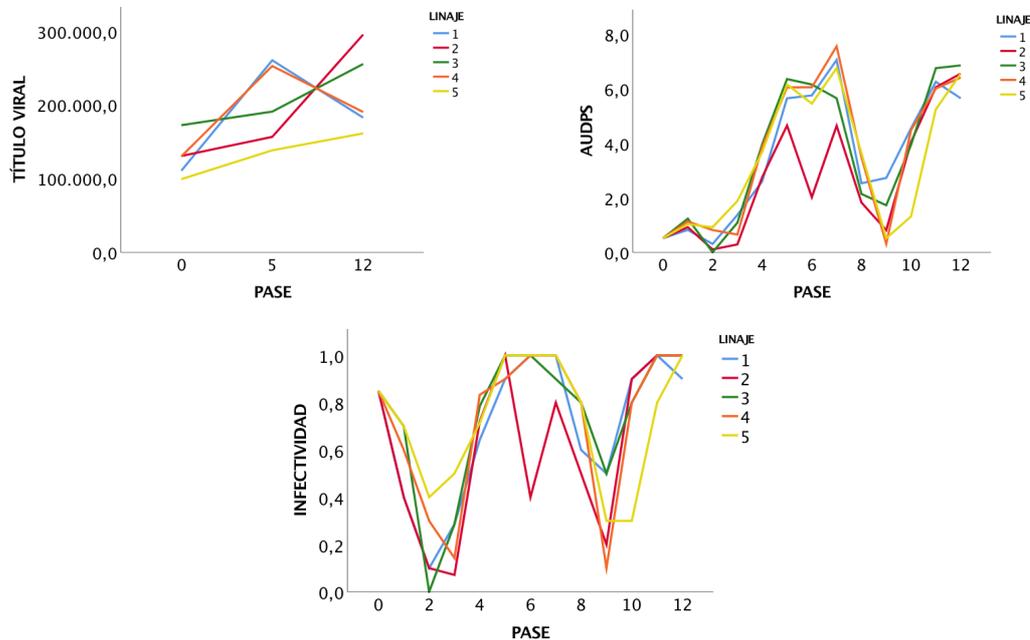


Fig. 38. Carga AUDPS, e infectividad de los linajes en *i4g2* a lo largo de los pases.

En el mutante *i4g2* hemos encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 303.209$, 12 g.l., $P < 0.001$) y diferencias en el AUDPS tanto entre diferentes pases como entre los cinco distintos linajes ($\chi^2 = 682.508$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 15.285$, 4 g.l., $P = 0.004$). Además, el factor pase también es estadísticamente significativo para la carga ($\chi^2 = 18.067$, 2 g.l., $P < 0.001$). La carga aumenta para este genotipo durante el experimento de evolución, siendo significativo el aumento absoluto entre los pases 0 y el 12 ($t = -4.531$, 4 g.l., $P = 0.011$). No hay cambios significativos entre pases intermedios.

3.1.8. Resultados evolución en *dbp2*

En la fig. 39 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionados en el genotipo *dbp2*. El porcentaje de infección del virus ancestral en este genotipo fue del 80%, y salvo en el caso del linaje 5, que parece sufrir más cambios en este carácter fenotípico a lo largo del experimento, en todos los linajes la infectividad se mantiene igual o superado a partir del pase 5. No obstante, en el linaje 5 también se alcanza el 100% de infección al final del experimento a pesar de los cambios mencionados.

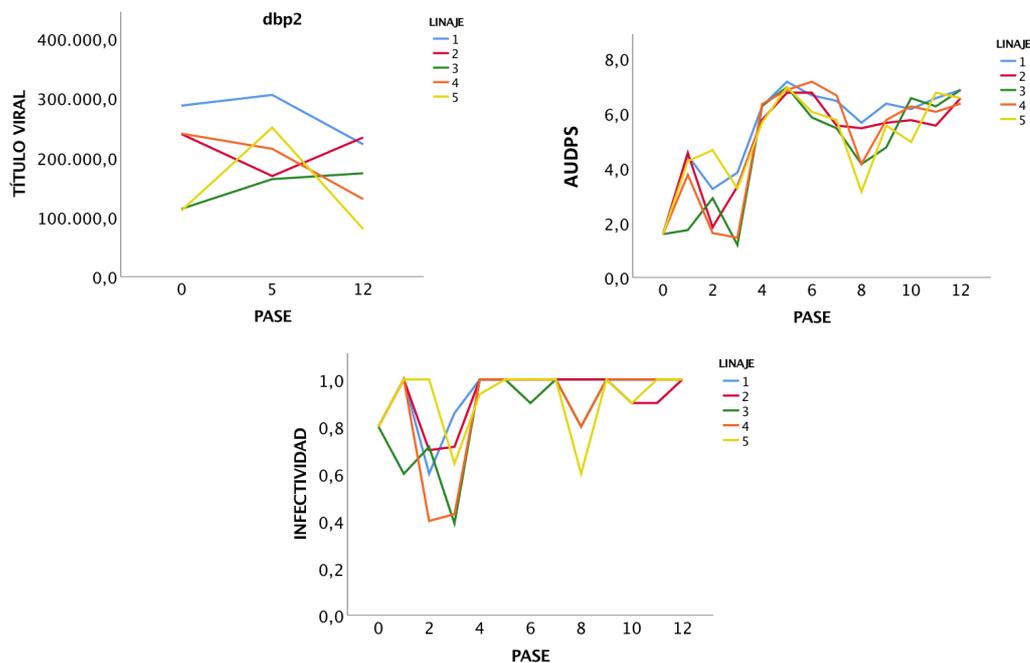


Fig. 39. Carga AUDPS, e infectividad de los linajes en *dbp2* a lo largo de los pases.

En el mutante *dbp2* hemos encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 123.173$, 12 g.l., $P < 0.001$) y diferencias en el AUDPS tanto entre diferentes pases como entre los cinco distintos linajes ($\chi^2 = 512.563$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 12.615$, 4 g.l., $P = 0.013$). En este caso, el factor en el que las diferencias entre los cinco linajes son estadísticamente significativas para la carga es el linaje ($\chi^2 = 18.851$, 4 g.l., $P = 0.001$). No hay cambios estadísticamente significativos parciales o absolutos en el título viral para este mutante.

3.1.9. Resultados evolución en *p58^{ipk}*

En la fig. 40 se muestran los datos de infectividad para cada pase de los linajes de TuMV evolucionados en el genotipo mutante *p58^{ipk}*. Todos los linajes parecen estabilizarse a partir del pase 4, recuperando la infectividad característica del virus ancestral en este genotipo (100%), sin embargo, el cambio brusco ambiental a causa de los problemas en verano con los fallos del fitotrón, generó problemas en las poblaciones de virus, especialmente en el linaje 4, donde la infectividad llegó a descender a solo el 50%. Al final del experimento la infectividad de este linaje fue del 70%, y la del resto del 100%.

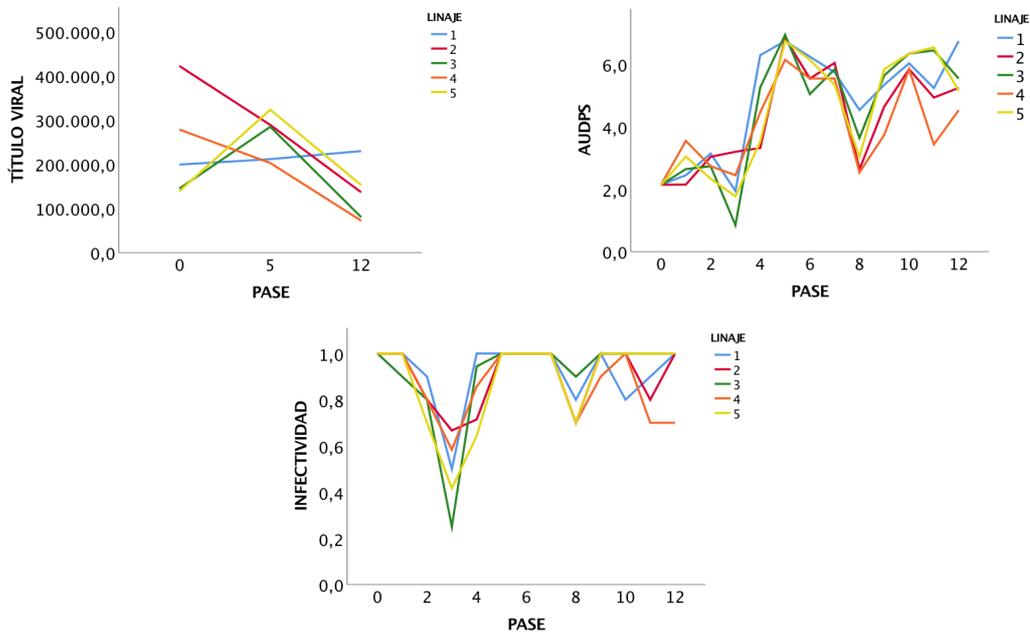


Fig. 40. Carga AUDPS, e infectividad de los linajes en $p58^{ipk}$ a lo largo de los pases.

En este genotipo mutante hemos encontrado diferencias entre pases para la infectividad ($\chi^2 = 209.504$, 12 g.l., $P < 0.001$) y diferencias en el AUDPS tanto entre diferentes pases como entre los cinco distintos linajes ($\chi^2 = 434.995$, 12 g.l., $P < 0.001$; $\chi^2 = 12.067$, 4 g.l., $P = 0.017$). En este caso, el factor en el que las diferencias entre los cinco linajes son estadísticamente significativas para la carga es el pase ($\chi^2 = 11.423$, 2 g.l., $P = 0.003$). La carga disminuye durante el experimento de evolución, siendo significativa esta disminución entre los pases 5 y el 12 ($t = 3.321$; 4 g.l.; $P = 0.029$).

3.2. Síntesis de los datos de infectividad y AUDPS

La tendencia es en todos los casos al alza, aunque en algunos casos es más estable o se estabiliza a partir de cierto pase (*jin1* y *cpr5-2*). En los genotipos más resistentes a la infección del virus se aprecia una caída considerable de este rasgo fenotípico en los primeros pases del experimento (*i4g2*, *eds8-1*, *p58^{ipk}*, *hsp90.1* y *cpr5-2*) llegando incluso a infectividad nula en ciertos casos y a la extinción del linaje 2 en el caso de *cpr5-2*.

Todos los linajes excepto *cpr5-2* y *jin1* tienen una caída que es más o menos acusada, dependiendo del linaje y genotipo del huésped en el que realizamos el experimento, de la infectividad entorno al pase 8. Como

explicaba, achacamos esta caída al problema ambiental generado por los fallos en el fitotrón en verano en las fechas en que, o bien había plantas ya inoculadas, o bien plantas que se iban a inocular del pase siguiente.

Existen por tanto diferencias significativas entre genotipos ($\chi^2 = 129.337$, 8 g.l., $P < 0.001$) y también entre linajes evolucionados en un mismo genotipo ($\chi^2 = 15.541$, 8 g.l., $P = 0.004$) en sus dinámicas evolutivas para este carácter.

Otro dato interesante que hemos comprobado también es la relación entre infectividades ancestrales y evolucionadas (fig. 41), ya que de ser significativa la regresión, las diferencias en este rasgo estarían conservadas tras la evolución entre genotipos; sin embargo en este caso el ajuste del modelo no es significativo, lo que indica que tras la evolución no hay diferencias significativas en la infectividad debido a la adaptación a los respectivos huéspedes diferentes ($t = -1,093$, 44 g.l., $P = 0.281$).

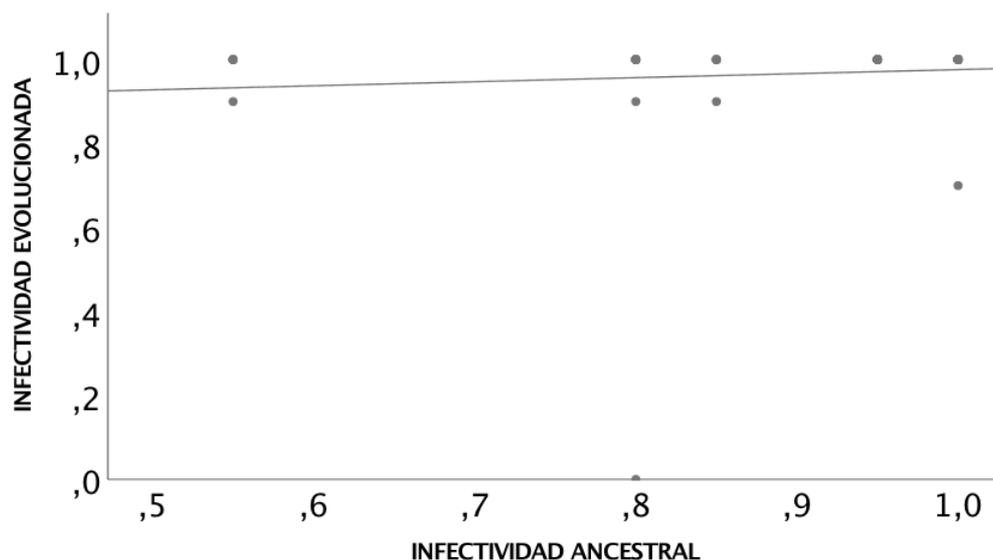


Fig. 41. Regresión de las infectividades ancestral y evolucionada para los linajes de TuMV.

El problema ambiental del que hablaba para el carácter de infectividad no parece reflejarse tanto en *AUDPS*, o al menos no de forma tan acusada, y en ningún caso aparece en los genotipos *cpr5-2* y *jin1*, como tampoco aparecía en la infectividad.

La *AUDPS* aumenta con el tiempo de forma consistente en todos los genotipos y linajes ($\chi^2 = 60.115$, 1 g.l., $P < 0.001$). Existen diferencias significativas en las dinámicas evolutivas entre genotipos ($\chi^2 = 164.206$, 8 g.l., $P < 0.001$) y también entre linajes independientes evolucionados en un mismo genotipo ($\chi^2 = 57.888$, 36 g.l., $P = 0.012$).

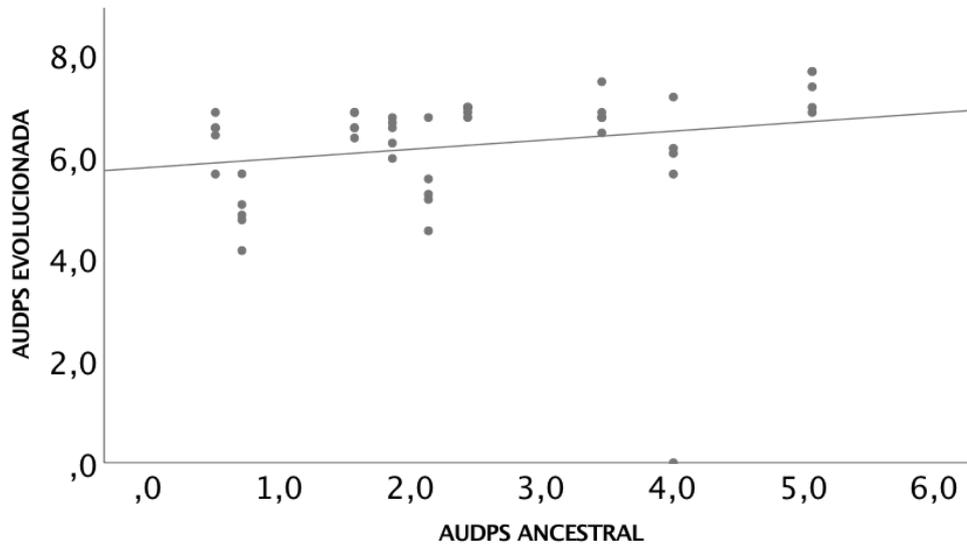


Fig. 42. Regresión del *AUDPS* evolucionada y ancestral de los linajes de TuMV.

Como se observa en la fig. 42, las diferencias ancestrales para las *AUDPS* han sido eliminadas en el proceso evolutivo (Travisano et al., 1995) y por tanto las poblaciones evolucionadas son igualmente virulentas entre sí (95% CI de la pendiente [-0.085, 0.440]), por lo que estas diferencias, existentes en las poblaciones ancestrales, han desaparecido debido a la adaptación de los linajes a sus huéspedes de evolución (pendiente = $0.178 \pm 0.130 \neq 1.0$ ($t_{43} = -6,321$, $P < 0.001$)).

3.3. Estimación de las tasas de evolución para infectividad y *AUDPS*

Las tasas de evolución para *AUDPS* e infectividad las he calculado utilizando el modelo ARIMA(1,0,0) mencionado en apartado 6.4 de Material y Métodos.

Y a continuación en la Tabla 5 y la fig. 43 se muestran los valores de m (la tasa de evolución fenotípica), para cada uno de los dos rasgos fenotípicos evaluados como variable respuesta dependiente:

Tabla 5. Tasas de evolución, m , para infectividad (I) y AUDPS para cada linaje en su genotipo huésped. Los errores corresponden con ± 1 error estándar de la media.		
<i>cpr5-2</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.046 \pm 0.020	0.411 \pm 0.116
L2	-0.053 \pm 0.019	-0.228 \pm 0.071
L3	0.041 \pm 0.024	0.351 \pm 0.181
L4	0.045 \pm 0.014	0.338 \pm 0.145
L5	0.054 \pm 0.024	0.470 \pm 0.137
<i>dbp2</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.018 \pm 0.070	0.355 \pm 0.122
L2	0.013 \pm 0.009	0.321 \pm 0.122
L3	0.033 \pm 0.010	0.410 \pm 0.138
L4	0.027 \pm 0.017	0.373 \pm 0.162
L5	0.006 \pm 0.009	0.252 \pm 0.114
<i>dcl2 dcl4</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	-0.005 \pm 0.010	0.306 \pm 0.130
L2	-0.010 \pm 0.009	0.368 \pm 0.112
L3	0.005 \pm 0.008	0.368 \pm 0.086
L4	0,005 \pm 0.011	0,302 \pm 0.144
L5	-0.011 \pm 0.014	0.248 \pm 0.149
<i>eds8-1</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.056 \pm 0.024	0.331 \pm 0.085
L2	0.045 \pm 0.015	0.262 \pm 0.072
L3	0.036 \pm 0.018	0.322 \pm 0.085
L4	0.024 \pm 0.013	0.253 \pm 0.081
L5	0.043 \pm 0.016	0.301 \pm 0.049
<i>hsp90.1</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.013 \pm 0.013	0.304 \pm 0.129
L2	0.008 \pm 0.008	0.230 \pm 0.093
L3	0.001 \pm 0.006	0.194 \pm 0.095
L4	0.001 \pm 0.002	0.233 \pm 0.083
L5	0.031 \pm 0.013	0.290 \pm 0.170
	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.030 \pm 0.028	0.437 \pm 0.176
L2	0.037 \pm 0.028	0.431 \pm 0.141
L3	0.029 \pm 0.029	0.468 \pm 0.218
L4	0.025 \pm 0.030	0.429 \pm 0.227
L5	0.006 \pm 0.031	0.380 \pm 0.246
<i>jin1</i>	$m (I)$	$m (AUDPS)$
L1	0.009 \pm 0.066	0.242 \pm 0.075
L2	0.005 \pm 0.002	0.203 \pm 0.024
L3	0.001 \pm 0.001	0.172 \pm 0.023

L4	0.004 ± 0.002	0.234 ± 0.028
L5	0.003 ± 0.001	0.227 ± 0.020
<i>npr1-1</i>	m (I)	m (AUDPS)
L1	0.012 ± 0.015	0.337 ± 0.096
L2	0.021 ± 0.014	0.399 ± 0.105
L3	0.011 ± 0.018	0.401 ± 0.098
L4	0.008 ± 0.017	0.388 ± 0.152
L5	0.013 ± 0.014	0.372 ± 0.109
<i>p58^{ipk}</i>	m (I)	m (AUDPS)
L1	0.001 ± 0.011	0.335 ± 0.128
L2	0.004 ± 0.012	0.253 ± 0.113
L3	0.019 ± 0.016	0.349 ± 0.117
L4	-0.120 ± 0.014	0.146 ± 0.119
L5	0.014 ± 0.019	0.328 ± 0.125

Estas tasas de evolución para infectividad y AUDPS no son independientes, ya que correlacionan positivamente ($r = 0.620$, 45 g.l., $P < 0.001$) tal y como se muestra en la fig. 43. Esto se debe a que la infectividad se evalúa a partir del punto final de la curva de síntomas.

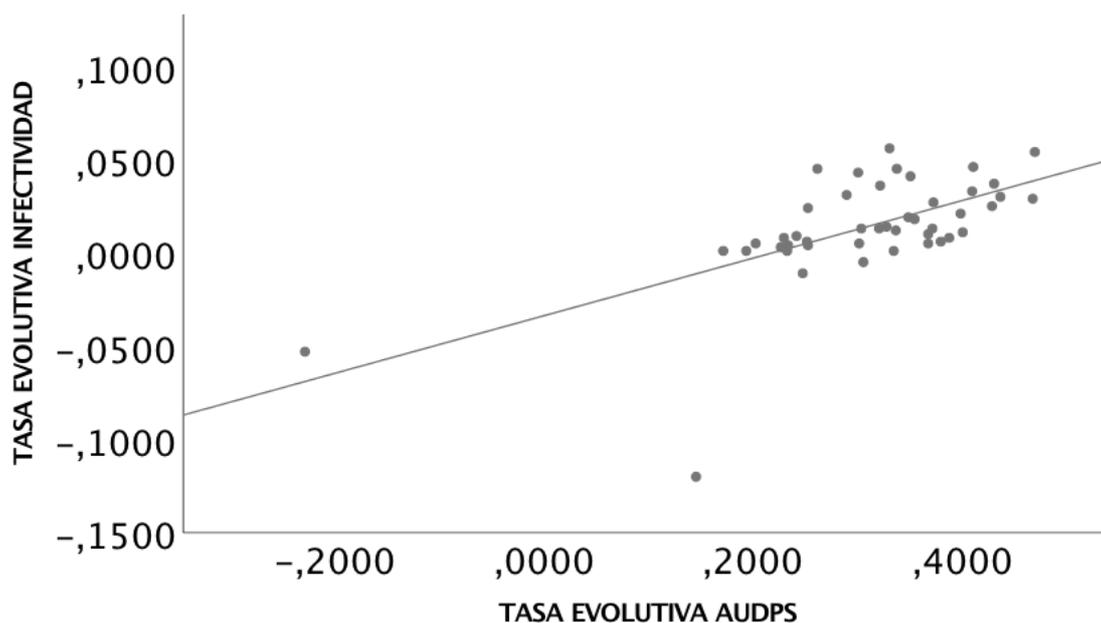


Fig. 43. Correlación entre las tasas de evolución para infectividad y AUDPS. TE en las etiquetas de los ejes refiere a tasa de evolución.

Para las AUDPS, encontramos que existen diferencias significativas en las tasas de evolución de los linajes virales (Welch $F_{8,15} = 16.061$, $P < 0.001$) y que dichas tasas disminuyen con la susceptibilidad a la infección (fig. 44A: pendiente = $-0.020 \pm 0.006 \neq 0.0$; $t_{43} = 3.292$, $P = 0.001$): es decir, a mayor susceptibilidad de la planta huésped, menor es la tasa de evolución del

virus, por ejemplo, los linajes evolucionados en *jin1* se adaptan más lentamente que los evolucionados en *i4g2*, ya que el primero es el huésped más permisivo (hipersusceptible) y el segundo el más restrictivo (hiposusceptible).

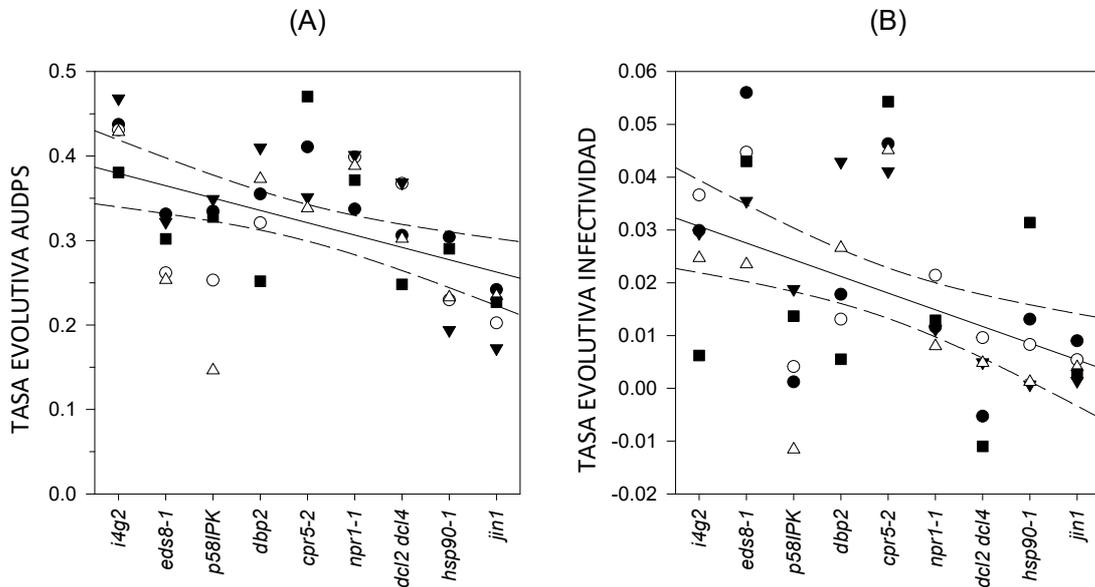


Fig. 44. Tasas de evolución de los diferentes linajes para AUDPS (A) e infectividad (B).

En el caso de las tasas de evolución estimadas para la infectividad (fig. 44B), también existen diferencias significativas entre genotipos (Welch $F_{8,15} = 6.71$, $P = 0.001$) y además existe, como ya hemos comentado para la AUDPS, las tasas de adaptación son menores conforme más permisivo es el genotipo del huésped (pendiente = $-0.006 \pm 0.001 \neq 0$, $P < 0.001$).

Por otro lado, hemos realizado comparaciones entre grupos teniendo en cuenta la ruta de defensa a la que afectan los genotipos mutantes, (SA, JA o RNAi) o si se trata de factores de traducción, transcripción u otras proteínas, como las chaperonas, requeridas por el virus para completar su ciclo de infección. El resultado de estas comparaciones se resume en la fig. 45.

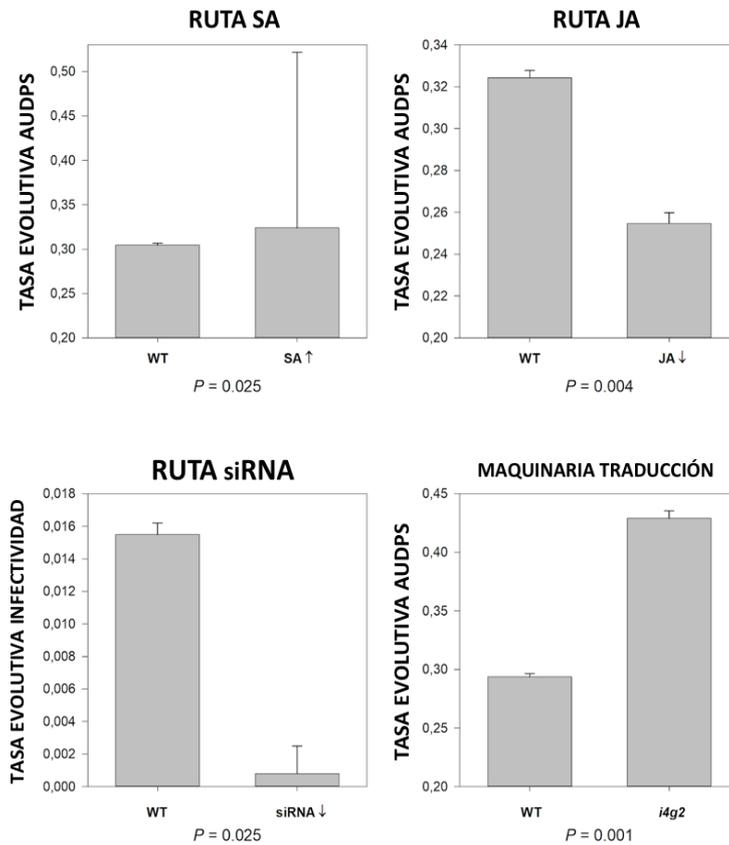


Fig. 45. Comparación de tasas de evolución entre genotipos mutantes de las rutas del SA, JA, silenciamiento y la maquinaria de traducción (prueba de Kruskal Wallis).

Las poblaciones de TuMV se adaptan más rápido a los huéspedes que imponen regímenes selectivos más restrictivos (fig. 45), ya que como podemos ver, existen diferencias significativas en al menos alguno de los caracteres de eficacia que he evaluado (*AUDPS* o infectividad, pero no para ambos). En el caso de los virus evolucionados en mutantes de la ruta del SA, la tasa de evolución de la *AUDPS* es la que muestra diferencias significativas. Tanto *npr1-1* como *cpr5-2* son genotipos hiposusceptibles a la infección del virus, por lo que es lógico esperar que los linajes virales aumenten su tasa de evolución con respecto al huésped natural para poder adaptarse. Sucede lo mismo con el mutante para la maquinaria traduccional *i4g2*. Las poblaciones de virus en este genotipo son las que evolucionan con mayor rapidez para las *AUDPS* en comparación con el genotipo silvestre de la planta.

En el otro extremo tenemos las poblaciones evolucionadas en *jin1*, cuya tasa de evolución para las *AUDPS* es significativamente menor que la del control, sugiriendo que, al tratarse de un caso de selección débil, las poblaciones del virus no precisan mejorar este carácter fenotípico con

respecto al expresado en el genotipo silvestre de la planta porque el huésped es hipersusceptible o permisivo a la infección. En esta misma categoría, cabe destacar el doble mutante de la ruta del silenciamiento *dcl2 dcl4*, que también catalogamos como hipersusceptible o menos restrictivo que las plantas silvestres. En este caso la tasa evolutiva para la infectividad es significativamente menor que la observada para plantas silvestres, lo que confirma nuestra suposición de que se trataba también de un huésped menos restrictivo. Sin embargo, las poblaciones que poseen menores tasas que el genotipo silvestre, las tienen en rasgos fenotípicos diferentes, en un caso son las *AUDPS* (poblaciones evolucionadas en *jin1*) y en el otro la infectividad (poblaciones evolucionadas en *dcl2 dcl4*), algo que podría estar relacionado con el mecanismo celular subyacente que regula cada ruta y que en el mutante, lo diferencia del control. Esto no sucede en el caso de las poblaciones cuya tasa es mayor que la del genotipo silvestre, donde son las *AUDPS* el rasgo que mejora en ambos casos (poblaciones evolucionadas en *cpr5-2* e *i4g2*), lo que podría tener que ver con que, efectivamente, la ruta del SA está necesariamente relacionada con la expresión de genes de respuesta a la infección viral (genes PR).

3.4. Evolución de la carga viral en todos los genotipos mutantes de *A. thaliana*

Sólo evaluamos la carga en tres de los pases de evolución en cada genotipo del huésped: para el virus ancestral, en un pase intermedio (5) y en el último pase (12). Con la carga no ha sido posible estimar la tasa de evolución mediante el modelo ARIMA(1,0,0) por tener más parámetros que estimar que datos. Aún así, se pueden observar diferencias en los gráficos en cada genotipo (figs. 32-40), de manera que hay algunos de ellos en los que la carga comienza aumentando en el pase 5 pero luego disminuye. Es el caso de los linajes evolucionados en *i4g2*, *dbp2*, *p58^{ipk}* y *cpr5-2*, todos ellos genotipos hiposusceptibles salvo el caso de *dbp2*, que es hipersusceptible.

Por otro lado, estarían los linajes evolucionando en un ambiente como el genotipo *eds8-1*, donde la carga desciende en el pase 5 y luego aumenta en el último pase. Es el único ejemplo de este caso. Esto podría deberse al carácter generalista de la adaptación en la población viral que ha evolucionado en este ambiente, que es restrictivo y debido a ello en la primera fase del experimento, la carga disminuye, pero la adaptación permite que, en la segunda fase, ésta vuelva a aumentar.

Para los linajes evolucionando en *jin1*, *npr1-1*, *dcl2 dcl4* y *hsp90.1* la carga aumenta durante todo el experimento, y todos los ambientes son hipersusceptibles salvo *hsp90.1*, que es más restrictivo en términos evolutivos ya que en teoría *hsp90.1* es un fondo en el que un recurso que el virus debe secuestrar para multiplicarse, no está disponible (Verchot, 2012).

Existen además efectos significativos entre genotipos ($\chi^2 = 57,670$, 8 g.l., $P = 0.000$) para este rasgo y también entre los distintos linajes en sus dinámicas evolutivas ($\chi^2 = 91,321$, 36 g.l., $P = 0.000$). Sin embargo, el efecto más acusado del modelo para este rasgo fenotípico es el del pase de evolución si comparamos entre genotipos ($\chi^2 = 240,420$, 18 g.l., $P = 0.000$).

3.5. Descripción de los cambios genotípicos en las secuencias consenso de cada linaje evolucionado

Las poblaciones de virus evolucionados a pase 12 contienen un total de 73 mutaciones fijadas, de las cuales 49 son no sinónimas. Eso supone que un 67.12% de las mutaciones en las poblaciones de virus de nuestro experimento son no sinónimas. En lo que se refiere a las sinónimas, no necesariamente tienen por qué ser neutrales (Tabla 55 de Material Suplementario).

Todos los linajes tienen al menos una mutación no sinónima en *VPg* por lo que esto parece ser importante en términos generales para la supervivencia del virus independientemente del fondo genético de la planta. Quizá la pérdida del linaje 2 en *cpr5-2* se debiese a que la población de este virus no pudo fijar ninguna mutación en *VPg* también a consecuencia de los cuellos de botella sucesivos y por tanto de la deriva genética.

En la Tabla 6 se describen número y combinación de mutaciones en el mismo gen o genes diferentes para cada linaje evolucionado. Además, también indico en qué ambiente celular evolucionaron cada uno de ellos durante los 12 pases de evolución efectuados.

Tabla 6. Número, combinación de mutaciones no sinónimas y ambiente evolutivo de los linajes.			
POBLACIÓN	Nº MUTACIONES	COMBINACIÓN MUTACIONES	AMBIENTE
cpr5 L1	1	VPg	hiposusceptible
cpr5 L3	1	VPg	“
cpr5 L4	4	CI(2)-VPg-CP	“
cpr5 L5	5	P3(2)-CI(2)-VPg	“
dbp2 L1	2	VPg(2)	hipersusceptible
dbp2 L2	3	HCPPro-VPg-CP	“
dbp2 L3	3	P3-VPg-NIb	“
dbp2 L4	3	HCPPro (2)-VPg	“
dbp2 L5	1	VPg	“
dcl2 dcl4 L1	3	P1-CI-VPg	hipersuceptible
dcl2 dcl4 L2	1	VPg	“
dcl2 dcl4 L3	3	VPg-NIaPro (2)	“
dcl2 dcl4 L4	1	VPg	“
dcl2 dcl4 L5	2	CI-VPg	“
eds8-1 L1	1	VPg	hiposusceptible
eds8-1 L2	1	VPg	“
eds8-1 L3	2	P1-VPg	“
eds8-1 L4	3	VPg(3)	“
eds8-1 L5	1	VPg	“
hsp90.1 L1	2	VPg-CP	hiposusceptible
hsp90.1 L2	1	VPg	“
hsp90.1 L3	1	VPg	“
hsp90.1 L4	2	P1-VPg	“
hsp90.1 L5	1	VPg	“
i4g2 L1	2	CI-VPg	hiposusceptible
i4g2 L2	2	VPg-CP	“
i4g2 L3	2	CI-VPg	“
i4g2 L4	2	HCPPro-VPg	“
i4g2 L5	1	VPg	“
jin1 L1	2	CI-VPg	hipersusceptible
jin1 L2	2	CI-VPg	“
jin1 L3	2	VPg-CP	“
jin1 L4	2	VPg-CP	“
jin1 L5	2	VPg-CP	“
npr1-1 L1	2	CI-VPg	hiposusceptible
npr1-1 L2	1	VPg	“
npr1-1 L3	3	P1-CI-VPg	“

npr1-1 L4	2	VPg-CP	“
npr1-1 L5	3	VPg-N1b(2)	“
P58 ^{ipk} L1	2	P1-VPg	hiposusceptible
P58 ^{ipk} L2	1	VPg	“
P58 ^{ipk} L3	1	VPg	“
P58 ^{ipk} L4	1	VPg	“
P58 ^{ipk} L5	1	VPg	“

Analizando estas mutaciones de forma más específica, gen por gen, encontramos que hay genes, como VPg o CP donde todas o la mayoría de las mutaciones fijadas son no sinónimas y otros como 6K1 y 6K2 en los que solo hay una mutación sinónima (dos y una, respectivamente). En nuestro experimento, parece que mutaciones en este gen no parecen ser importantes en términos evolutivos en ninguno de los genotipos de la planta.

En el resto de genes el porcentaje de mutaciones no sinónimas oscila entre 42.85% y el 68.42%. En primer lugar, está P1, que tiene una mayoría de mutaciones no sinónimas en diversos linajes.

En lo que concierne a las mutaciones fijadas en el supresor del silenciamiento HC-Pro, la mitad son no sinónimas y en virus evolucionados, tres de ellas en *dbp2* (dos de estas en el mismo linaje) y una en *i4g2*.

El resultado de P3 es interesante, ya que de las tres mutaciones no sinónimas que se han fijado, dos lo ha hecho en el linaje 5 evolucionado en el mutante *cpr5-2* y una en el linaje 3 de *dbp2*.

En el gen *CI* que codifica para la helicasa del virus, se fijan 13 cambios no sinónimos y seis sinónimos. Hay dos mutaciones no sinónimas compartidas y en diferentes lugares del gen en los linajes 4 y 5 evolucionados en *cpr5-2*, que expresan la ruta del SA constitutivamente. Mutar en este gen, siempre teniendo en cuenta el resto de mutaciones que han fijado estas poblaciones a lo largo del experimento, parece ser importante para adaptarse a un fondo genético de esas características o similar. El resto de mutaciones no sinónimas fijadas se corresponden con dos linajes evolucionados en el genotipo *dcl2 dcl4* (linajes 1 y 5), dos linajes evolucionados en *npr1-1* (el 1 y el 3), dos evolucionados en *jin1* (1 y 2) y dos de los evolucionados en *i4g2* (1 y 3). Cabe destacar que tanto *npr1-1* como *dcl2 dcl4* y también *jin1*, son mutantes o que afectan directamente a la ruta del SA o que de forma no

tan directa se ha encontrado en la literatura científica que pueden afectar a ésta (Baebler, 2014; Jung Kung, 2014; Shigenaga, 2016).

En *VPg* el 100% de las mutaciones son no sinónimas y como decía, no hay ningún linaje en el que no haya al menos una, lo que sugiere que *VPg* puede ser una diana importante de selección en nuestro experimento. Conviene destacar otro aspecto interesante que hemos observado, que es presencia de mutaciones compartidas, algunas de ellas por una cantidad considerable de linajes, sean o no necesariamente, evolucionados en el mismo genotipo huésped. De hecho, para este gen, parece algo común que las mutaciones sean compartidas (de las 13, 10 lo son). Las mutaciones únicas se han fijado en dos linajes de *eds8-1* (2 y 4) y en uno de *npr1-1* (el 4).

Como explicaba, es muy común que las mutaciones sean compartidas. La mutación C6219T la comparten *eds8-1* L5, *hsp90.1* L1. G6237A es compartida por nueve linajes, de los cuales dos son evolucionados en *dbp2*, dos en *i4g2* y dos en *dcl2 dcl4*. La siguiente es A6238G y hay tres linajes de *cpr5-2* que la comparten (todos excepto el 1) y dos de *npr1-1* (1 y 5), además del linaje 2 de *hsp90.1*. Las dos siguientes mutaciones se fijaron en la misma posición, sólo que la primera, A6243C, es compartida por los linajes 3 de *i4g2* L3 y *eds8-1* y la siguiente, A6243G es compartida por los linajes 1 de *dbp2*, 5 de *dcl2 dcl4* y 1 de *p58^{ipk}*. En el primer caso el cambio nucleotídico es de una A por una C y en el segundo, por una G y ambos son no sinónimos, como sucede con todas las mutaciones fijadas en *VPg*, pero el cambio de aminoácido no es el mismo, ya que en el primer caso se trataría de Asn por His, y en el segundo de Asn por Glu. Como sucede en la tercera mutación de este gen, en la siguiente, que es A6244G, hay tres linajes de *dbp2* (2, 3 y 4) que la comparten, y uno de *jin1* (el 3). La siguiente mutación compartida sucede en la posición A6247G en tres linajes evolucionados en genotipos distintos fijada en los linajes 1 de *eds8-1*, 5 de *hsp90.1* y 2 de *p58^{ipk}*. Las tres últimas mutaciones en este gen son TA6252C, G6253A y A6261G; siendo la primera de ellas compartida por dos linajes de *i4g2* (1 y 4), linaje 1 de *dcl2 dcl4* y 3 de *p58^{ipk}*, la segunda por todos los linajes de *jin1* salvo el 3 y la tercera por dos de *hsp90.1* (3 y 4), linaje 1 de *cpr5-2*, 3 de *npr1-1*, 4 de *eds8-1* y 5 de *p58^{ipk}*.

NlaPro tiene dos mutaciones fijadas no sinónimas únicamente por el mismo linaje evolucionado en *dcl2 dcl4*, el 3.

Nlb tiene tres cambios fijados no sinónimos, dos de ellos diferentes, pero en el mismo linaje de *npr1-1*, el 5, y otro en el linaje 3 evolucionado *dbp2*.

En el gen *CP* encontramos seis mutaciones fijadas, todas ellas no sinónimas, una compartida por tres linajes evolucionados en *jin1* (3, 4 y 5) y la otra por cinco linajes evolucionados en genotipos diversos: el 4 de *npr1-1*, el 2 de *i4g2*, el 4 de *cpr5-2*, el 2 de *dbp2* y el 1 de *hsp90.1*.

Respecto a las mutaciones compartidas por linajes evolucionados en el mismo genotipo del huésped, son claros ejemplos de convergencia evolutiva, es decir, mismas soluciones al mismo problema evolutivo. Éstas abundan en VPg (factor de virulencia), pero también existen en otros genes. En la Tabla 7 se especifican todas ellas.

Tabla 7. Mutaciones compartidas por linajes evolucionados en el mismo mutante.		
GEN	LINAJES	TIPO DE CAMBIO
HC-Pro	jin1 L4 y L5	sinónimo
P3	jin1 L4 y L5	sinónimo
CI	cpr5-2 L4 y L5	no sinónimo
CI	cpr5-2 L4 y L5	no sinónimo
CI	i4g2 L1 y L4	sinónimo
VPg	dbp2 L1 y L5	no sinónimo
	i4g2 L2 y L5 dcl2 dcl4 L2 y L3	
VPg	cpr 5-2 L3, L4 y L5 npr 1-1 L1 y L6	no sinónimo
VPg	dbp2 L2, L3 y L4	no sinónimo
VPg	i4g2 L1 y L4	no sinónimo
VPg	hsp 90.1 L3 y L4	no sinónimo
Nlb	eds 8-1 L3 y L5	sinónimo
CP	jin1 L3, L4 y L5	no sinónimo

4. Matriz de infección

Como explicaba en anteriores capítulos, uno de los objetivos de esta tesis es estudiar la generalidad/especificidad de los linajes evolucionados. Para ello diseñamos una matriz de infección que consiste en evaluar cada uno de los 44 linajes evolucionados con cada uno de los nueve huéspedes, y comprobar su capacidad de desencadenar la patogénesis en cada uno de

ellos. En la medida en que esto suceda con todos los huéspedes, sólo suceda con uno de ellos o un resultado intermedio, valoraremos esta cualidad de las poblaciones virales como generalismo o especialismo.

Además, si la matriz de infección es anidada significativamente, deduciremos que existen poblaciones virales que infectarán a todos los genotipos de plantas, otras que sólo serán capaces de infectar a su genotipo huésped de partida (aquel en el que evolucionaron durante los 12 pases), y otras que infectan únicamente a algunos huéspedes, incluido el suyo local. Así mismo, de la estructura de la matriz de infección, desde el punto de vista de los huéspedes, tendremos huéspedes infectados por todas las poblaciones virales, hipersusceptibles, o casi todos, y otros que sólo lo serán por la población adaptada a ellos en el transcurso del experimento de evolución, hiperresistentes.

A continuación, se presentan los datos que generamos para construir la matriz de infección. Se ha procedido como se describe en el apartado 7 de Material y Métodos, tomando datos de plantas infectadas desde los 4 dpi hasta los 12 dpi, tal y como se determinó para el experimento de evolución. Una vez transcurridos los 12 dpi, se anotó el porcentaje de infección y la severidad o intensidad de síntomas para cada planta para posteriormente calcular la media por linaje y genotipo.

Empezando con *cpr5-2*, los cuatro linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 10.377$, 3 g.l., $P = 0.016$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 267.532$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 1987.472$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 46 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cuatro linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

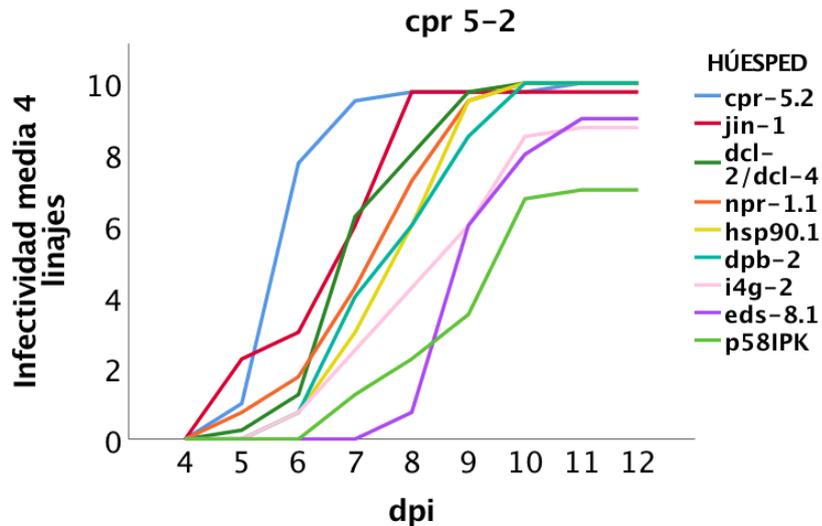


Fig. 46. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *cpr5-2* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en el huésped *dbp2*, los 5 linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 33.281$, 4 g.l., $P < 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 243.382$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2682.144$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 47 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

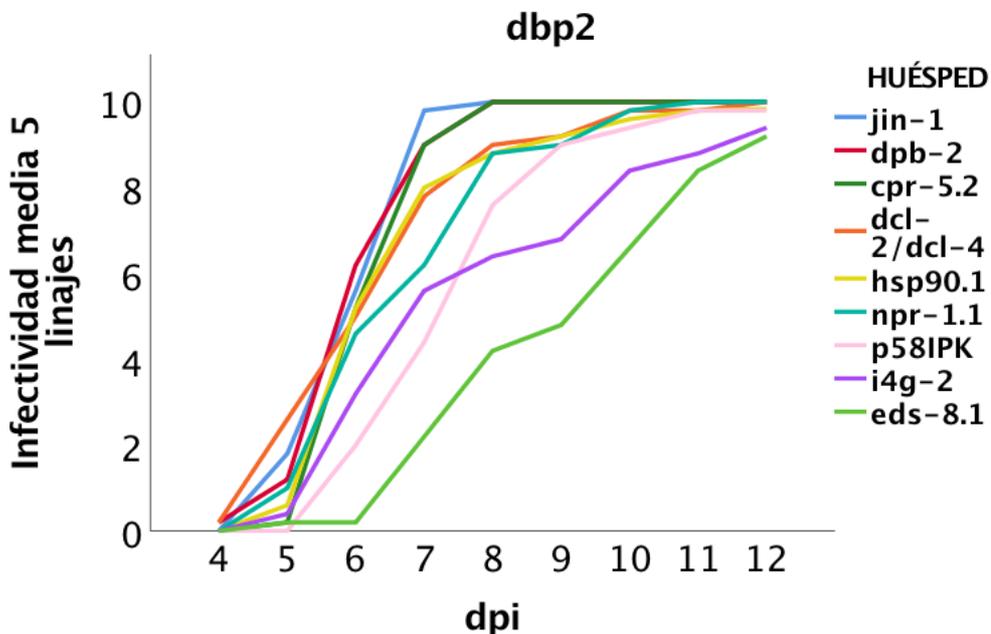


Fig. 47. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *dbp2* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *dcl2 dcl4*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 17.791$, 4 g.l., $P = 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 243.382$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de

los dpi ($\chi^2 = 2682.144$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 48 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

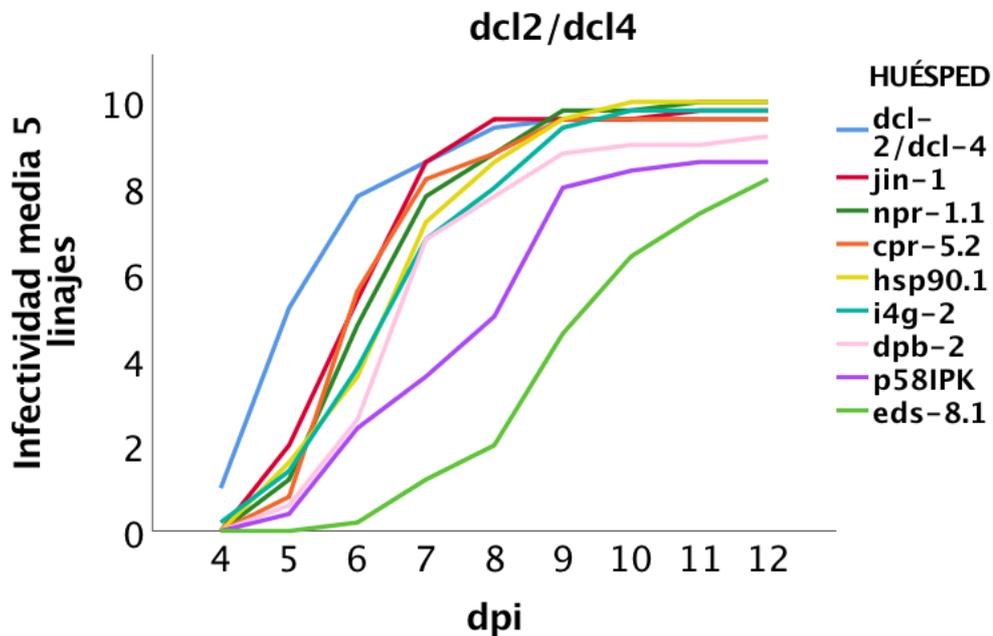


Fig. 48. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *dcl2 dcl4* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *eds8-1*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 37.030$, 4 g.l., $P < 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 181.857$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2544.011$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 49 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

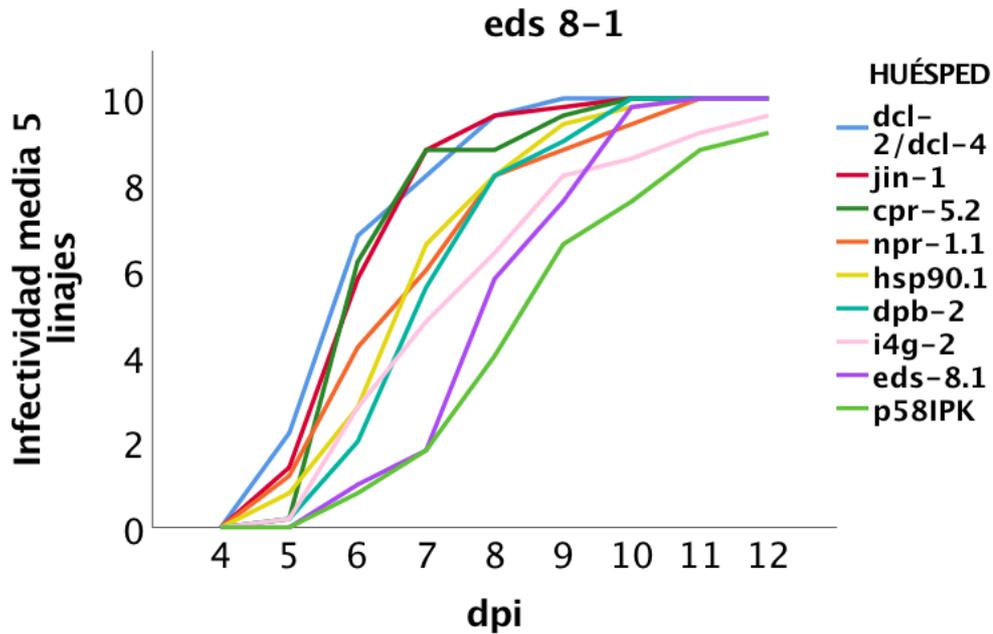


Fig. 49. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *eds8-1* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *hsp90-1*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 34.307$, 4 g.l., $P < 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 253.139$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2483.285$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 50 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

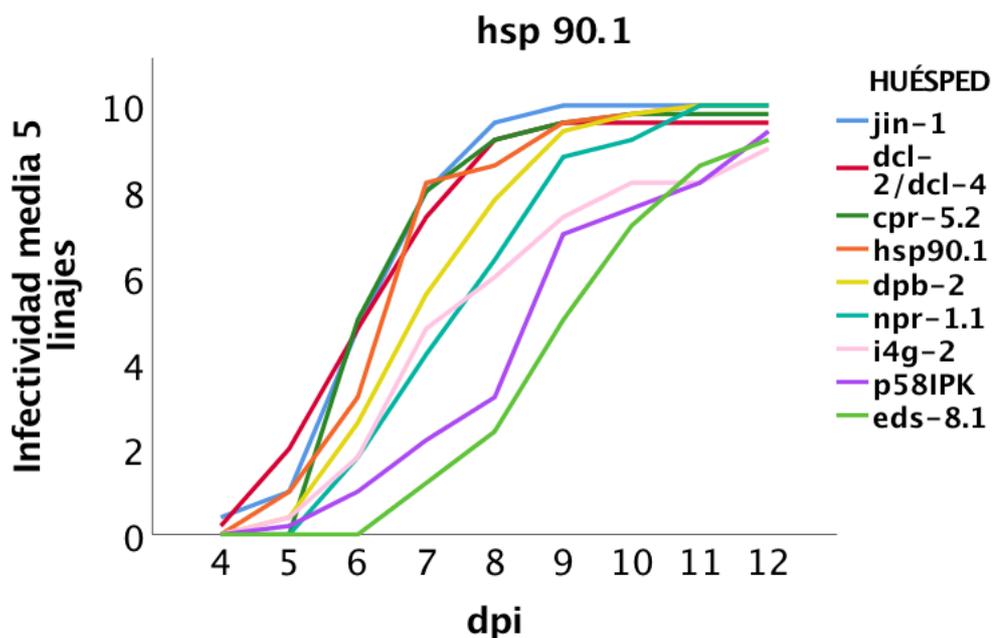


Fig. 50. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *hsp90-1* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *i4g2*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 11.384$, 4 g.l., $P = 0.023$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 284.198$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2184.976$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 51 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

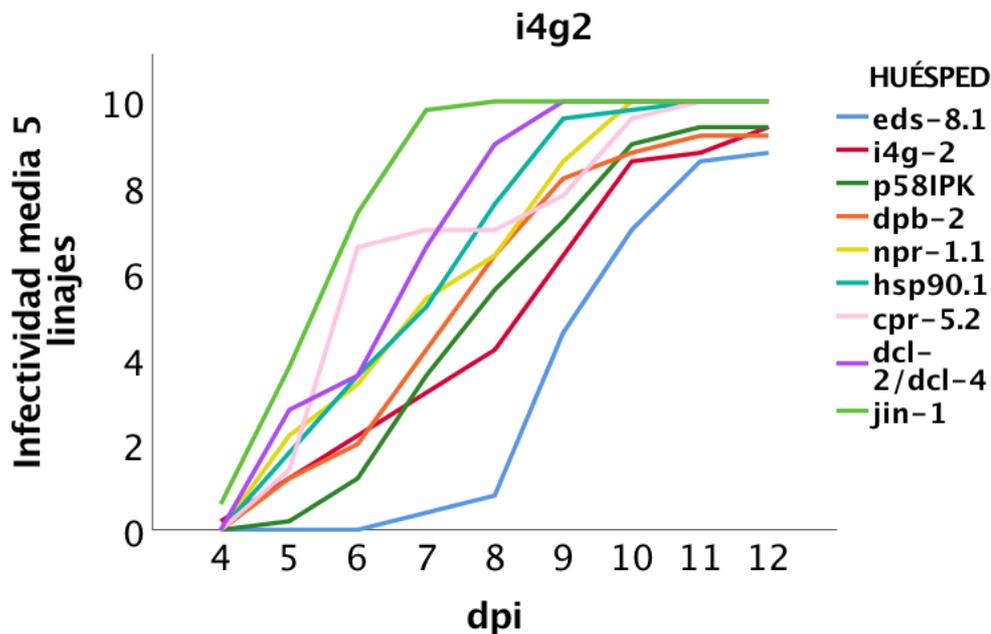


Fig. 51. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *i4g2* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *jin1*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 32.420$, 4 g.l., $P < 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 234.672$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 1672.337$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 52 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

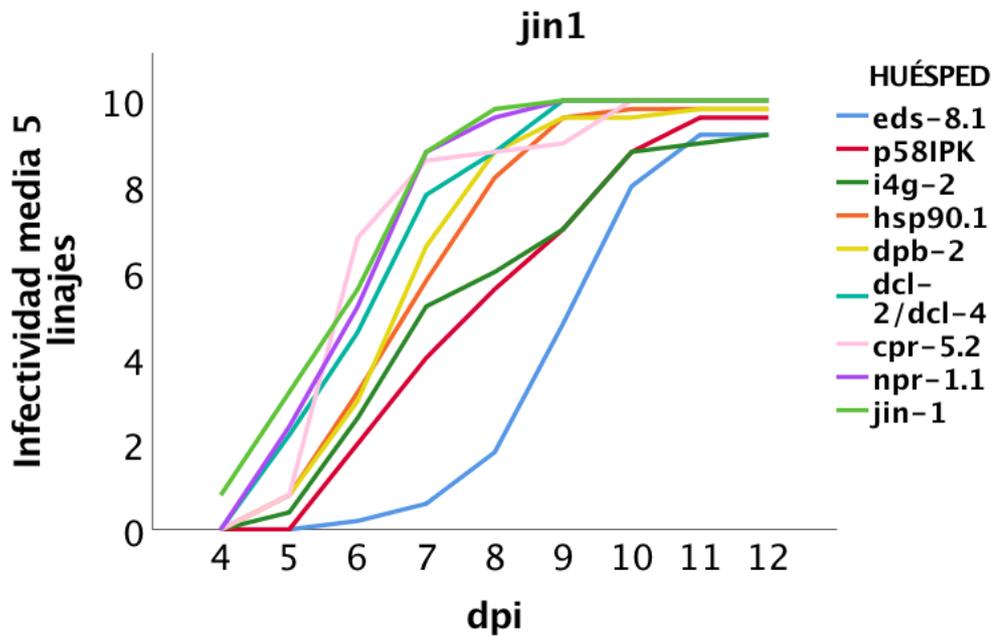


Fig. 52. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *jin1* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *npr1-1*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 37.697$, 4 g.l., $P < 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 291.446$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2592.589$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 53 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

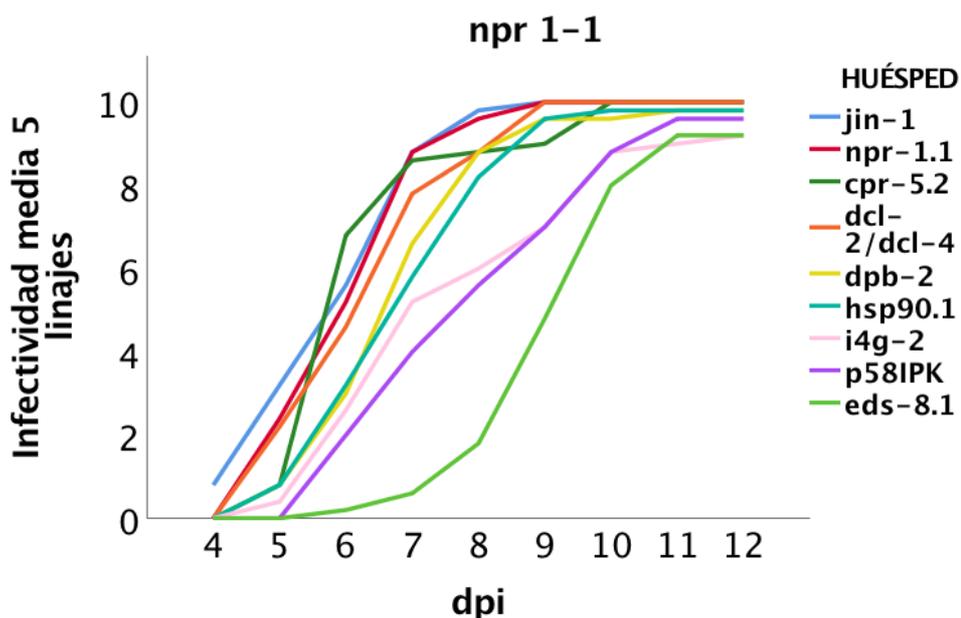


Fig. 53. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *npr1-1* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

Para los linajes evolucionados en *p58^{ipk}*, los cinco linajes son diferentes en cuanto a infectividad ($\chi^2 = 18.765$, 4 g.l., $P = 0.001$) en cada uno de los nueve huéspedes de la matriz ($\chi^2 = 175,326$, 8 g.l., $P < 0.001$) a lo largo de los dpi ($\chi^2 = 2769.183$, 8 g.l., $P < 0.001$). En la fig. 54 se muestran las dinámicas de infectividad media de cada uno de estos cinco linajes en los nueve huéspedes de la matriz.

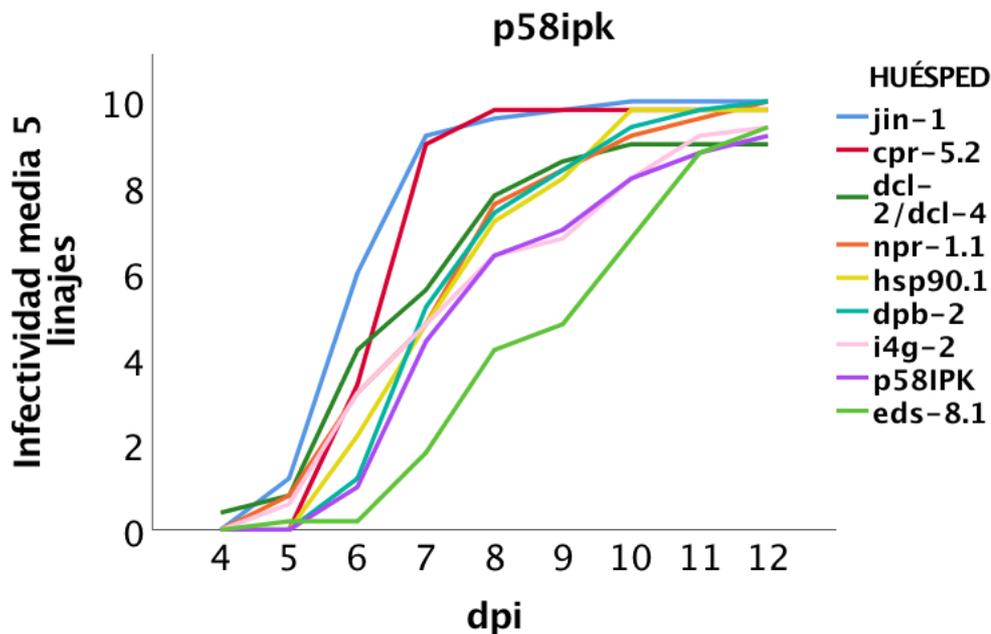


Fig. 54. Infectividad media de los linajes evolucionados en el huésped *p58^{ipk}* medida en cada uno de los nueve genotipos huésped.

4.1. Tiempos de supervivencia de los linajes evolucionados en cada mutante: regresión Kaplan-Meier

Hemos analizado el tiempo de aparición de síntomas de las plantas en cada uno de los genotipos mutantes de inoculados con cada uno de los 44 linajes evolucionados mediante el estimador de Kaplan-Meier, mostrando las correspondientes representaciones gráficas de supervivencia y comparándolas entre sí mediante el análisis de supervivencia disponible en SPSS para evaluar si existen diferencias significativas entre huéspedes para cada linaje. Estos tiempos de supervivencia serán los que posteriormente utilizemos para generar la matriz de infección y poder calcular la Temperatura de la matriz, así como el grado de anidamiento y/o modularidad y si éstos son estadísticamente significativos, usando el BITMANTEST.

4.1.1. Linajes evolucionados en *cpr5-2*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cuatro linajes evolucionados en este genotipo mutante en cada uno de los nueve huéspedes ($P < 0.001$). En la fig. 55 muestran las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 para los linajes L1, L3, L4 y L5 son 53.987, 84.307, 33.306 y 81.086 respectivamente (en todos los casos los g.l. fueron 8).

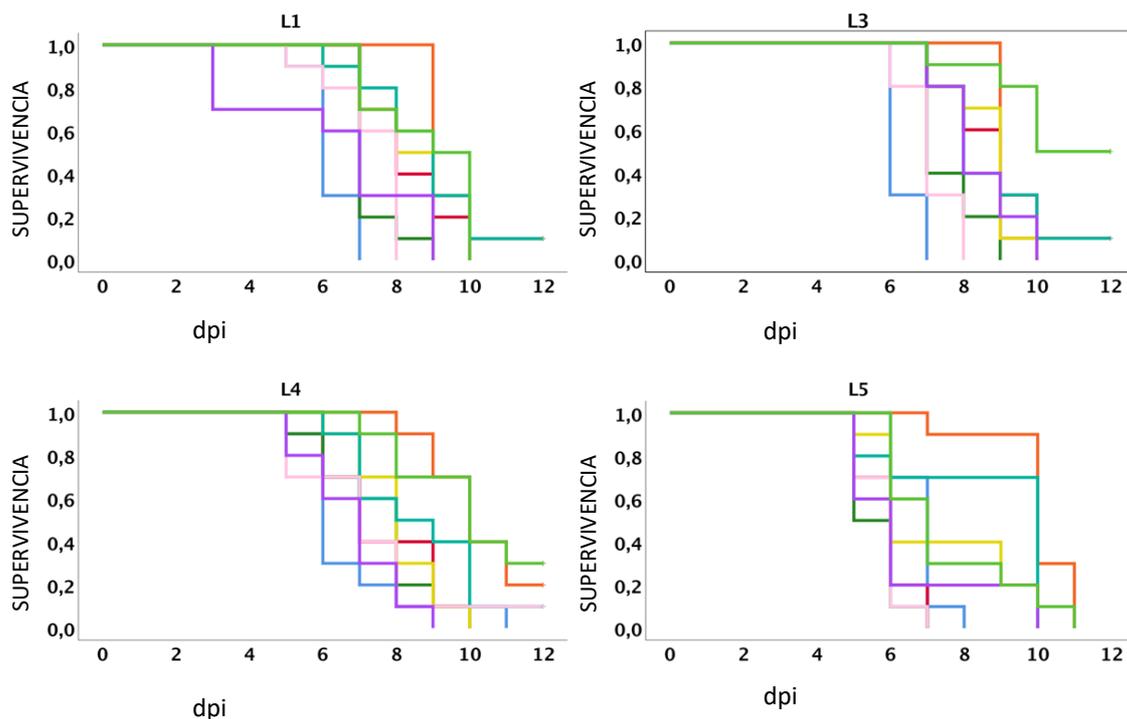


Fig. 55. Curvas de supervivencia para los linajes de *cpr 5-2* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.2. Linajes evolucionados en *dbp2*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes. En la fig. 56 muestran las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 y sus significaciones son: $\chi^2 = 33.658$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 35.497$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 24.213$, $P = 0.002$; $\chi^2 = 31.449$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 46.758$, $P < 0.001$, respectivamente.

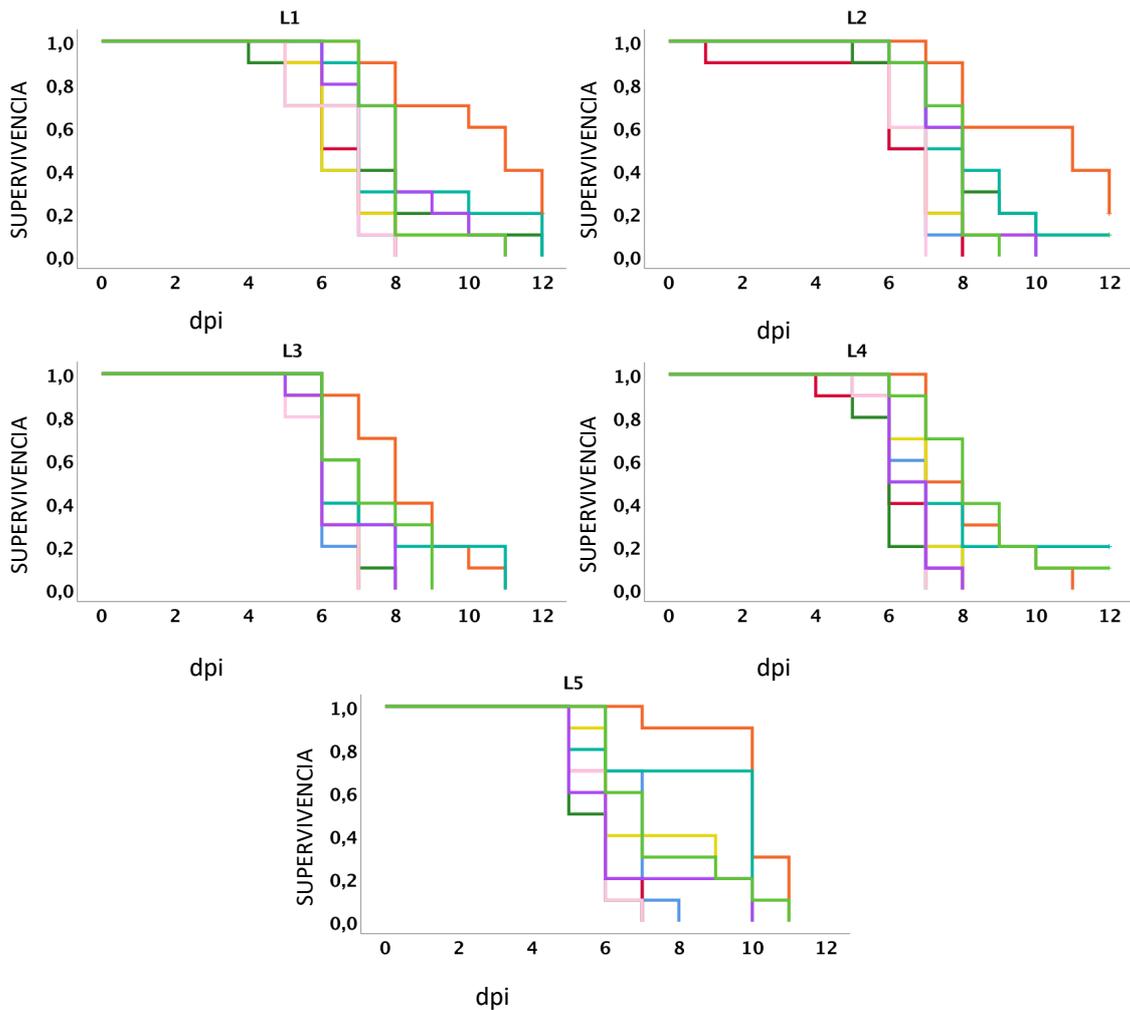


Fig. 56. Curvas de supervivencia para los linajes de *dbp2* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.3. Linajes evolucionados en *dcl2 dcl4*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes. En la fig. 57 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 y sus significaciones son: $\chi^2 = 25.665$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 58.366$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 64.904$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 33.561$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 59.285$, $P < 0.001$, respectivamente.

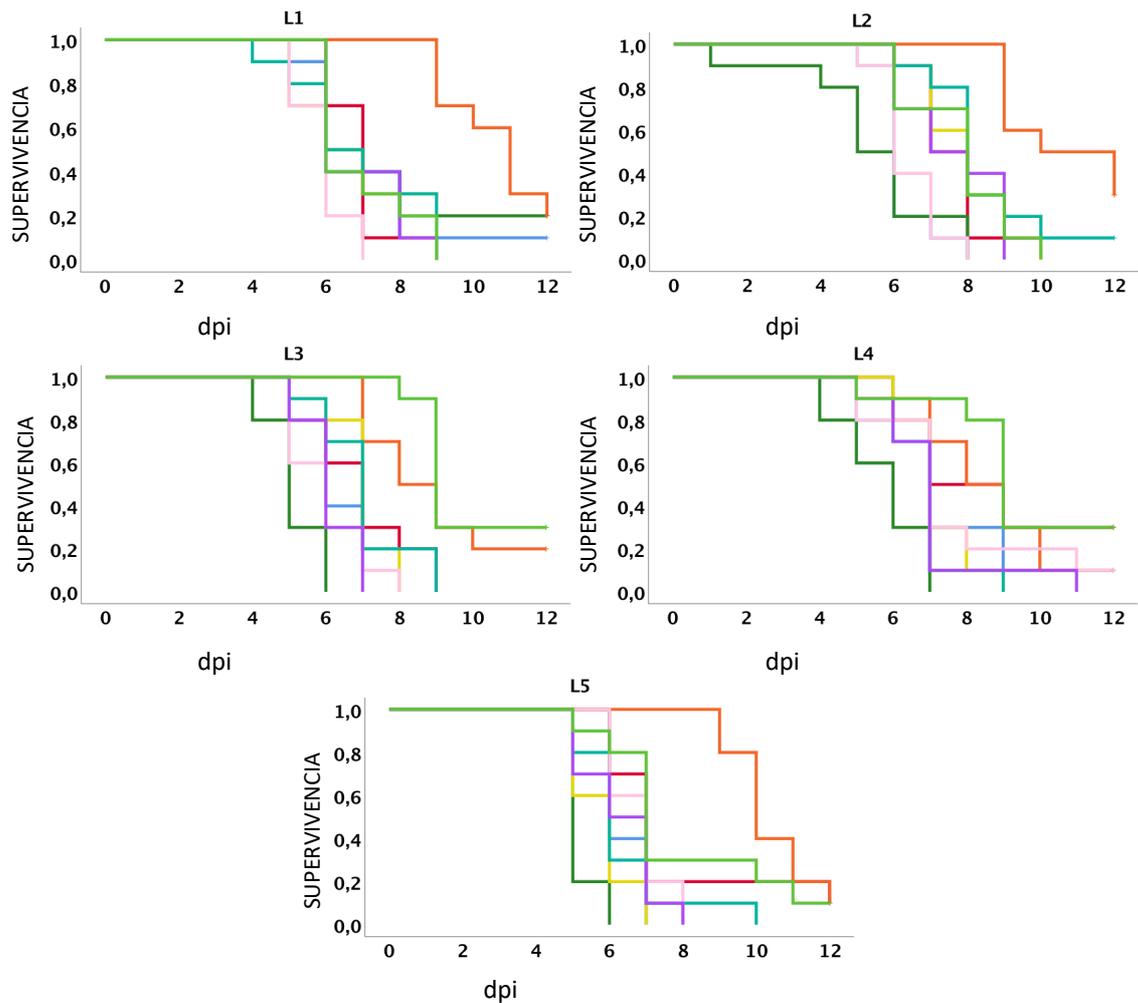


Fig. 57. Curvas de supervivencia para los linajes de *dcl2 dcl4* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.4. Linajes evolucionados en *eds8-1*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes de este mutante en cada uno de los nueve huéspedes. En la fig. 58 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 y sus significaciones son: $\chi^2 = 67.002$, $P < 0.001$, $\chi^2 = 47.900$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 26.994$, $P = 0.001$; $\chi^2 = 46.591$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 34.406$, $P < 0.001$, respectivamente.

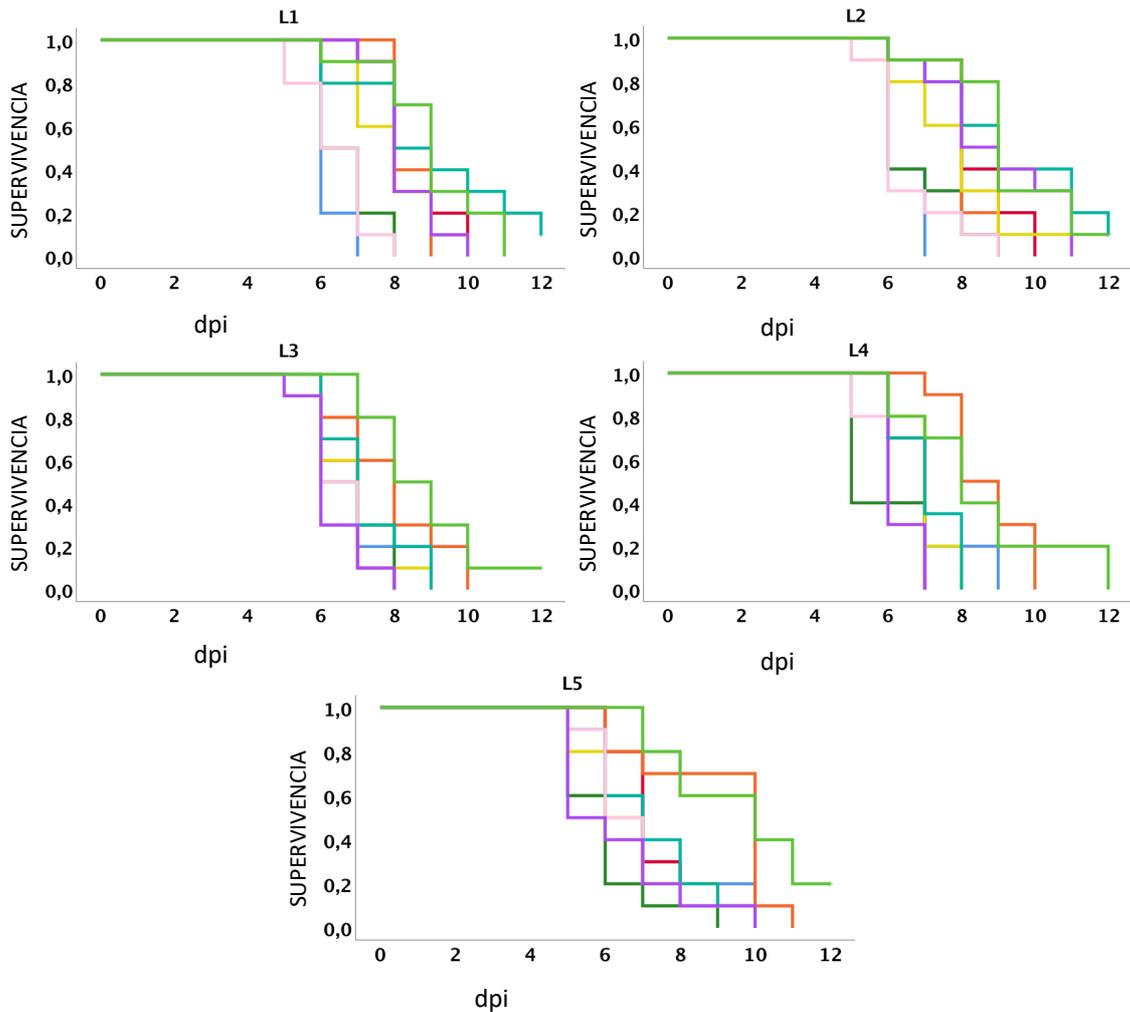


Fig. 58. Curvas de supervivencia para los linajes de *eds8-1* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.5. Linajes evolucionados en *hsp90-1*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes ($P < 0.001$). En la fig. 59 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 son: $\chi^2 = 40.436$, $\chi^2 = 42.031$, $\chi^2 = 41.216$, $\chi^2 = 37.102$; $\chi^2 = 35.460$, respectivamente.

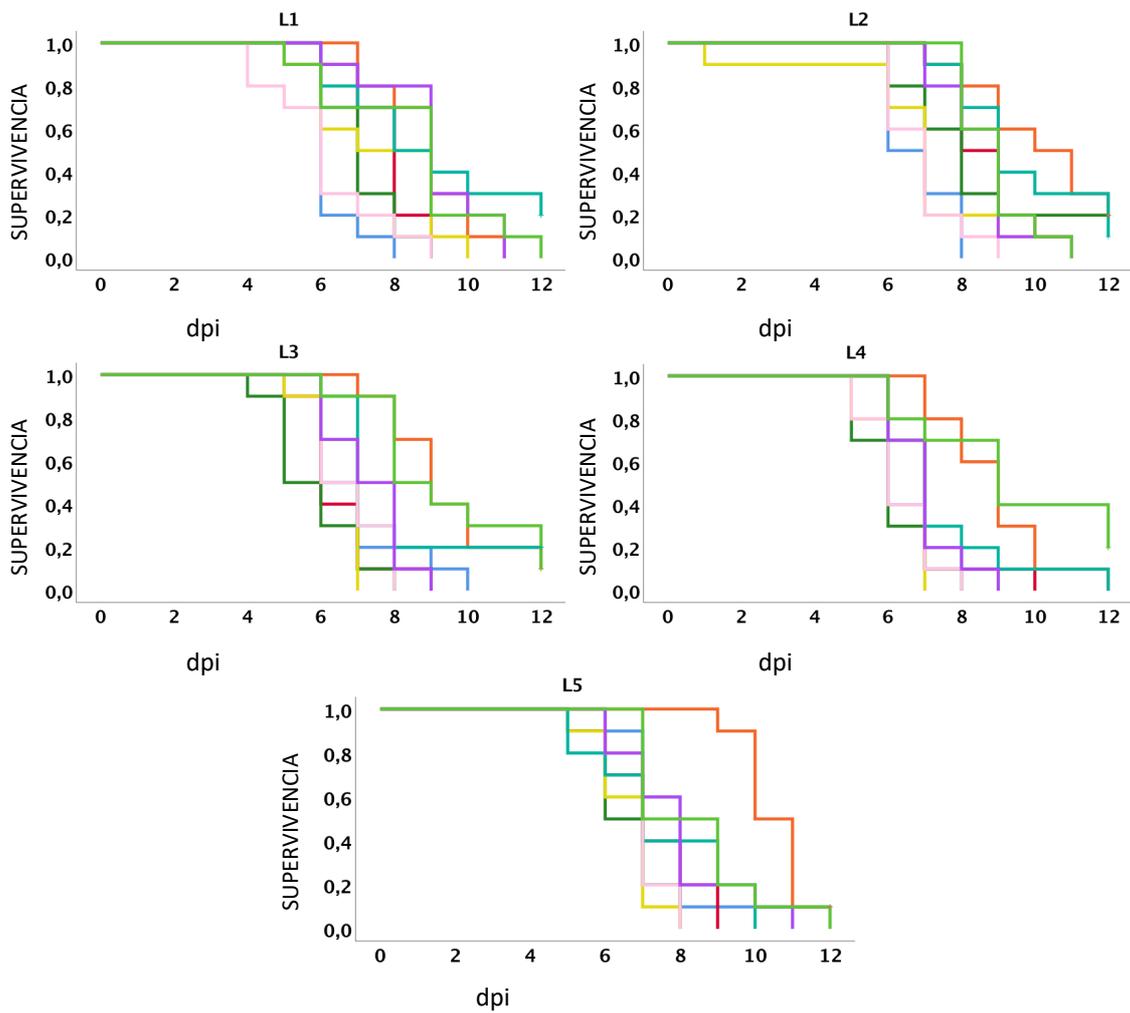


Fig. 59. Curvas de supervivencia para los linajes de *hsp90-1* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.6. Linajes evolucionados en *i4g2*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes. En la fig. 60 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 y sus significaciones son: $\chi^2 = 23.435$, $P = 0.003$; $\chi^2 = 30.901$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 39.551$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 48.941$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 21.135$, $P = 0.007$, respectivamente.

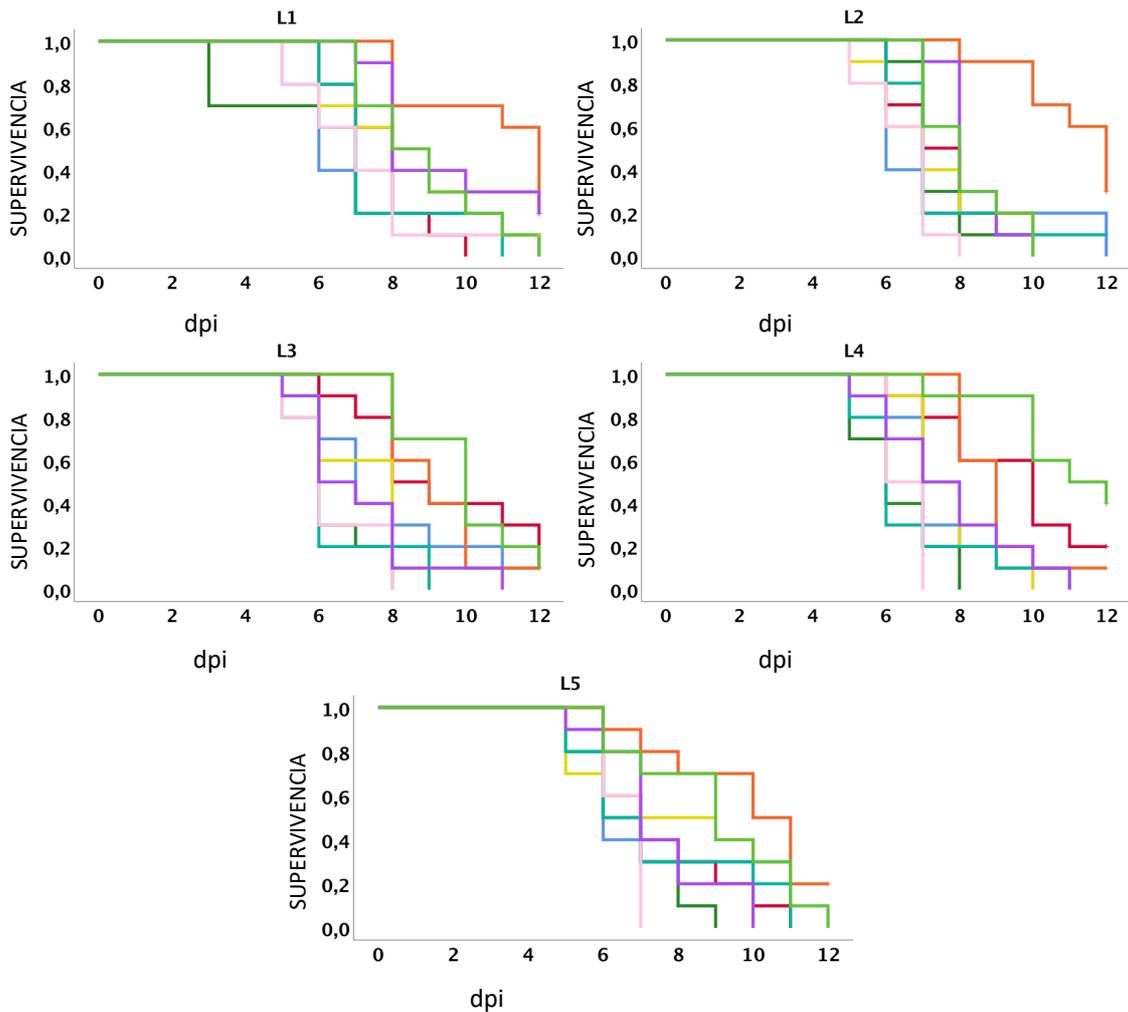


Fig. 60. Curvas de supervivencia para los linajes de *i4g2* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.7. Linajes evolucionados en *npr1-1*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes ($P < 0.001$). En la fig. 61 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 son: $\chi^2 = 29.945$, $\chi^2 = 29.755$, $\chi^2 = 37.385$, $\chi^2 = 45.118$, $\chi^2 = 44.127$, respectivamente.

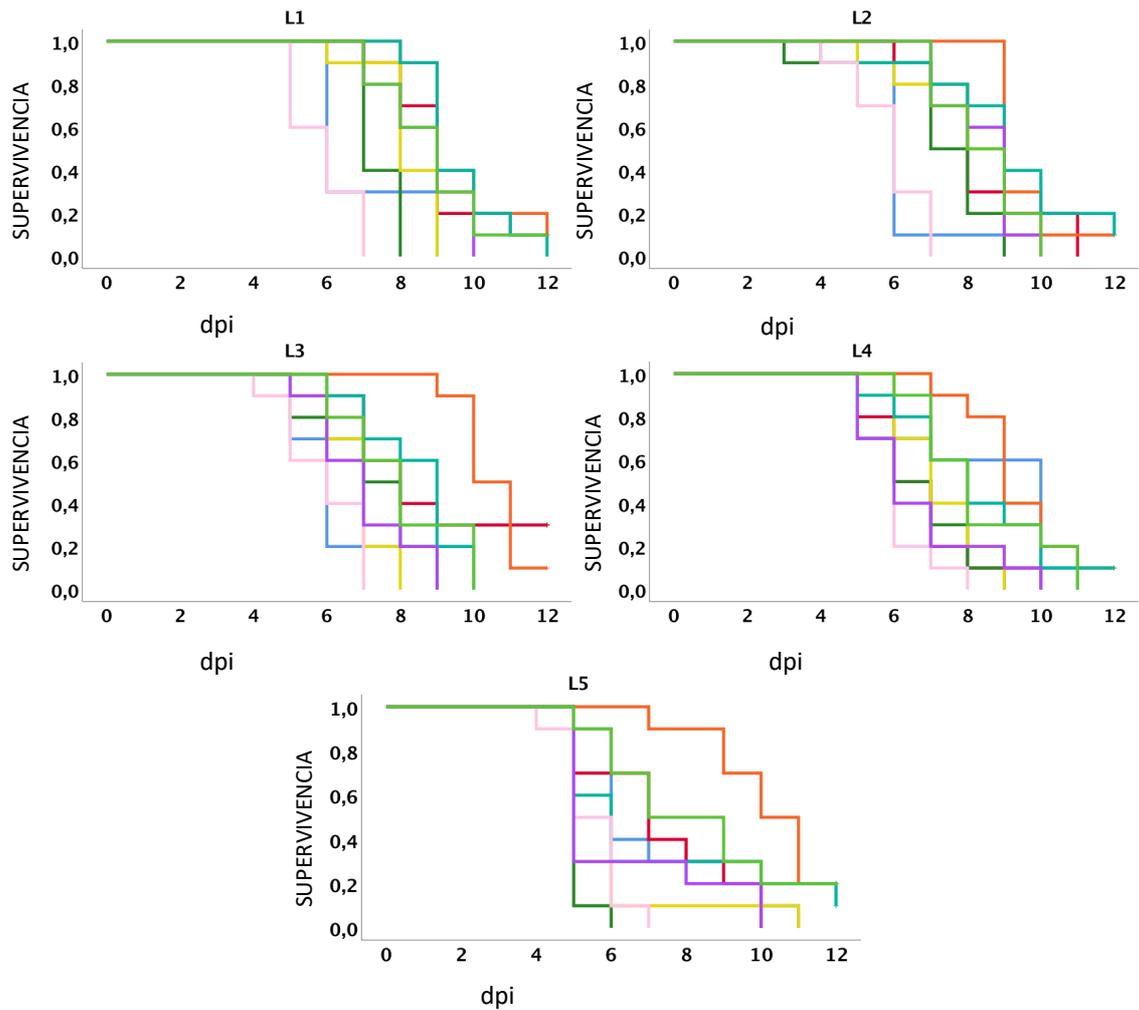


Fig. 61. Curvas de supervivencia para los linajes de *npr1-1* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.8. Linajes evolucionados en *jin1*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes ($P < 0.001$). En la fig. 62 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 son: $\chi^2 = 77.518$, $\chi^2 = 59.513$, $\chi^2 = 44.017$, $\chi^2 = 31.061$ y $\chi^2 = 37.225$, respectivamente.

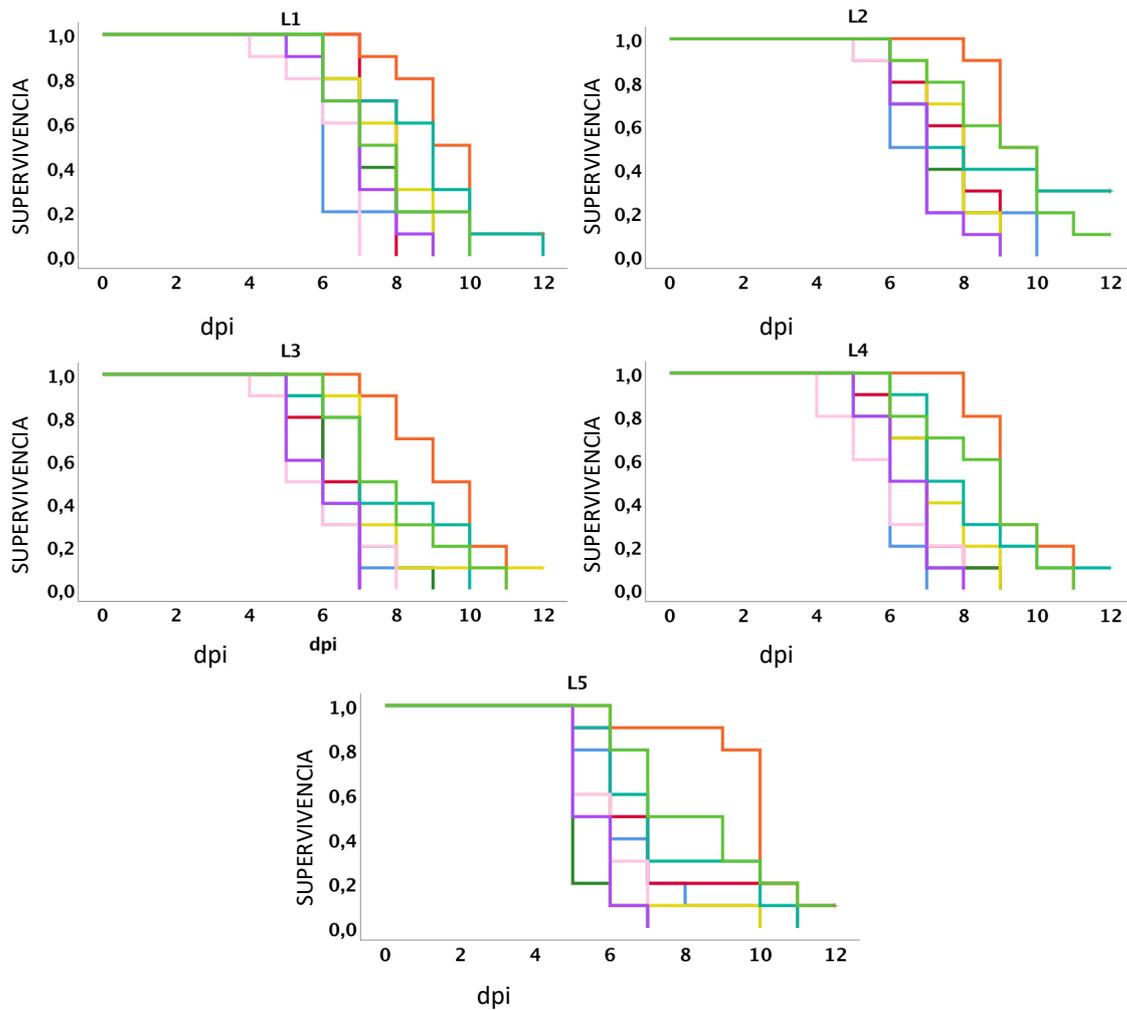


Fig. 62. Curvas de supervivencia para los linajes de *jin1* en cada uno de los nueve genotipos.

4.1.9. Linajes evolucionados en *p58^{ipk}*

La regresión Kaplan-Meier es significativa para los cinco linajes evolucionados en este mutante en cada uno de los nueve huéspedes. En la fig. 63 muestro las funciones de supervivencia de todos ellos cuando son infectados por cada linaje en la matriz de infección. Los correspondientes valores de χ^2 de los linajes L1, L2, L3, L4, L5 y sus significaciones son: $\chi^2 = 31.209$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 44.159$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 23.899$, $P = 0.002$; $\chi^2 = 21.137$, $P = 0.007$; $\chi^2 = 36.178$, $P = 0.007$, respectivamente.

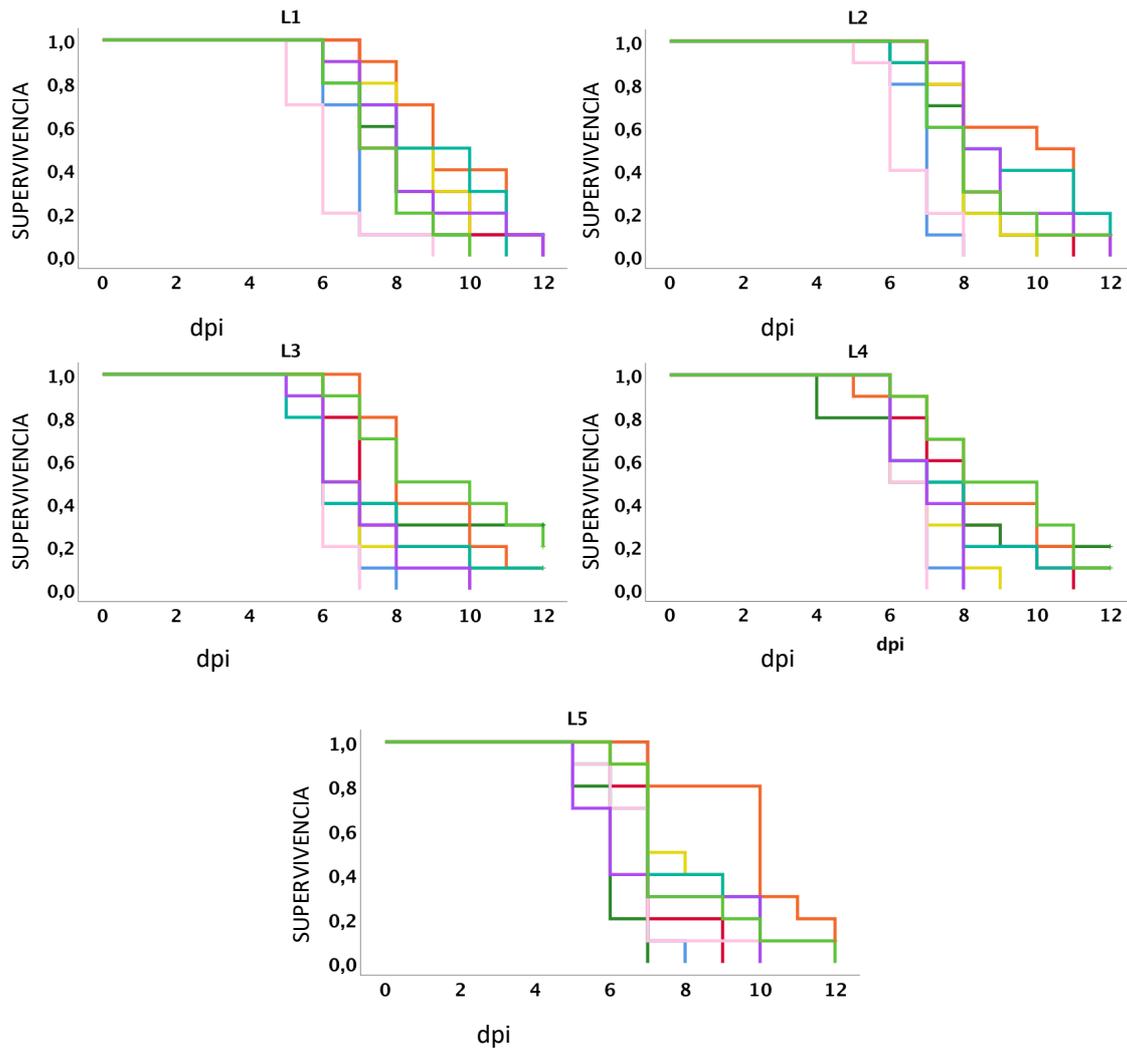


Fig. 63. Curvas de supervivencia para los linajes de $p58^{pk}$ en cada uno de los nueve genotipos.

4.2. Caracterización de la red de interacción linaje viral-genotipo de huésped

En la Tabla 8 se especifican los tiempos de supervivencia evaluados para cada linaje en cada uno de los genotipos de *A. thaliana* obtenidos mediante la regresión de Kaplan-Meier. La última columna muestra las medias de cada linaje entre todos los genotipos de planta. La última fila muestra la media obtenida para cada genotipo de huésped. El cálculo de la matriz Booleana se ha realizado según lo explicado en el apartado 7 de Material y Métodos, de forma que obtenemos una matriz binaria (Tabla 10) en la que 1 indica una supervivencia de la planta infectada por un linaje particular inferior a la mostrada por ese linaje en su propio huésped de partida ó 0 si es igual o mayor.

Tabla 8. Tiempos de supervivencia y medias de los linajes en cada genotipo de *A. thaliana*.

HUÉSPED												
Linaje		<i>cpr-5.2</i>	<i>dbp2</i>	<i>dcl2/dcl4</i>	<i>eds-8.1</i>	<i>hsp90.1</i>	<i>i4g-2</i>	<i>jin-1</i>	<i>npr-1.1</i>	<i>p58^{pk}</i>	Media linaje	Media
<i>cpr5.2</i>	1	6,2	8,3	7,3	9,5	8,1	8,8	7,3	6,3	8,8	7,84	8,06
	3	6,3	8,7	7,6	9,3	8,6	9,6	7,1	8,4	10,6	8,47	
	4	6,7	7,6	7,5	10,2	8	8,7	7,2	6,8	10	8,08	
	5	5,8	7,7	7,4	9,5	7,6	8,6	6,3	7,6	10,3	7,87	
<i>dbp2</i>	1	6,5	6,6	7,3	10,2	6,8	8,2	6,5	8,1	8	7,58	7,21
	2	6,6	6,2	7,9	10,1	7,2	8,2	6,6	7,7	7,7	7,58	
	3	6,2	6,3	6,6	8,2	6,2	7,3	6,1	6,5	7,3	6,74	
	4	6,7	6,3	6	8,1	6,9	7,7	6,4	6,6	8,7	7,04	
	5	6,8	5,9	5,6	10	7,3	8,6	5,8	6,4	7,5	7,10	
<i>dcl2/dcl4</i>	1	7	6,9	7,4	10,6	6,8	6,9	5,9	6,9	6,9	7,26	7,29
	2	6,2	7,6	5,4	10,6	8	8,4	6,4	7,6	7,8	7,56	
	3	6,6	6,9	5,1	8,9	6,9	7	6	6,1	9,8	7,03	
	4	7,7	8,6	5,7	8,6	7,2	6,7	7,6	7	9,4	7,61	
	5	6,4	7,7	5,2	10,4	5,8	6,4	6,8	6,3	7,9	6,99	
<i>eds8.1</i>	1	6,2	8,4	6,7	8,4	7,9	9	6,4	8,3	9	7,81	7,43
	2	6,4	8,4	6,8	8	7,8	9,3	6,5	8,9	9,3	7,93	
	3	6,6	6,6	6,7	7,9	6,7	7,2	6,5	6,3	8,8	7,03	
	4	6,8	6,7	5,8	8,7	7	7,05	6,1	6,3	8,5	6,99	
	5	7,2	7,4	6	9	6,8	7,2	6,8	6,3	9,6	7,37	
<i>hsp90.1</i>	1	6,3	7,8	7	8,9	7,6	9	7,2	9	8,5	7,92	7,71

	2	6,8	8,7	8,3	10,1	6,8	9,6	6,5	8,6	8,9	8,26	
	3	7	6,5	5,8	9,4	6,6	8	6,8	7,3	9,3	7,41	
	4	6,7	7	6,1	8,9	6,5	7,5	6,3	7	9,4	7,27	
	5	7,5	7,2	6,6	10,5	6,6	7,5	7	7,9	8,4	7,69	
i4g2	1	7,1	7,7	6,6	10,7	8,3	7,6	7,2	9,3	8,8	8,14	7,90
	2	7,4	7,6	7,4	11,1	7,3	7,5	6,5	8,3	8,1	7,91	
	3	7,9	9,3	6,3	9,2	7,2	6,5	6,4	7,1	9,9	7,76	
	4	7,5	9,4	6,3	9	7,7	6,7	6,5	7,7	10,8	7,96	
	5	7,5	7,6	6,7	9,8	7,7	7,4	6,5	7,5	9	7,74	
j1n1	1	6,9	9,1	7,4	9,7	8,2	9,6	5,9	8,7	8,9	8,27	7,67
	2	6,3	8,4	7,3	9,5	8,1	9	5,9	8,4	8,4	7,92	
	3	6,5	8,7	7,2	10,5	6,8	8,4	5,9	7	8	7,67	
	4	8,3	6,7	6,6	9,4	7,3	8,2	6	6,6	8,3	7,49	
	5	7,3	7,3	5,1	10,2	5,8	7,2	5,5	6,3	8,3	7,00	
npr1.1	1	6,8	7,7	7,4	9,4	7,7	8,5	6,3	7	7,6	7,60	7,36
	2	7	7,7	7,3	10	7,8	8,6	6,9	7	9,1	7,93	
	3	6,5	6,3	6,6	9,3	7,6	7,8	5,9	6	7,9	7,10	
	4	6,1	6,9	6,7	9,3	7,3	8,1	5,9	6,4	8,5	7,24	
	5	6,6	7,3	5,3	9,7	6	7,5	5,9	5,6	8,4	6,92	
p58^{ipk}	1	7,2	8,3	7,8	9,5	8,5	8,8	6,1	8,4	7,6	8,02	7,76
	2	6,9	8,3	7,9	9,7	8,1	9	6,5	8,9	8,3	8,18	
	3	6,5	7,5	8,1	8,9	7,3	7,2	6,1	6,9	9,3	7,53	
	4	6,7	8	7,5	8,6	7	7,7	6,5	7	9	7,56	
	5	7,1	7,2	6	9,9	8,1	7,7	6,9	7	7,9	7,53	
Media		6,80	7,57	6,71	9,49	7,31	7,99	6,44	7,30	8,69		

Tabla 9. Transformación de la matriz de infección de la Tabla 9 en una matriz binaria.

HUÉSPED												
LINAJE		<i>cpr5.2</i>	<i>dbp2</i>	<i>dcl2/dc</i>	<i>eds-8.1</i>	<i>hsp90.1</i>	<i>i4g2</i>	<i>jin1</i>	<i>npr1.1</i>	<i>p58^{pk}</i>		
<i>cpr5.2</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0,11
	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	
	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	
	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	
<i>dbp2</i>	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0,33	0,29
	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,11	
	3	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0,44	
	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0,22	
	5	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0,33	
<i>dcl2/dcl4</i>	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,89	0,27
	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,11	
	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,11	
	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,11	
	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,11	
<i>eds8.1</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0,78	0,82
	2	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0,56	
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,89	
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,89	
<i>hsp90.1</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0,44	0,33
	2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0,33	
	3	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0,33	
	4	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0,33	
	5	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0,22	
<i>i4g2</i>	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0,44	0,40

	2	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0,56	
	3	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0,33	
	4	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0,33	
	5	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0,33	
<i>jin1</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,11	0,13
	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,11	
	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,11	
	4	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,11	
	5	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0,22	
<i>npr1.1</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0,33	0,29
	2	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0,33	
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0,22	
	4	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0,33	
	5	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0,22	
<i>p58^{ipk}</i>	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0,33	0,76
	2	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0,67	
	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	
	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,00	
	5	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0,78	
		0,55	0,34	0,61	0,16	0,36	0,27	0,70	0,30	0,16		

Posteriormente, esta matriz se reordena de forma que el mayor número de interacciones de la red bipartita sucedan en la parte superior de la matriz. Esta red bipartita es una forma de representar la matriz de infección que se ha diseñado en este experimento. El resultado se muestra en la Figura 64. Para evaluar el grado de anidamiento de la matriz, hemos aplicado el método propuesto por (Bascompte, 2003) calculando la temperatura T para evaluar el grado de anidamiento. Una matriz perfectamente anidada tendría una $T = 0$; sin embargo, si $T = 100$ concluiríamos que los elementos están distribuidos al azar. Con el fin de comprobar si además la matriz es modular, también hemos calculado si la modularidad es significativa utilizando el Algoritmo Estándar de Módulos Inducidos Recursivamente Bipartitos AEM (Barber, 2007), donde $Q = 1$ si la matriz es modular o $Q = -1$ si es antimodular, o en algún lugar intermedio ($-1 < Q < 1$). La significación

estadística de T y Q se evaluará utilizando el modelo nulo general propuesto en (Bascompte, 2003), como explicaba en Material y Métodos.



Fig. 64. Estructura de la matriz reordenada de mayor a menor número de interacciones. Las celdas en negro indican interacción positiva, de lo contrario no hay interacción.

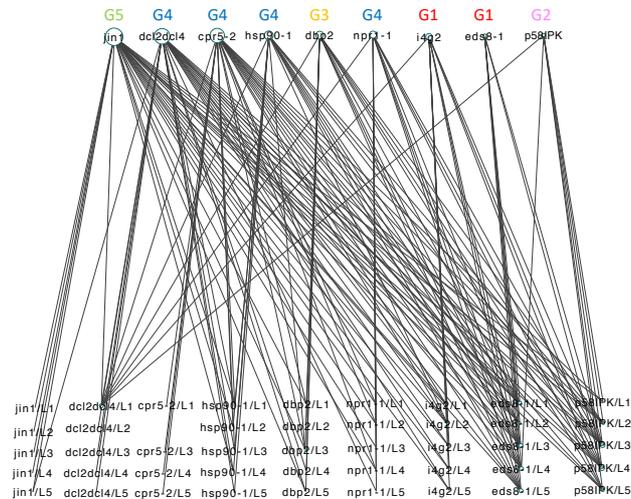


Fig. 65. Representación de la matriz de infección como una red de interacciones entre linajes y genotipos mutantes.

La matriz de interacciones construida puede también reflejarse como en la fig. 65, de modo que puede observarse como la mayor cantidad de interacciones tienen lugar entre los linajes evolucionados en tres de los genotipos más restrictivos, con la salvedad de *cpr5-2*, ya que éstos son los que suelen seleccionar poblaciones generalistas; y sin embargo son los linajes evolucionados en los huéspedes más permisivos los que suelen seleccionar especialistas y por tanto en la matriz sólo muestran una asociación con su genotipo local. La matriz de interacciones es significativamente anidada ($T = 14.706$; $P < 0.001$) pero también significativamente modular ($Q = 0.234$; $P = 0.047$), no obstante, atribuimos la presencia de modularidad al efecto de los linajes que han convergido de *jin1*, *cpr5-2* y *dcl2 dcl4*, ya que se trata de linajes que han evolucionado en los mismos ambientes. Para comprobarlo, realizamos el mismo proceso anterior calculando las medias de los tiempos de supervivencia en cada grupo de linajes evolucionados en el mismo huésped durante los 12 pases. Los resultados de la matriz y de la matriz binaria (Tablas 9 y 10) los hemos utilizado para calcular de nuevo el anidamiento (BITMANTEST), siendo éste significativo y dando como resultado una matriz con mayor grado de anidamiento que la anterior ($T = 13.064$; $P < 0.001$), que hemos representado en la Tabla 11, y que además ha dejado de ser significativamente modular ($Q = 0.286$; $P = 0.137$).

Tabla 9. Tiempos de supervivencia y medias de los linajes en cada genotipo de *A. thaliana*.

	HUÉSPED										
LINAJE	<i>cpr5.2</i>	<i>dbp2</i>	<i>dcl2dcl4</i>	<i>eds8.1</i>	<i>hsp90.1</i>	<i>i4g2</i>	<i>jin1</i>	<i>npr1.1</i>	<i>p58ipk</i>	MEDIA LINAJE	MEDIA
<i>cpr5.2</i>	6,25	8,075	7,45	9,625	8,075	8,925	6,975	7,275	9,925	8,06	8,06
<i>dbp2</i>	6,56	6,26	6,68	9,32	6,88	8	6,28	7,06	7,84	7,21	7,21
<i>dcl2dcl4</i>	6,78	7,72	5,76	9,82	6,94	7,08	6,54	6,78	8,36	7,31	7,31
<i>eds8.1</i>	6,64	7,5	6,4	8,4	7,24	7,95	6,46	7,22	9,04	7,43	7,43
<i>hsp90.1</i>	6,86	7,44	6,76	9,56	6,82	8,32	6,76	7,96	8,9	7,71	7,71
<i>i4g2</i>	7,48	8,32	6,66	9,96	7,64	7,14	6,62	7,98	9,32	7,90	7,90
<i>jin1</i>	7,06	8,04	6,72	9,86	7,24	8,48	5,84	7,4	8,38	7,67	7,67
<i>npr1.1</i>	6,6	7,18	6,66	9,54	7,28	8,1	6,18	6,4	8,3	7,36	7,36
<i>p58ipk</i>	6,88	7,86	7,46	9,32	7,8	8,08	6,42	7,64	8,42	7,76	7,76
MEDIA	6,79	7,60	6,73	9,49	7,32	8,01	6,45	7,30	8,72		

Tabla 10. Matriz binaria obtenida a partir de la Tabla 11.

HUÉSPED											
LINAJES	<i>cpr5.2</i>	<i>dbp2</i>	<i>dcl2dcl4</i>	<i>eds8.1</i>	<i>hsp90.1</i>	<i>i4g2</i>	<i>jin1</i>	<i>npr1.1</i>	<i>p58ipk</i>		
<i>cpr5.2</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0,11
<i>dbp2</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,11	0,11
<i>dcl2dcl4</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,11	0,11
<i>eds8.1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0,89	0,89
<i>hsp90.1</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0,33	0,33
<i>i4g2</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0,33	0,33
<i>jin1</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,11	0,11
<i>npr1.1</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0,22	0,22
<i>p58ipk</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0,89	0,89
	0,33	0,33	0,56	0,11	0,33	0,33	0,67	0,33	0,11		

Tabla. 11. Matriz reordenada con jerarquía de mayor número de interacciones

LINAJE	HUÉSPED								
	<i>jin1</i>	<i>dcl2dcl4</i>	<i>cpr5-2</i>	<i>dbp2</i>	<i>npr1-1</i>	<i>hsp90.1</i>	<i>i4g2</i>	<i>eds8-1</i>	<i>p58ipk</i>
<i>p58ipk</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>eds8-1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>i4g2</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>hsp90.1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>npr1-1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>dbp2</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>cpr5-2</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>dcl2dcl4</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>jin1</i>	■	■	■	■	■	■	■	■	■

DISCUSIÓN

1. La tasa de evolución de TEV no aumenta proporcionalmente al tamaño del inóculo

Los resultados obtenidos confirman el papel de la interferencia clonal en la evolución de los virus de RNA asexuales y amplían observaciones previas hechas en un sistema de cultivo de células animales (Miralles et al., 1999, 2000) a un patosistema de planta-virus biológicamente más relevante, en el que pueden encontrarse múltiples fuentes de selección operando simultáneamente sobre la población de virus. Como se espera de su gran tamaño poblacional y altas tasas de mutación genómica [en el caso de TEV en el rango de 0.01 - 0.1 por genoma y evento de replicación (Tromas y Elena 2010)], el número de posibles mutaciones beneficiosas que coexistan en un momento dado en una población debe ser ciertamente grande, como lo demostró recientemente la secuenciación profunda de linajes de TEV en proceso de adaptación a un nuevo huésped (Cuevas et al. 2012).

Una de nuestras observaciones más relevantes es que la tasa de adaptación fue significativamente más rápida en el nuevo huésped que en el reservorio natural (Navarro et al. 2017). Esto se espera ya que puede existir más variación beneficiosa para un nuevo huésped, mientras que en el huésped natural esta variación ya puede haberse agotado. Apoyando esta idea, Cuevas et al. (2012) encontraron que la evolución temporal de la variabilidad genética de TEV dentro del huésped natural era consistente con la presencia de un genotipo dominante y la acumulación constante de alelos neutros. Por el contrario, en el huésped alternativo pimiento, al menos en una de las réplicas experimentales, el virus ancestral fue eliminado rápidamente por un clon que portaba una mutación beneficiosa. En su camino hacia la fijación, este clon también desplazó otra mutación beneficiosa que luego se fijó en el nuevo fondo genético dominante (Cuevas et al. 2012).

¿Por qué la interferencia clonal parece ser más importante para el carácter infectividad que para el carácter carga viral? Una explicación plausible es que existe una variación genética más beneficiosa para mejorar la infectividad, tal vez porque es un carácter genéticamente más simple: solo requiere entrar en la célula y poder iniciar la infección. Por el contrario, la carga viral, que se relaciona con la replicación celular, el movimiento sistémico y la estabilidad sistémica del virión, es un carácter más complejo que requiere la intervención de múltiples factores del huésped en

diferentes etapas. Esta complejidad hace razonable pensar que, dada la compactación de los genomas virales y las actividades multifuncionales de sus proteínas, las mutaciones beneficiosas que mejoran una interacción en particular podrían tener un efecto pleiotrópico negativo en otras interacciones, haciendo que el número de posibles mutaciones beneficiosas sea más pequeño y, por lo tanto, la interferencia clonal sea más débil para el caso del título viral.

Se ha teorizado que los cuellos de botella pueden proporcionar ventajas a las poblaciones de virus de RNA. Una de estas ventajas es facilitar el movimiento entre picos adaptativos. Es concebible que el virus quede atrapado en picos subóptimos de eficacia (Burch y Chao, 2000), y en los cuellos de botella puede suceder que las variantes genéticas se fijen en regiones distantes del paisaje. Otra posible ventaja de los cuellos de botella puede ser, por ejemplo, eliminar partículas defectivas de la población de virus (Zwart et al., 2008). Los cuellos de botella generalizados son probablemente una de las razones importantes por las que estas partículas no son tan comunes en los patosistemas naturales.

2. Evolución de TuMV en genotipos de *A. thaliana* con susceptibilidad variable.

Como expliqué en la Introducción de esta tesis, la evolución experimental es la responsable de gran parte de los descubrimientos actuales en materia de virología evolutiva (Elena et al., 2008 y 2011). Esta es la aproximación con la que he procedido a estudiar los procesos evolutivos asociados a la selección fuerte y débil, utilizando el TuMV y *A. thaliana* como modelo experimental.

Los resultados obtenidos tanto en el experimento de evolución como en la matriz de infección confirman la existencia de dinámicas evolutivas diferentes para TuMV en diferentes genotipos de *A. thaliana*. Estos genotipos han sido descritos en diversos estudios como más susceptibles que el silvestre (Col-0) a la infección de virus o menos susceptibles que éste (Krishna, 2001; Bilgin et al., 2003; Bouché et al., 2006; García et al., 2007; Love et al., 2005; Lellis et al., 2010; Castelló et al., 2010, 2011; Estevan et al., 2014; Moury et al., 2014).

Evolutivamente, en un genotipo mutante del huésped con susceptibilidad reducida respecto al genotipo silvestre actúa un régimen más restrictivo, por lo que en teoría la mayor parte de las variantes genéticas del espectro de mutantes serán incapaces de replicar. Esto significa que el tamaño efectivo de la población disminuye drásticamente, la deriva genética cobrará más importancia que la selección natural y no necesariamente los alelos más aptos para ese ambiente se fijarán en la población del virus. Esto también significa que la extinción es más plausible, debido a que todos estos procesos pueden situar a la población en un punto crítico de carencia de diversidad genética que no permita responder a las defensas de la célula huésped. También es crítico para la población viral el efecto de los pases, ya que, si la replicación es menor y no es capaz de acumular lo suficiente variación genética, habrá más probabilidades de perder la población durante la extracción y posterior inoculación del siguiente pase de evolución.

En huéspedes con mayor susceptibilidad que el genotipo silvestre, la selección será débil, ya que la mayor parte de los genotipos serán viables, siendo el tamaño efectivo de esta población mucho mayor que el correspondiente a un huésped hiposusceptible y contribuyendo a que la población resultante pueda fijar mutaciones beneficiosas. Aún así, como la mayor parte de mutaciones generadas son deletéreas, no puede descartarse que su número sea considerable.

Realizamos la selección de genotipos basándonos en los rasgos fenotípicos de diferentes poblaciones de virus. Por un lado la virulencia (reducción de peso de la planta), severidad de los síntomas (variable categórica que comprende 3 niveles de intensidad de síntomas), infectividad (porcentaje de infección), carga viral (número de genomas por ng) y *AUDPS* (calculada a partir de la infectividad según la ecuación 3 del apartado de Material y Métodos), todas ellas con diferencias significativas entre los distintos genotipos estudiados, que infectaron a huéspedes de susceptibilidad variable de entre una colección de mutantes de *A. thaliana*. Observamos que la mayor parte de ellos podían ser agrupados por categorías de susceptibilidad comparada con el genotipo silvestre, de modo que escogiendo uno de ellos podíamos tener un genotipo representativo de cada categoría para luego realizar en ellos los experimentos de evolución. También tuvimos en cuenta la ruta de señalización en la que éstos estaban implicados. Así, escogimos *cpr5-2* como representante del grupo equivalente al genotipo silvestre en cuanto a respuesta a la infección. Para

el resto de categorías, los genotipos seleccionados fueron *hsp90.1*, *jin1*, *p58^{ipk}* y *eds8-1* como representantes únicos de sus respectivas categorías. Además, elegimos el doble mutante *dcl2 dcl4* como representante de su categoría, y además por tratarse de un doble mutante de la ruta del silenciamiento, y a que el producto de *dcl4* complementa al de *dcl2* en su ausencia (Bouché et al., 2006). Por último, en el caso de *npr1-1* e *i4g2*, a pesar de formar parte de la misma categoría de respuesta a la infección, los escogimos ambas, ya que *npr1-1* es un factor que enlaza y conecta las rutas del JA y SA (Spoel et al., 2003) mientras que *i4g2* codifica para un factor de transcripción que interacciona indirectamente con la proteína VPg, el factor de virulencia más estudiado del TuMV (Gallois et al., 2010). Estos genotipos representaron los ambientes escogidos para someter a las poblaciones de TuMV a los diferentes procesos evolutivos a estudio. Por un lado, para los dos caracteres fenotípicos del virus sometidos a modelización, existen diferencias significativas entre genotipos (ambientes evolutivos), pero también entre linajes en sus dinámicas evolutivas, sugiriendo que los ambientes son efectivamente distintos pero que dentro de cada ambiente, cada linaje puede tomar distintos caminos evolutivos y esto puede deberse a una combinación de dos procesos, el primero es la naturaleza azarosa de la variación genética (mutaciones) y el segundo que cada individuo, aunque dentro de un mismo genotipo, también tiene sus características genéticas propias.

Un dato interesante es que para las *AUDPS* (pero no para la infectividad ni la carga) las diferencias ancestrales son eliminadas por adaptación, es decir, que los linajes son igualmente virulentos a pase 12, pero existían diferencias ancestrales anteriores a la evolución experimental que posteriormente desaparecieron (Travisano et al., 1995). En cualquier caso, en nuestro experimento las tasas evolutivas para las *AUDPS* \approx 18.5 veces mayores de media que las de la infectividad. La infectividad sólo depende de que el virus entre en una célula y dé comienzo a la infección, pero el carácter *AUDPS* es más complejo, porque se trata de optimizar la rapidez con que evoluciona la enfermedad y por tanto los síntomas. Además, tanto para infectividad como para la *AUDPS* las tasas evolutivas dependen de la fuerza de la selección, es decir, de lo fuertes que sean las restricciones que cada genotipo de la planta impone a la población viral.

Si nos detenemos específicamente en cada uno de los genotipos para explicar lo anteriormente dicho de forma más concreta, por un lado tenemos las poblaciones evolucionadas en los genotipos más restrictivos,

ya que se trata de genotipos mutados cuyos factores de traducción el virus necesitaría para desencadenar la enfermedad interaccionando con VPg o bien serían más resistentes vía la segunda capa de inmunidad (ETI): *i4g2* y *eds8-1*, respectivamente (y todos sus linajes), y en las que las tasas para las AUDPS son más altas. En estos genotipos más restrictivos para la multiplicación del virus, el régimen de selección que se impone es fuerte, y que el régimen de selección sea fuerte indica mayor importancia relativa de la deriva respecto a la de la selección natural, lo que parece estar relacionado con una mayor tasa evolutiva, especialmente para las AUDPS, en nuestro experimento.

Lo mismo sucede con el genotipo mutante *cpr5-2*, un genotipo mutante en el que la proteína CPR5 perdería su función represora de la ruta del SA y por tanto la síntesis de la hormona es constitutiva. Hay una excepción que es el linaje 2. El comportamiento de este linaje, y en concreto el hecho de que se extinguiese en el pase 5, nos dice mucho, y apoya la misma explicación que en el caso de los ambientes restrictivos de *eds8-1* e *i4g2*, ya que parece haber mayor efecto de la fuerza de la deriva pero ésta es un arma de doble filo, por un lado parece ayudar al virus a evolucionar más rápido, pero por otro puede llevarlo a la extinción si no supera el cuello de botella porque la población es insuficiente y/o carece de la diversidad alélica necesaria para adaptarse a la selección fuerte que supone la expresión de constitutiva de la ruta del SA.

En el polo opuesto estarían los virus evolucionados en los genotipos hipersusceptibles *jin1* y *dcl2 dcl4*, siendo las tasas evolutivas observadas para los linajes evolucionados en *jin1* las menores del experimento. La ausencia de este factor de transcripción, puesto que éste tiene gran cantidad de funciones en la planta, puede conllevar multitud de consecuencias en el fenotipo, una plausible es que, puesto que el genotipo silvestre activa la ruta de antioxidantes como los flavonoides o el ácido ascórbico, el mutante acumule especies ROS y esa sea la fuente de hipersusceptibilidad (Finkel, 2001). En cualquier caso, para el virus supone una oportunidad para fijar alelos beneficiosos debido a que le es posible alcanzar poblaciones mayores y la deriva parece tener menos importancia en este caso. Para los linajes a pase 12 evolucionados en *dcl2 dcl4* la conclusión sería similar, ya que el silenciamiento se interrumpe en estadios previos al ensamblaje del RISC (complejo de restricción de RNAs virales), y por tanto esta ruta defensiva no estaría habilitada para la planta mutante, aunque sí otras. Dado que ésta parece relativamente independiente del

resto, y que *a priori* se podría pensar que la planta podría utilizar otras rutas para rehuir la hipersusceptibilidad al virus, esto hace pensar que el silenciamiento es esencial para la defensa de la planta contra virus, ya que, en nuestro experimento, esta hipersusceptibilidad es patente, aunque no sea la más acusada.

Un resultado interesante es el de la evolución experimental en el genotipo mutante *hsp90.1*. *A priori* barajábamos la posibilidad de que al ser la chaperona HSP90 un recurso que el virus necesita para completar su ciclo de infección, quizá este sería un caso de resistencia recesiva de la planta (Wang y Krishnaswamy, 2012) y el ambiente sería hiposusceptible para el virus, ya que en otros virus como el BaMV o el RNMV se ha comprobado que *hsp90.1* forma parte del complejo de replicación. Sin embargo, el virus se adapta lentamente y esto podría indicar que el ambiente durante los 12 pases ha estado más en el lado de la hipersusceptibilidad para el TuMV, ya que, en el caso de este virus, las plantas deficientes en la proteína HSP90 podrían haber fallado al activar la madurez de las NLRs (receptores que reconocen efectores patogénicos y activan la segunda fase de la inmunidad intracelular), porque la chaperona HSP90 es necesaria para realizar esa función (Verchot, 2012).

Corriente arriba en la ruta de síntesis de las isoformas de eIF4 estaría el factor de transcripción DBP, cuyos mutantes *dbp1* y *dbp2* no difieren fenotípicamente (Castelló et al., 2010 y 2011) y confieren resistencia a TuMV (Castelló et al., 2010). Tras el experimento de evolución, hemos comprobado que en términos comparativos las tasas de evolución de la población viral son intermedias: para la infectividad similares a las de *i4g2* y *npr1-1* y para las AUDPS similares a las de *dcl2 dcl4* y también *npr1-1*.

Las tasas evolutivas de AUDPS e infectividad son intermedias en promedias (excepto el linaje 4), comparadas con el resto, para los virus evolucionados en el genotipo mutante *p58^{ipk}*. La proteína P58^{IPK} interacciona con las helicasas del TEV y TMV *in vitro* y *in vivo* (Bilgin et al., 2003; Sorel et al., 2014) por lo que, en teoría, esperaríamos otro caso de resistencia recesiva, es decir, que la planta es deficiente en un recurso que el virus necesita secuestrar para su propio beneficio. Sin embargo, el comportamiento evolutivo de los linajes (exceptuando el mencionado anteriormente 4) es de tasas evolutivas menores que las que tienen poblaciones evolucionadas en genotipos mutantes para otros factores de transcripción (*eds8-1*, *dbp2*,

npr1-1) o traducción (*i4g2*), sugiriendo que el nivel traduccional no supone un reto tan importante como en los casos anteriores.

Por último, en los genotipos mutantes *dbp2* y *npr1-1*, ambos afectando a rutas de transducción de señales (Despres et al., 2000; Carrasco et al., 2007; Tada et al., 2008; Carrasco et al., 2014), tienen tasas evolutivas similares para *AUDPS* e infectividad. Estos factores están relacionados con gran cantidad de mecanismos intracelulares de respuesta a la infección y la dinámica evolutiva de las poblaciones podría estar relacionada con un balance entre la selección natural y la deriva, de modo que pudiesen conservar cierta tasa evolutiva debida a los cuellos de botella, sin comprometer la selección natural y una mayor probabilidad de fijar los alelos más aptos en un ambiente en el que es más complejo fijar mutaciones que mejoren la eficacia con respecto al virus ancestral, cuando se trata de un factor que puede regular directa o indirectamente gran cantidad de procesos y que puede ser beneficiosa para unos pero no para otros.

Uno de los objetivos de esta tesis también era evaluar si la adaptación a distintos genotipos del huésped con diferencias en susceptibilidad al TuMV ha llevado a las poblaciones evolucionadas a ser especialistas o generalistas en cuanto a su posible gama de huéspedes, así como estudiar su relación con las mutaciones fijadas por cada población, cuya cantidad y sitio suele estar relacionada con el huésped en el que ha transcurrido la historia evolutiva, y estudiar si han tenido lugar procesos de evolución convergente, es decir, si esa historia compartida por linajes evolucionados en el mismo genotipo del huésped supone fijar las mismas mutaciones (Bedhomme et al., 2012; Hillung et al., 2014). En los virus de RNA, la gran compactación de su genoma está relacionada con la limitación del número de mutaciones que pueden suceder y a su vez una sola mutación puede tener efectos pleiotrópicos considerables en la eficacia. La compactación limita el número de soluciones adaptativas para un problema evolutivo particular (Elena y Sanjuán, 2007; Elena et al., 2008 y 2011). Para evaluar el grado de generalismo o especialismo alcanzado por cada linaje evolucionado, generamos una matriz de infección en la que cada uno de los 44 linajes evolucionados fue inoculado en cada uno de los nueve genotipos de la planta en los que se realizó el experimento de evolución, de modo que los linajes, además de ser inoculados en el ambiente en el que evolucionaron durante 12 pases, lo fueron también en el resto.

La adaptación a múltiples huéspedes puede ser una fuente de diversidad genética en ambos patógeno y huésped, ya que la población sea generalista se debe a que coexisten en ella multitud de genotipos que le permiten infectar a múltiples huéspedes y este puede ser el resultado de historias evolutivas que tienen que ver con la selección fuerte, es decir, con episodios de fuerte deriva y poblaciones pequeñas que colonizan células en las que el estado metabólico es restrictivo y supone una nueva fuente de variación comparada con el estado del huésped de partida al que previamente había sido adaptado. El continuo especialista-generalista depende pues del ambiente evolutivo, la diversidad genética de la población de virus y cuán eficaz sea el camino evolutivo tomado por la población viral partiendo de esas condiciones preexistentes. En realidad, cada uno de estos genotipos que convierten a la población viral en generalista, es especialista en un huésped diferente y esa heterogeneidad genética le permite a la población poseer mayor plasticidad fenotípica en el momento de infectar diferentes huéspedes que a una población más homogénea genéticamente, ya que, debido a la especialización, ésta última poseería un espectro de huéspedes menor (Elena et al., 2011).

En la Introducción explicaba el concepto de cuasiespecie viral. Esta cuasiespecie posee una memoria de genotipos que tiene que ver con su historia evolutiva y por tanto con los diferentes ambientes en los que haya podido evolucionar y adaptarse, para lo que también será determinante qué tipos de ambiente sean en términos de selección fuerte o débil, es decir, hiposusceptibilidad o hipersusceptibilidad del huésped frente a esa población de virus (Domingo et al., 2018).

Nuestra matriz de infección es por un lado significativamente anidada pero también significativamente modular. Las matrices anidadas se explican por el modelo de interacción gen a gen (Valverde et al., 2017). Este modelo predice que los genotipos huéspedes más difíciles de infectar sólo serán infectados por virus generalistas mientras que los más permisivos son infectados por todas las poblaciones de virus, por lo que llamaríamos a este huésped universalmente susceptible. Las matrices significativamente anidadas lo son porque la gama de huéspedes especialistas es una subcategoría de los generalistas (Remold, 2012). En nuestra matriz, en un extremo tendríamos el linaje 4 evolucionado en el mutante *eds8-1* y los linajes 3 y 4 evolucionados en el mutante *p58^{ipk}*, que infectan a todos los huéspedes sin excepción con igual eficacia. El huésped más susceptible es *jin1*, sin ser estrictamente susceptible para todos los virus, ya que las

poblaciones de TuMV evolucionadas en *cpr5-2* no pueden infectarlo (son estrictamente especialistas), tampoco la mayor parte de linajes evolucionados en *dcl2 dcl4* (excepto el 1), ni los linajes 2 y 4 evolucionados en *dbp2*, así como los linajes 3 y 5 evolucionados en *hsp90-1* ni el linaje 5 evolucionado en *npr1-1*. El huésped menos permisivo resultó ser *eds8-1*, al que sólo son capaces de infectar los linajes evolucionados en ese mismo genotipo y los linajes 3 y 4 evolucionados en *p58^{ipk}*.

Como explicaba, la matriz de infección ilustra el hecho de que hay poblaciones de virus que se han especializado en su propio huésped. Es el caso de los linajes evolucionados en los huéspedes más susceptibles *jin1*, *cpr5-2* y *dcl2 dcl4* (excepto el 1). De hecho, la matriz es significativamente modular. Esta modularidad puede deberse a dos razones. Una es que se hayan generado módulos en los que los linajes evolucionaron en huéspedes mutantes de rutas de defensa relacionadas. La otra es que los linajes evolucionados en un mismo genotipo de huésped hayan generado la modularidad. Estos linajes deben haber evolucionado convergentemente debido a que han sufrido presiones selectivas similares, ya que son réplicas técnicas y las poblaciones del virus en este caso, escogen caminos evolutivos similares como solución a problemas similares en el mismo mutante. Esto sucede en los ambientes en los que los posibles caminos adaptativos son limitados. Concluiríamos por tanto que la matriz es modular, y podría explicarse por el modelo MA, donde la infección sólo es posible si el patógeno posee todos los alelos avirulencia que coinciden con los alelos correspondientes de resistencia de su huésped (Bascompte et al., 2003). Sin embargo, si eliminamos los efectos de las réplicas técnicas (linajes), la matriz resultante tiene un grado de anidamiento mayor y la modularidad desaparece. Por lo que también podemos concluir que los módulos no se deben a la existencia de linajes que hayan evolucionado en mutantes de rutas de defensa similares o relacionadas, sino exactamente en el mismo.

En lo referente a los linajes especialistas, sabemos que la pleiotropía antagónica puede favorecer la especialización, aunque limita el rango de adaptación del parásito a diferentes huéspedes, ya que la adaptación del virus a un huésped haría poco probable que esa misma mutación no tuviese efectos negativos en la eficacia en otro huésped. Se espera entonces que, si la adaptación se ha producido debido a este proceso, los generalistas paguen un coste. Probablemente, esto no es así en nuestro caso, ya que las poblaciones generalistas pueden ser más heterogéneas genéticamente que

las especialistas. Otra explicación plausible sería que la pleiotropía epistática puede llevar a la evolución de un parásito a generalista o especialista, dependiendo del huésped en el que evolucione (Lalić y Elena, 2012), lo que coincide más con nuestro experimento.

Sorprendentemente, el mutante *cpr5-2*, a pesar de tener una activación constitutiva de la síntesis de SA, parece comportarse en la matriz como un huésped permisivo, lo que podría indicar que esa síntesis se reprime por otras vías que no hemos modificado y funcionan con normalidad dentro de la célula.

Otro dato interesante es el de los linajes evolucionados en *npr1-1* (1, 2 y 4), ya que tres de ellos se han adaptado a su propio huésped y también a otros relacionados con la ruta del SA (*cpr5-2*) y JA (*jin1*), lo que parece indicar que sus mutaciones fijadas confieren una ventaja también en esos ambientes, consistente con la idea de que forman parte de la misma ruta de defensa.

En general, tendríamos una matriz con linajes en la que los huéspedes hipersusceptibles habrían seleccionado especialistas y estos tendrían tasas evolutivas más bajas; y otros linajes que habrían evolucionado a ser generalistas y que provendrían de ambientes más restrictivos, llegando a ser generalistas teniendo tasas evolutivas más altas.

Aunque se asume en general que las mutaciones sinónimas no tienen efectos en el fenotipo, esto no es así en el caso de los virus de RNA (Sanjuán et al., 2004; Carrasco et al., 2007), por lo que no podemos limitarnos a describir solamente las mutaciones no sinónimas, especialmente si se observan mutaciones sinónimas convergentes entre linajes evolucionados en el mismo genotipo del huésped. En el apartado 4 del Experimento de Evolución se describen las mutaciones fijadas halladas en la secuencia consenso de los virus evolucionados. Muchas de éstas son compartidas entre varios linajes, por lo que es un claro caso de convergencia evolutiva. Es decir, producto de la evolución en un mismo ambiente y de una misma solución al reto que ello supone. No es extraño entonces que grupos de linajes que contribuyen a la modularidad en la matriz, tengan las mismas mutaciones. Es el caso de los linajes 4 y 5 evolucionados en *cpr5-2*, que comparten dos mutaciones no sinónimas en *CI* y además una en *VPg* (también no sinónima), esta última también compartida con el linaje 3 de *cpr5-2*. Algo similar ocurre con los linajes 2 y 3 evolucionados en *dcl2 dcl4* y los linajes 3, 4 y 5 evolucionados en *jin1*, todos ellos compartiendo

mutaciones en *VPg*. Los linajes 4 y 5 evolucionados en *jin1* comparten además dos mutaciones sinónimas en HC-Pro y P3. Además, hemos comprobado que debido a que el genoma del virus es compacto, el número de mutaciones fijadas en ningún caso excede de cinco por genoma, siendo en algunos casos únicamente una mutación necesaria para adaptarse al nuevo huésped, lo que confirma las conclusiones de experimentos anteriores en *A. thaliana* y otros potyvirus (Agudelo-Romero et al., 2008; Hillung et al., 2014, Lafforge et al., 2011).

CONCLUSIONES

1. En los patosistemas de *N. tabacum*, *C. annuum* y *C. quinoa* infectados con TEV:

- Nuestros resultados confirman el papel de la interferencia clonal en la evolución de este virus. Las tasas de adaptación fueron significativamente más rápidas en el huésped nuevo, pimiento, que, en el huésped original, tabaco, ya que el primero genera una fuente de variación más beneficiosa en la población de virus, mientras que en el reservorio esta fuente de variación puede estar agotada.
- La interferencia clonal es más importante para la infectividad que para la carga viral, ya que para el virus mejorar el rasgo de infectividad es menos complejo.
- Quizá la razón de que nuestros resultados no sean significativos para la carga viral se debe a que mejorando este rasgo podría pagarse un coste pleiotrópico negativo, porque la acumulación viral es un rasgo que, para ser mejorado, requiere caminos evolutivos más complejos que por ejemplo la infectividad. Ésta última requiere entrar en la célula y desencadenar la infección, pero un aumento del título viral requeriría quizá otras presiones selectivas y otra combinación de mutaciones fijadas en la población de virus, cuya combinación simultánea es menos probable.

2. En el patosistema *A. thaliana*-TuMV:

- La evolución en un genotipo determinado siempre resulta en una mejora de rasgos fenotípicos (infectividad y *AUDPS*) relacionados con la eficacia viral.
- La adaptación de los virus elimina las diferencias ancestrales para la *AUDPS*, pero no para la infectividad.
- La adaptación a huéspedes hipersusceptibles es más lenta (selección débil) que la que sucede en huéspedes hiposusceptibles (selección fuerte).
- Los huéspedes más permisivos seleccionan virus especialistas pero los más resistentes seleccionan virus generalistas. La modularidad

- observada en la matriz de infección no se debe al modelo MA, sino a la convergencia evolutiva que sucede entre los linajes evolucionados en el mismo ambiente.
- La caracterización de las secuencias consenso de los linajes evolucionados revela gran cantidad de casos de convergencia evolutiva.
- Pocas mutaciones por genoma de TuMV pueden suponer cambios fenotípicos importantes.

REFERENCIAS

- Agresti, A., & Coull, B.A. (1998). Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *The American Statistician*, 52(2), 119-126.
- Agudelo-Romero, P., de la Iglesia, F., & Elena, S.F. (2008). The pleiotropic cost of host-specialization in tobacco etch potyvirus. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6), 806-814.
- Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, & Pooggin, M.M. (2006). Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Research*. 34(2), 462-471.
- Alamillo, J.M., Saénz, P., & García, J.A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *The Plant Journal*, 48(2), 217-227.
- Alazem, M., & Lin, N. (2015). Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology*, 16(5), 529-540.
- Almeida-Neto M., Guimarães P., Guimarães P.R., Loyola R.D., & Ulrich W.A. (2008). Consistent metric for nestedness analysis in ecological systems: Reconciling concept and measurement. *Oikos*, 117(8), 1227-1239.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P. & Gadriab, C. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653-657.
- Altermatt F., & Dieter, E. (2008). Genetic diversity of *Daphnia magna* populations enhances resistance to parasites. *Ecology Letters*, 11(9), 918.
- Andino, R., & Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology*, 479, 46-51.
- Andreote, F.D., Lacava, P.T., Gai, C.S., Araújo, W. L., Maccheroni, Jr, W., van Overbeek, L.S. & Azevedo, J. L. (2006). Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52.5, 419-426.
- Aregger, M., Borah, B.K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E.G., & Zvereva, A. (2012). Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002941.

- Atreya, C.D., Raccah, B., & Pirone, T.P. (1990). A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, *178*(1), 161-165.
- Baebler S., Witek, K, & Petek, M. (2014). Salicylic acid is an indispensable component of the *ny-1* resistance-gene-mediated response against potato virus Y infection in potato. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1095-1109.
- Barber, M.J. (2007). Modularity and community detection in bipartite networks. *Physical Review E*, *76*(6), 066102.
- Bascompte, J., Jordano P., Melián, C.J., & Olesen, J.M. (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(16), 9383-9387.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., & Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, *44*(3), 471-482.
- Bedhomme S., Lafforgue, G., & Elena, S.F. (2012). Multihost experimental evolution of a plant RNA virus reveals local adaptation and host-specific mutations. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(5), 1481-1492.
- Bedoya, L.C., Daròs, J.A. (2010). Stability of tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. *Virus Research*, *149*(2), 234-240.
- Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., & Staskawicz, B. J. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, *265*(5180), 1856-1860.
- Bilgin, D.D., Liu, Y., Schiff, M., & Dinesh-Kumar, S.P. (2003). P58^{IPK}, a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Developmental Cell*, *4*(5), 651-661.
- Botër, M., & Amigues, B. (2007). Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity. *The Plant Cell*, *19*(11), 3791-3804.
- Boualem, A., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2016). The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology*, *17*(17), 32-38.
- Bouché, N., Laressergues, D., Gascioli, V., & Vaucheret, H. (2006). An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a

- new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *The EMBO Journal*, 25(14), 3347-3356.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., & Görlach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.
- Brunet, É., Rouzine, I.M., & Wilke, C.O. (2008). The stochastic edge in adaptive evolution. *Genetics*, 179(1), 603-620.
- Burch, C. L., & Chao, L. (2000). Evolvability of an RNA virus is determined by its mutational neighborhood. *Nature*, 406(6796), 625-628.
- Calil, I.P., & Fontes, E.P.B. (2017). Plant immunity against viruses: Antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, 119(5), 711.
- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J. M. & Lisón, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77, 35-43.
- Carius, H.J., Little, T.J., & Ebert, D. (2001). Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution*, 55(6), 1136-1145.
- Carr T. (2007). *Genetic and molecular investigation of compatible plant-virus interactions*. Iowa State University.
- Carrasco, J.L., Castelló, M.J., Naumann K., Lassowskat, I., Navarrete-Gómez, M., Scheel, D., & Vera, P. (2014). Arabidopsis protein phosphatase DBP1 nucleates a protein network with a role in regulating plant defense. *PLoS ONE*, 9(3), e90734.
- Carrasco J.L., de la Iglesia F., & Elena S.F. (2007). Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in tobacco etch virus. *Journal of Virology*, 81(23), 12979-12984.
- Carrington, J.C., Haldeman, R., Dolja, V.V., & Restrepo-Hartwig, M.A. (1993). Internal cleavage and trans-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus *in vivo*. *Journal of Virology*, 67(12), 6995-7000.
- Castelló MJ., Carrasco, J.L., Navarrete-Gómez, M., Daniel, J., Granot, D., & Vera, P. (2011). A plant small polypeptide is a novel component of DNA-binding protein phosphatase 1-mediated resistance to plum pox virus in arabidopsis. *Plant Physiology*, 157(4), 2206-2215.
- Castelló, M.J., Carrasco, J.L., & Vera, P. (2010). DNA-binding protein phosphatase AtDBP1 mediates susceptibility to two potyviruses in arabidopsis. *Plant Physiology*, 153(4), 1521-1525.

- Chao, L. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. (1990). *Nature*, 348(6300), 454-455.
- Chao, L., Hanley, K.A., Burch, C.L., Dahlberg, C., & Turner P.E. (2000). Kin selection and parasite evolution: Higher and lower virulence with hard and soft selection. *The Quarterly Review of Biology*, 75(3), 261-275.
- Chellappan, P., Vanitharani, R., Ogbe, F. & Fauquet, C.M. (2005). Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. *Plant Physiology*, 138(4), 1828-1841.
- Clarke, J.D., Aarts, N., Feys, B.J., Dong, X., & Parker, J.E. (2001). Constitutive disease resistance requires EDS1 in the Arabidopsis mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially EDS1-dependent in *cpr5*. *The Plant Journal*, 26(4), 409-420.
- Parrish, C.R. Holmes, E.C., & Morens, D.M. (2008). Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3), 457-470.
- Combe, M., Garijo, R., Geller, R., Cuevas, J.M., & Sanjuán, R. (2015). Single-cell analysis of RNA virus infection identifies multiple genetically diverse viral genomes within single infectious units. *Cell Host & Microbe*, 18(4), 424-432.
- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyán, J. (2015). Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479, 85-103.
- Cuevas, J. M., Domingo-Calap, P., & Sanjuán, R. (2012). The fitness effects of synonymous mutations in DNA and RNA viruses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1), 17-20.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J.E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487-511.
- Daròs, J.A., Schaad, M.C., & Carrington, J.C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology*, 73(10), 8732-8740.
- De la Iglesia, F., & Elena, S.F. (2007). Fitness declines in Tobacco etch virus upon serial bottleneck transfers. *Journal of Virology*, 81(10), 4941-4947.
- De Visser, M., Zeyl, C.W., Gerrish, P.J., Blanchard, J.L., & Lenski, R.E. (1999). Diminishing returns from mutation supply rate in asexual populations. *Science*, 283(5400), 404-406.

- De Visser, J.A.G.M., & Rozen, D. E. (2005). Limits to adaptation in asexual populations. *Journal of Evolutionary Biology*, *18*(4), 779-788.
- Delwart, E., Magierowska, M., Royz, M., Foley, B., Peddada, L., Smith, R., & Busch, M. (2002). Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS*, *16*(2), 189-195.
- Denance, N., Sánchez-Vallet A., Goffner, D., & Molina, A. (2013). Disease resistance or growth: The role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 155.
- Deng, P., Wu, Z., & Wang, A. (2015). The multifunctional protein CI of potyviruses plays interlinked and distinct roles in viral genome replication and intercellular movement. *Virology Journal*, *12*(1), 141.
- Desai, M. M., & Fisher, D. S. (2007). Beneficial mutation–selection balance and the effect of linkage on positive selection. *Genetics*, *176*(3), 1759-1798.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., & Fobert, P. R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, *12*(2), 279-290.
- Dinesh-Kumar, S. P., Tham, W. H., & Baker, B. J. (2000). Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(26), 14789-14794.
- Divi, U.K, Rahman, T., & Krishna, P. (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biology*, *10*(1), 151.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B. & Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *19*(7), 2225-2245.
- Domingo, E. (ed.). (2006). *Quasispecies: concept and implications for virology*. Springer Science & Business Media.
- Domingo, E., Parrish, C.R., & Holland, J.J. (ed.). (2008). *Origin and evolution of viruses*. Elsevier.
- Domingo, E., & Perales, C. (2018). Quasispecies and virus. *European Biophysics Journal*, *47*(4), 443-457.
- Dorokhov, Y.L., Mäkinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N. & Saarma, M. (1999). A novel function for a ubiquitous

- plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Letters*, 461(3), 223-228.
- Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E., & Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), 6015-6019.
- Dutta, R.N., Rouzine, I.M., Smith, S.D., Wilke, C.O., & Novella, I.S. (2008). Rapid adaptive amplification of preexisting variation in an RNA virus. *Journal of Virology*, 82(9), 4354-4362.
- Dzianott A., Sztuba-Solińska, J., & Bujarski, J.J. (2012). Mutations in the antiviral RNAi defense pathway modify brome mosaic virus RNA recombinant profiles. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 97-106.
- Edgar, C.I., Dombrecht, B., Manners, J.M., Maclean, D.C., Schenk, P.M., & Kazan, K. (2006). Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana*. *Australasian Plant Pathology*, 35(6), 581-591.
- Elena, S.F., Agudelo-Romero, P., Carrasco, P., Codoñer, F.M., Martin, S., Torres-Barceló, C., & Sanjuán, R. (2008). Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity*, 100(5), 478-483.
- Elena, S.F., Agudelo-Romero, P., & Lalić, J. (2009). The evolution of viruses in multi-host fitness landscapes. *The Open Virology Journal*, 3, 1.
- Elena, S.F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J.M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G. & Zwart, M.P. (2011). The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(3), 287-293.
- Elena, S.F., & Rodrigo, G. (2012). Towards an integrated molecular model of plant-virus interactions. *Current Opinion in Virology*, 2(6), 719-724.
- Elena, S.F., & Sanjuán, R. (2007). Virus evolution: Insights from an experimental approach. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38(1), 27-52.
- Elena, S.F., & Rodrigo, G. (2011). A systems biology approach to the evolution of plant-virus interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 372-377.
- Elena, S.F. (2016). Evolutionary transitions during RNA virus experimental evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371(1701) 20150441.

- Elena, S.F. (2017). Local adaptation of plant viruses: lessons from experimental evolution. *Molecular Ecology*, 26(7), 1711-1719.
- Eskelin, K., Hafrén, A., Rantalainen, K. I., & Mäkinen, K. (2011). Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *Journal of Virology*, 85(17), 9210-9221.
- Estelle, M. A., & Somerville, C. R. (1986). The mutants of Arabidopsis. *Trends in Genetics*, 2, 89-93.
- Estevan J., Marena, A., Callot, C., Lacombe, S., Moretti, A., Caranta, C., & Gallois, J.L. (2014). Specific requirement for translation initiation factor 4E or its isoform drives plant host susceptibility to tobacco etch virus. *BMC Plant Biology*, 14(1), 67.
- Faulkner, C., & Robatzek, S. (2012). Plants and pathogens: Putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(6), 699-707.
- Fedorin, O. N., Solovyev, A. G., Yelina, N. E., Zamyatnin Jr, A. A., Zinovkin, R. A., Mäkinen, K., & Morozov, S. Y. (2001). Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein. *Journal of General Virology*, 82(2), 449-458.
- Finkel, T. (2001). Reactive oxygen species and signal transduction. *IUBMB life*, 52(1), 3-6.
- Flor, H.H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Flores, C.O, Meyer, J.R., Valverde, S., Farr, L., & Weitz, J.S. (2011). Statistical structure of host–phage interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), E297.
- Flores, C.O., Valverde, S., & Weitz, J.S. (2013). Multi-scale structure and geographic drivers of cross-infection within marine bacteria and phages. *ISME Journal*, 7(3), 520-532.
- Frank, S.A. (1993). Coevolutionary genetics of plants and pathogens. *Evolutionary Ecology*, 7(1), 45-75.
- Fu, D.Q., Ghabrial, S., & Kachroo, A. (2009). *GmRAR1* and *GmSGT1* are required for basal, *R* gene–mediated and systemic acquired resistance in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(1), 86-95.
- Gallois, J., Charron, C., Sanchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C., & German-Retana, S. (2010). Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis*

- thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *Journal of General Virology*, 91(1), 288-293.
- García, M.A., Meurs, E.F., & Esteban, M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie*, 89(6), 799-811.
- García-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J., & Carrington, J.C. (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during turnip mosaic virus infection. *The Plant Cell*, 22(2), 481-496.
- García-Marcos, A., Pacheco, R., Manzano, A., Aguilar, E., & Tenllado, F. (2013). Oxylipin biosynthesis genes positively regulate programmed cell death during compatible infections with the synergistic pair potato virus X-potato virus Y and tomato spotted wilt virus. *Journal of Virology*, 87(10), 5769-5783.
- Geri, C., Love, A. J., Cecchini, E., Barrett, S. J., Laird, J., Covey, S. N., & Milner, J. J. (2004). Arabidopsis mutants that suppress the phenotype induced by transgene-mediated expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI are less susceptible to CaMV-infection and show reduced ethylene sensitivity. *Plant Molecular Biology*, 56(1), 111-124.
- Gerrish, P. J., & Lenski, R. E. (1998). The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica*, 102, 127.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., & Ausubel, F.M. (1996). Isolation of arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, 143(2), 973-982.
- Glazebrook, J. (1999). Genes controlling expression of defense responses in arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(4), 280-286.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205-227.
- Góngora-Castillo, E., Ibarra-Laclette, E., Trejo-Saavedra, D.L., & Rivera-Bustamante, R.F. (2012). Transcriptome analysis of symptomatic and recovered leaves of geminivirus-infected pepper (*Capsicum annuum*). *Virology Journal*, 9(1), 295.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., & Dangl, J.L. (1995). Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science*, 269(5225), 843-846.

- Hillung J., Cuevas, J.M., & Elena, S.F. (2015). Evaluating the within-host fitness effects of mutations fixed during virus adaptation to different ecotypes of a new host. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 370(1675), 20140292.
- Hillung J., Cuevas, J.M., Valverde, S., & Elena, S.F. (2014). Experimental evolution of an emerging plant virus in host genotypes that differ in their susceptibility to infection. *Evolution*, 68(9), 2467-2480.
- Hillung, J., Elena, S.F. & Cuevas, J.M. (2013). Intra-specific variability and biological relevance of P3N-PIPO protein length in potyviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 249.
- Hollings, M., & Brunt, A.A. (1981). Potyvirus group. *CMI/AAB Descriptions of plant viruses*, 245(7).
- Holmes, E.C., & Moya, A. (2002). Is the quasispecies concept relevant to RNA viruses? *Journal of Virology*, 76(1), 460-462.
- Holmes, E.C. (2009). The evolutionary genetics of emerging viruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 353-372.
- Huang, Y.W., Hu, C.C., Liou, M.R., Chang, B.Y., Tsai, C.H., Meng, M., & Hsu, Y.H. (2012). HSP90 interacts specifically with viral RNA and differentially regulates replication initiation of bamboo mosaic virus and associated satellite RNA. *PLoS Pathogens*, 8(5), e1002726.
- Jenner, C.E., Wang, X., Tomimura, K., Ohshima, K., Ponz, F., & Walsh, J.A. (2003). The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 777-784.
- Johnson, C., Boden, E., & Arias, J. (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(8), 1846-1858.
- Jones, J.D., & Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444(7117), 323.
- Jones, R.A.C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141(2), 113-130.
- Kadota, Y., & Shirasu, K. (2012). The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(3), 689-697.

- Kampmueller, K.M., & Miller, D.J. (2005). The cellular chaperone heat shock protein 90 facilitates flock house virus RNA replication in *Drosophila* cells. *Journal of Virology*, *79*(11), 6827-6837.
- Katagiri, F., & Tsuda, K. (2010). Understanding the plant immune system. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(12), 1531-1536.
- Keesing, F., Holt, R.D., & Ostfeld RS. (2006). Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, *9*(4), 485-498.
- Keightley, P.D. (1998). Inference of genome-wide mutation rates and distributions of mutation effects for fitness traits: A simulation study. *Genetics*, *150*(3), 1283-1293.
- Kelley, J.L., Stinchcombe, J.R., Weinig, C., & Schmitt, J. (2005). Soft and hard selection on plant defence traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology Research*, *7*, 287-302.
- Khan, M.A., & Goss, D.J. (2012). Poly (A)-binding protein increases the binding affinity and kinetic rates of interaction of viral protein linked to genome with translation initiation factors eIFiso4F and eIFiso4F-4B complex. *Biochemistry*, *51*(7), 1388-1395.
- Kirik, V., Bouyer, D., Schöbinger, U., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J. M., & Hülskamp, M. (2001). CPR5 is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Current Biology*, *11*(23), 1891-1895.
- Komatsu, K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y., Maejima, K., Senshu, H., Himeno, M., Okano, Y., Kagiwada, S. & Namba, S. (2010). Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23*(3), 283-293.
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., & Morris, T.J. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *28*(5), 375-430.
- Krishna, P., & Gloor, G. (2001). The HSP90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones*, *6*(3), 238-246.
- Lafforgue, G., Martínez, F., Sardanyés, J., de la Iglesia, F., Niu, Q.W., Lin, S.S., Solé, R.V., Chua, N.H., Daròs, J.A., & Elena, S.F. (2011). Tempo and mode of plant RNA virus escape from RNA interference-mediated resistance. *Journal of Virology*, *85*(19), 9686-9695.
- Lalić, J., Agudelo-Romero, P., Carrasco, P., & Elena, S. F. (2010). Adaptation of tobacco etch potyvirus to a susceptible ecotype of

- Arabidopsis thaliana* capacitates it for systemic infection of resistant ecotypes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365(1548), 1997-2007.
- Lalić, J., Cuevas, J.M., & Elena S.F. (2011). Effect of host species on the distribution of mutational fitness effects for an RNA virus. *PLoS Genetics*, 7(11), e10023
- Lalić, J., & Elena, S. F. (2012). Magnitude and sign epistasis among deleterious mutations in a positive-sense plant RNA virus. *Heredity*, 109(2), 71-77.
- Lang, G.I., Rice, D.P., Hickman, M.J., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Botstein, D., & Desai, M.M. (2013). Pervasive genetic hitchhiking and clonal interference in forty evolving yeast populations. *Nature*, 500(7464), 571-574.
- Lauressergues, D., Gascioli, V., Vaucheret, H., & Bouché, N. (2006). An antagonistic function for *Arabidopsis DCL2* in development and a new function for *DCL4* in generating viral siRNAs. *The EMBO Journal*, 25(14), 3347-3356.
- Lellis, A. D., Allen, M. L., Aertker, A. W., Tran, J. K., Hillis, D. M., Harbin, C. R., & Browning, K. S. (2010). Deletion of the eIFiso4G subunit of the *Arabidopsis* eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Molecular Biology*, 74(3), 249-263.
- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G., & Laliberté, J.F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, 74(17), 7730-7737.
- Lewsey, M.G., & Carr, J.P. (2009). Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infections in salicylic acid-treated plants. *Journal of General Virology*, 90(12), 3010-3014.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., & Tilman, D. (2001). Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, 294(5543), 804-808.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., & Solano, R. (2004). *JASMONATE-INSENSITIVE1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(7), 1938-1950.
- Lorenzo, O., & Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 532-540.

- Love, A.J., Yun, B.W., Laval, V., Loake, G.J., & Milner, J.J. (2005). Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathways and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species. *Plant Physiology*, *139*(2), 935-948.
- Lynch, M. (1993). Evolution and extinction in response to environmental change. *Biotic interactions and global change*, 234-250.
- Martínez, F., Sardanyés, J., Elena, S.F., & Daròs, J.A. (2011). Dynamics of a plant RNA virus intracellular accumulation: stamping machine vs. geometric replication. *Genetics*, *188*(3), 637-646.
- Martínez, F., Lafforgue, G., Morelli, M.J., González-Candelas, F., Chua, N.H., Daròs, J.A., & Elena, S.F. (2012). Ultradeep sequencing analysis of population dynamics of virus escape mutants in RNAi-mediated resistant plants. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(11), 3297-3307.
- Mauch-Mani, B., & Slusarenko, A.J. (1993). Arabidopsis as a model host for studying plant-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*, *1*(7), 265-270.
- Mayers, C.N., Lee, K.C., Moore, C.A., Wong, S.M., & Carr, J.P. (2005). Salicylic acid-induced resistance to cucumber mosaic virus in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *18*(5), 428-434.
- Meier, N., Hatch, C., Nagalakshmi, U., & Dinesh-Kumar, S.P. (2019). Perspectives on intracellular perception of plant viruses. *Molecular Plant Pathology*, *20*(9), 1185-1190.
- Meng, Z., Ruberti, C., Gong, Z., & Brandizzi, F. (2017). CPR5 modulates salicylic acid and the unfolded protein response to manage tradeoffs between plant growth and stress responses. *The Plant Journal*, *89*(3), 486-501.
- Merchante, C., Alonso, J.M., & Stepanova, A.N. (2013). Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(5), 554-560.
- Mine, A., Hyodo, K., Tajima, Y., Kusumanegara, K., Taniguchi, T., Kaido, M., & Okuno, T. (2012). Differential roles of HSP70 and HSP90 in the assembly of the replicase complex of a positive-strand RNA plant virus. *Journal of Virology*, *86*(22), 12091-12104.
- Miralles, R., Gerrish, P.J., Moya, A., & Elena, S.F. (1999). Clonal interference and the evolution of RNA viruses. *Science*, *285*(5434), 1745-1747.
- Miralles, R., Moya, A., & Elena, S.F. (2000). Diminishing returns of population size in the rate of RNA virus adaptation. *Journal of Virology*, *74*(8), 3566-3571.
- Moissiard G., & Voinnet O. (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four

- arabidopsis dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19593-19598.
- Montes, N., Vijayan, V., & Pagán, I. (2020). Trade-offs between host tolerances to different pathogens in plant–virus interactions. *Virus evolution*, 6(1), veaa019.
- Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J.L., Palloix, A., & Caranta, C. (2014). Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirus genome-linked protein (VPg): A game of mirrors impacting resistance spectrum and durability. *Infection, Genetics and Evolution*, 27, 472-480.
- Moury, B., Janzac, B., Ruellan, Y., Simon, V., Khalifa, M. B., Fakhfakh, H., & Palloix, A. (2014). Interaction patterns between potato virus Y and eIF4E-mediated recessive resistance in the Solanaceae. *Journal of Virology*, 88(17), 9799-9807.
- Mundt, C.C. (2002). Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 381-410.
- Navarro, R., Ambrós, S., Martínez F., & Elena, S.F. (2017). Diminishing returns of inoculum size on the rate of a plant RNA virus evolution. *Europhysics Letters*, 2017, 120(3), 38001.
- Nguyen, H.D, Tomitaka, Y., Ho, S.Y.W., Duchêne, S., Vetten, H.J., Lesemann, D., Walsh, J.A., Gibbs, A.J., & Ohshima, K. (2013). Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS ONE*, 8(2), e55336.
- Nicaise, V., Gallois, J.L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K.S., & German-Retana, S. (2007). Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 581(5), 1041-1046.
- Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P., & Hellmann, G.M. (1997). Variations in the VPg protein allow a Potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology*, 237(2), 452-459.
- Nishimura M.T., & Dangl, J.L. (2010). Arabidopsis and the plant immune system. *The Plant Journal*, 61(6), 1053-1066.
- Novella, I.S., Elena, S.F., Moya, A., Domingo, E., & Holland, J.J. (1995). Size of genetic bottlenecks leading to virus fitness loss is determined by mean initial population fitness. *Journal of Virology*, 69(5), 2869-2872.
- Novella, I.S., Dutta, R.N., & Wilke, C.O. (2008). A linear relationship between fitness and the logarithm of the critical bottleneck size in vesicular stomatitis virus populations. *Journal of Virology*, 82(24), 12589-12590.
- Oelke, L.M., Bosland, P.W., & Steiner, R. (2003). Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum*

- annuum. Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(2), 213-218.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., & Chen, J. (2002). Molecular evolution of turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83(6), 1511-1521.
- Pacheco, R., García-Marcos, A., Barajas, D., Martiáñez, J., & Tenllado, F. (2012). PVX–potyvirus synergistic infections differentially alter microRNA accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Research*, 165(2), 231-235.
- Palermo, R.E, Fornek, J.L, Katze, M.G, Walters, K., & Korth, M.J. (2008). Innate immune modulation by RNA viruses: Emerging insights from functional genomics. *Nature Reviews Immunology*, 8(8), 644-654.
- Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Métraux, J.P., Manners, J.M., & Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *The Plant Cell*, 8(12), 2309-2323.
- Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Métraux, J. P., & Broekaert, W. F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 10(12), 2103-2113.
- Petek M., Rotter A., Kogovšek P., Baebler Š., Mithöfer A., & Gruden K. (2014). Potato virus Y infection hinders potato defence response and renders plants more vulnerable to colorado potato beetle attack. *Molecular Ecology*, 23(21), 5378-5391.
- Pieterse, C.M., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., & Van Loon, L.C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 123-134.
- Poulin R. (1998). *Evolutionary ecology of parasites*. 1. ed. ed. London: Chapman & Hall.
- Pounds, J.A., Bustamante, M.R., Coloma, L.A., Consuegra, J.A., Fogden, M.P., Foster, P.N., & Ron, S.R. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439(7073), 161-167.
- Rauch, E. M., & Bar-Yam, Y. (2006), Long-range interactions and evolutionary stability in a predator-prey system. *Physical Review E.*, 73(2), 020903.

- Remold, S.K. (2012), Understanding specialism when the jack of all trades can be the master of all. *Proceedings of the Royal Society B*, 279(1749), 4861-4869.
- Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E, Wood, W., & Ausubel F.M. (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants. *The Plant Journal*, 16(4), 473-485.
- Rodríguez-Gironés, M.A., & Santamaría, L. (2006). A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices. *Journal of Biogeography*, 33(5), 924-935.
- Rogers, E.E., & Ausubel, F.M. (1997). Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in *PR-1* gene expression. *The Plant Cell*, 9(3), 305-316.
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R. F., Gilbertson, R.L., & Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology*, 237(2), 283-295.
- Roossinck, M.J. (2003). Plant RNA virus evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 406-409.
- Ross A., Yamada K., Hiruma K., Yamashita-Yamada, M., Liu, X., Takano, Y., Tsuda, K., & Saijo, Y. (2014). The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *The EMBO Journal*, 33(1):62-75.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., & Le Gall, O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *Journal of General Virology*, 88(3), 1029-1033.
- Salvador, B., García, J. A., & Simón-Mateo, C. (2006). Causal agent of sharka disease: Plum pox virus genome and function of gene products. *EPPO Bulletin*, 36(2), 229-238.
- Sanjuán, R., Cuevas, J. M., Furió, V., Holmes, E. C., & Moya, A. (2007). Selection for robustness in mutagenized RNA viruses. *PLoS Genetics*, 3(6), e93.
- Sanjuán, R., Moya, A., & Elena, S. F. (2004). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8396-8401.
- Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *Journal of Virology*, 84(19), 9733-9748.
- Schaad, M.C., Jensen, P.E., & Carrington, J.C. (1997). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal*, 16(13), 4049-4059.

- Shaw F., Geyer, C.J., & Shaw, R.G. (2002). A comprehensive model of mutations affecting fitness and inferences for *Arabidopsis thaliana*. *Evolution*, 56(3), 453-463.
- Shigenaga, A.M, & Argueso, C.T. (2016). No hormone to rule them all: Interactions of plant hormones during the responses of plants to pathogens. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 56, 174-189.
- Sijmons, P.C., Grundler, F.M., von Mende, N., Burrows, P.R., & Wyss, U. (1991). *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal*, 1(2), 245-254.
- Simko, I., & Piepho, H. P. (2012). The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. *Phytopathology*, 102(4), 381-389.
- Singh, D.P., Moore, C.A., Gilliland, A., & Carr, J.P. (2004). Activation of multiple antiviral defence mechanisms by salicylic acid. *Molecular Plant Pathology*, 5(1), 57-63.
- Sorel, M., Svanella-Dumas, L., Candresse, T., Acelin, G., Pitarch, A., Houvenaghel, M.C., & German-Retana, S. (2014). Key mutations in the cylindrical inclusion involved in lettuce mosaic virus adaptation to eIF4E-mediated resistance in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 1014-1024.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., & Van Loon, L.C. (2003). *NPR1* modulates cross-talk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell*, 15(3), 760-770.
- Strelkova, N., & Lässig, M. (2012). Clonal interference in the evolution of influenza. *Genetics*, 192(2), 671-682.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., & Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of *NPR1* via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), 952-956.
- Takács, A., Horváth, J., Gáborjányi, R., Kazinczi, G., & Mikulás, J. (2014). Hosts and non-hosts in plant virology and the effects of plant viruses on host plants. In *Plant Virus–Host Interaction* (pp. 105-124). Academic Press.
- Tan, Z., Gibbs, A. J., Tomitaka, Y., Sanchez, F., Ponz, F., & Ohshima, K. (2005). Mutations in turnip mosaic virus genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *Journal of General Virology*, 86(2), 501-510.
- Thomma, B. P., Eggermont, K., Penninckx, I. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., & Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 15107-15111.
- Travisano, M., Mongold, J.A., Bennett, A.F., & Lenski, R.E. (1995). Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science*, 267(5194), 87-90.
- Tromas, N., & Elena, S.F. (2010). The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus. *Genetics*, 185(3), 983-989.
- Valkonen, J.P.T. (1997). Novel resistances to four potyviruses in tuber-bearing potato species, and temperature-sensitive expression of hypersensitive resistance to potato virus Y. *Annals of Applied biology*, 130(1), 91-104
- Valverde, S., Elena, S.F., & Solé, R. (2017). Spatially induced nestedness in a neutral model of phage-bacteria networks. *Virus Evolution*, 3(2), vex021.
- Van Baalen, M., & Beekman, M. (2006). The costs and benefits of genetic heterogeneity in resistance against parasites in social insects. *The American Naturalist*, 167(4), 568-577.
- Verchot, J., & Carrington, J.C. (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *Journal of Virology*, 69(6), 3668-3674.
- Verchot, J. (2012). Cellular chaperones and folding enzymes are vital contributors to membrane bound replication and movement complexes during plant RNA virus infection. *Frontiers in Plant Science*, 3, 275.
- Vidhyasekaran, P. (2014). PAMP signaling in plant innate immunity. In *PAMP Signals in Plant Innate Immunity*. Springer, Dordrecht, 17-161.
- Vijayan, V., López-González, S., Sánchez, F., Ponz, F., & Pagán, I. (2017). Virulence evolution of a sterilizing plant virus: tuning multiplication and resource exploitation. *Virus Evolution*, 3, vex033.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., & Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 177-206.
- Wang, A., & Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Molecular Plant Pathology*, 13(7), 795-803.
- Weigel, D., & Nordborg, M. (2005). Natural variation in Arabidopsis. How do we find the causal genes? *Plant Physiology*, 138(2), 567-568.
- Weitz, J.S., Poisot, T., Meyer, J.R., Flores, C.O., Valverde, S., Sullivan, M.B., & Hochberg, M.E. (2013). Phage-bacteria infection networks. *Trends in Microbiology*, 21(2), 82-91.
- Whitlock, M.C. (2004). Selection and drift in metapopulations. In: *Ecology, genetics and evolution of metapopulations*. Elsevier Inc, 153-173.

- Woolhouse, M.E.J, & Gowtage-Sequeria, S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerging infectious Diseases*, 11(12), 1842.
- Woolhouse, M.E.J, Haydon, D.T, & Antia, R. (2005). Emerging pathogens: The epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5), 238-244.
- Ye, C. M., Kelly, V., Payton, M., Dickman, M. B., & Verchot, J. (2012). *SGT1* is induced by the potato virus X TGBp3 and enhances virus accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant*, 5(5), 1151-1153.
- Yelina, N.E., Savenkov, E.I., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., & Valkonen, J.P. (2002). Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordei- and potyviruses: complementary functions between virus families. *Journal of Virology*, 76(24), 12981-12991.
- Yu, H., & Kumar, P.P. (2003). Post-transcriptional gene silencing in plants by RNA. *Plant Cell Reports*, 22(3), 167-174.
- Zhang M., M., Kadota, Y., Prodromou, C., Shirasu, K., & Pearl, L. H. (2010). Structural basis for assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD protein complexes: implications for chaperoning of NLR innate immunity receptors. *Molecular Cell*, 39(2), 269-281.
- Zhu, F., Xi, D.H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D.W., & Lin, H.H. (2014). Salicylic acid and jasmonic acid are essential for systemic resistance against tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(6), 567-577.
- Zwart, M.P., Erro, E., Van Oers, M.M., de Visser, J.A.G., & Vlak, J.M. (2008). Low multiplicity of infection *in vivo* results in purifying selection against baculovirus deletion mutants. *Journal of General Virology*, 89(5), 1220-1224.
- Zwart, M.P., Daròs, J.A., & Elena, S.F. (2011). One is enough: In vivo effective population size is dose-dependent for a plant RNA virus. *PLoS Pathogens*, 7(7), e1002122.
- Zwart, M.P., Daròs, J.A., & Elena, S.F. (2012). Effects of potyvirus effective population size in inoculated leaves on viral accumulation and the onset of symptoms. *Journal of Virology*, 86(18), 9737-9747.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

1. Tablas apartado Selección de Genotipos

1.1. Infectividad

Tabla 12. Porcentaje de infección entre 7-16 dpi por genotipo.

	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	13 dpi	14 dpi	15 dpi	16 dpi	% infección
sid 2-1			2	12	17	18	18	18	18		90
pad 4-1		2	5	13	18	18	18	18	18	18	90
eds 5-1		1	6	14	16	18	19	19	19	19	95
npr 1-1		1	1	9	7	18	18	20	20		100
cpr 5-2	4	11	14	15	15	15	15	15	16	16	80
coi 1-40		2	4	14	17	17	19	19	19		95
jln 1	9	11	18	19	19	19	19	19	19	19	95
etr 1-1		4	4	4	7	7	7	8	8		40
ein 2-1					4	6	7	13	14		70
eds 4-1			1	6	15	17	18	18	18		90
eds 8-1				2	4	8	11	11	11	11	55
dcl 2			5	9	16	17	17	17	18		90
dcl 4		4	2	9	12	15	15	15	16		80
dcl2/dcl4			3	11	16	18	19	19	20		100
hsp 90.1	3	5	11	14	16	17	17	19	19	19	95
Hg1			2		14	19	19	20	20		100
Hg2					3	7	12	14	17		85
Hg1 /Hg2											
dbp 2		2	2	5	9	12	14	14	16		80
dip 2			1	10	15	17	17	17	17		85
P58IPK-1			4	7	13	18	19	19	20	20	100
coi-0 wt			9	10	18	18	19	19	20	20	100

1.2. Título viral

Tabla 13. Datos de carga y carga media por genotipo.

GENOTIPO	CARGA MEDIA	CM GRUPAL	LOG CM
WT C-1	0		
WT +1	460713,277	5,8783E+05	5,76924962
WT +2	831111,199		
WT +3	465383,74		
WT +4	394334,782		
WT +5	787592,636		

eds8-1 C-1	-0,0163548	2,7756E-17	
eds8-1 C-2	0,01635478		
eds8-1 +1	78801,9253	7,6953E+04	4,88622704
eds8-1 +2	52281,2127		

eds8-1 +3	77510,9015		
eds8-1 +4	107420,873		
eds8-1 +5	68751,403		
eds8-1 AS1	2242986,72	1,3623E+06	6,13426752
eds8-1 AS2	1906886,33		
eds8-1 AS3	1,42174813		
eds8-1 AS4	250759,386		
eds8-1 AS5	2410783,96		

i4g2 C-1	-0,0508527	5,0853E-02	
i4g2 C-2	0,15255802		
i4g2 +1	40466,0739	4,7535E+04	4,67701681
i4g2 +2	38515,292		
i4g2 +3	60032,3955		
i4g2 +4	63291,9877		
i4g2+5	35371,0647		
i4g2 AS1	146727,299	1,5702E+05	5,19596579
i4g2 AS2	88939,7531		
i4g2 AS3	235404,679		

ein2-1 C-1	0,01946799	4,8670E-03	
ein2-1 C-2	-0,009734		
ein2-1 +1	157014,752	2,1099E+05	5,32426949
ein2-1 +2	261507,19		

ein2-1 +3	114954,863		
ein2-1 +4	312433,213		
ein2-1 +5	209058,477		
ein2-1 AS1	1096222,23	4,2901E+05	5,63246517
ein2-1 AS2	627501,995		
ein2-1 AS3	77103,9279		
ein2-1 AS4	49280,2395		
ein2-1 AS5	294930,522		

hsp90-1 C-1	0,76826677	7,6827E-01	
hsp90.1 +1	193831,557	2,7329E+05	5,43662404
hsp90.1 +2	199322,405		
hsp90.1 +3	276918,989		
hsp90.1 +4	318022,017		
hsp90.1 +5	378355,985		
hsp90.1 AS1	27,034431	2,7034E+01	1,43191723

sid2-1 C-1	-0,0690797	0,0000E+00	
------------	------------	------------	--

sid2-1 C-2	0,06907969		
sid2-1 +1	334397,264	3,9118E+05	5,59237837
sid2-1 +2	359424,071		
sid2-1 +3	415935,648		
sid2-1 +4	444600,434		
sid2-1 +5	401550,378		
sid2-1 AS1	117036,262	1,4642E+05	5,16558624
sid2-1 AS2	175794,186		

jin1 C-1	-0,0002848	1,4240E-04	
jin1 C-2	0,0005696		
jin1 +1	491584,464	6,8493E+05	5,83564472
jin1 +2	797086,544		
jin1 +3	932319,849		
jin1 +4	654113,644		
jin1 +5	549533,886		
Jin1 AS1	1,80291615	1,8029E+00	0,25597553

cpr5-2 C-1	-0,6354657	0,0000E+00	
------------	------------	------------	--

cpr5-2 C-2	0,63546567		
cpr5-2 +1	525969,108	4,5107E+05	5,65424172
cpr5-2 +2	424589		
cpr5-2 +3	445086,441		
cpr5-2 +4	529701,271		
cpr5-2 +5	329992,631		
cpr5-2 AS1	35,3742277	2,2306E+03	3,34842983
cpr5-2 AS2	0,16952968		
cpr5-2 AS3	8883,03725		
cpr5-2 AS4	3,98603081		

p58 ^{ipk} C-1	-0,0030597	-1,0199E-03	
p58 ^{ipk} C-2	0,00101992		
p58 ^{ipk} +1	461477,474	5,3492E+05	5,7282883
p58 ^{ipk} +2	709020,666		
p58 ^{ipk} +3	341370,867		
p58 ^{ipk} +4	696811,327		
p58 ^{ipk} +5	465916,337		

dcl2/4 C-1	-0,003418	0,0000E+00	
dcl2/4 C-2	0,00341803		
dcl2/4 +1	352227,633	4,2036E+05	5,62362232
dcl2/4 +2	307050,649		
dcl2/4 +3	620811,789		
dcl2/4 +4	410384,669		
dcl2/4 +5	411329,789		

dbp2 C-1	0,1368004	-1,1102E-16	
dbp2 C-2	-0,1368004		
dbp2 +1	660116,638	7,0532E+05	5,84838598
dbp2 +2	505913,364		
dbp2 +3	1052781,37		
dbp2 +4	622124,307		
dbp2 +5	685662,559		
dbp2 AS1	103515,186	1,3867E+05	5,14198372
dbp2 AS2	158276,348		
dbp2 AS3	147671,531		
dbp2 AS4	145218,474		

dip2 C-1	2,20182951	0,0000E+00	
dip2 C-2	-2,2018295		
dip2 +1	391570,268	4,7929E+05	5,68059396
dip2 +2	400295,413		
dip2 +3	447010,78		
dip2 +4	646784,784		
dip2 +5	510764,425		
dip2 AS1	130274,827	7,3019E+04	4,86343643
dip2 AS2	-1,7647845		
dip2 AS3	88784,2136		

pad4 C-1	-0,1274179	-4,2473E-02	
pad4 C-2	0,04247264		
pad4-1 +1	324252,165	3,1824E+05	5,50275143
pad4-1 +2	248959,686		
pad4-1 +3	484530,69		
pad4-1 +4	331111,778		
pad4-1 +5	202333,446		
pad4-1 AS1	95064,9104	1,1187E+05	5,04869626

pad 4-1 AS2	128666,137		
-------------	------------	--	--

eds5-1 C-1	-0,0286894	0,0000E+00	
eds5-1 C-2	0,02868941		
eds5-1 +1	164141,738	2,2079E+05	5,34397348
eds5-1 +2	284926,94		
eds5-1 +3	174593,519		
eds5-1 +4	284392,952		
eds5-1 +5	195879,805		
eds5-1 AS1	111090,617	1,1109E+05	5,04567738

npr1-1 C-1	-0,0022922	5,7306E-04	
npr1-1 C-2	0,00343836		
npr1-1 +1	165372,159	1,4691E+05	5,16704739
npr1-1 +2	249430,114		
npr1-1 +3	127994,173		
npr1-1 +4	103776,976		
npr1-1 +5	87969,8643		

coi1-40 C-1	1,31467715	0,0000E+00	
-------------	------------	------------	--

coi1-40 C-2	-1,3146772		
coi1-40 +1	121692,48	8,6510E+04	4,93706522
coi1-40 +2	56792,7199		
coi1-40 +3	42587,0839		
coi1-40 + 4	89970,3981		
coi1-40 +5	121506,235		
coi1-40 AS1	110462,46	1,1046E+05	5,04321471

etr1-1 C-1	-0,0016563	-2,7605E-04	
etr1-1 C-2	0,0011042		
etr1-1 +1	75217,2316	1,3305E+05	5,12402303
etr 1-1 +2	78805,5197		
etr1-1 +3	111869,426		
etr1-1 +4	257242,346		
etr1-1 +5	142127,96		
etr1-1 AS1	54823,8206	1,7817E+05	5,25083882
etr1-1 AS2	90121,5409		
etr1-1 AS3	8,3131838		
etr1-1 AS4	701447,292		
etr1-1 AS5	44457,7404		

eds4 C-1	-0,0003169	2,9816E-19	
eds4 C-2	0,00031691		
eds4-1 +1	61769,6111	6,8128E+04	4,83332252
eds4-1 +2	48781,1031		
eds4-1 +3	92272,8022		
eds4-1 +4	53924,0993		
eds4-1 +5	83889,9392		
eds4-1 AS1	87324,0813	1,0006E+05	5,00028209
eds4-1 AS2	112805,867		

dcl2 C-1	0,00024028	-6,0069E-05	
dcl2 C-2	-0,0003604		
dcl2 +1	81248,8592	9,9493E+04	4,99779104
dcl2 +2	122512,067		
dcl2 +3	59301,1008		
dcl2 +4	95579,5126		
dcl2 +5	138821,761		
dcl2 AS1	92747,6965	5,2317E+05	5,7186469
dcl2 AS2	953602,1		

dcl4 C-1	0,01650697	0,0000E+00	
----------	------------	------------	--

dcl4 C-2	-0,016507		
dcl4 +1	109166,41	1,3303E+05	5,12394474
dcl4 +2	103007,311		
dcl4 +3	201261,215		
dcl4 +4	138511,695		
dcl4 +5	113195,943		
dcl4 AS1	715578,783	2,1268E+06	6,32772244
dcl4 AS2	4367344,49		
dcl4 AS3	1157532,06		
dcl4 AS4	2266662,25		

i4g1 C-1	0,00237931	-2,3793E-03	
i4g1 C-2	-0,0071379		
i4g1 +1	133820,066	9,2676E+04	4,96696939
i4g1 +2	43505,4174		
i4g1 +3	91481,1795		
i4g1 +4	96544,8727		
i4g1 +5	98030,712		

i4g1/2 C-1	0,00026912	-1,3456E-04	
i4g1/2 C-2	-0,0005382		

i4g1 i4g2 AS1	57,4378784	5,0313E+01	1,70168214
i4g1 i4g2 AS2	21,0711782		
i4g1 i4g2 AS3	29,0521934		
i4g1 i4g2 AS4	92,5437659		
i4g1 i4g2 AS5	51,4611001		

1.3. Dinámica de expresión

Tabla 14. Datos de infectividad de los genotipos estudiados para dinámica de expresión.

	n	7	8	9	10	11	12	13	14	15	% infección
cpr5-2	57	21	25	33	42	45	48	48	48	48	84,2
eds8-1	53	0	0	0	6	7	12	15	19	19	35,8
hsp90.1	56	1	3	13	23	32	48	54	54	54	96,4
col-0 wt	55	0	0	10	16	31	43	48	54	54	98,2

Tabla 15. Datos de carga de los genotipos estudiados para dinámica de expresión.

Genotipo	dpi	Expresión media	Log expresión	$\Delta\log_{12/7}$
Col-0	7	33324,9985	4,52277014	0,62094768
	9	67088,9424	4,82665095	
	12	139225,189	5,14371782	

	15	185022,437	5,2672244	
hsp90.1	7	34847,4093	4,5421705	0,46330112
	9	60899,6945	4,78461511	
	12	101267,855	5,00547161	
	15	109848,553	5,04079434	
cpr5-2	7	14863,1639	4,17211127	0,65463695
	9	40087,6953	4,60301109	
	12	67103,9707	4,82674822	
	15	82457,1025	4,91622807	
eds8-1	7	23688,8893	4,3745447	0,68041565
	9	81445,0562	4,91086473	
	12	113490,719	5,05496035	

	15	169993,505	5,23043233	
--	----	------------	------------	--

Col-0	7	21961,2577	4,34165721	0,79136265
	9	71341,8342	4,85334427	
	12	135837,556	5,13301986	
	15	106451,384	5,02715131	
dcl2 dcl4	7	11572,0613	4,06341072	0,9492336
	9	43543,7984	4,63892631	
	12	102954,259	5,01264432	
	15	88071,2476	4,94483415	

2. Tablas resultados Experimento de Evolución

2.1. Infectividad en cada pase

Tablas 16-27. Evolución de plantas infectadas entre los 6-12 dpi para cada pase.

mutante	linaje	plantas inoculadas	6 dpi	7dpi	8 dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	14	0	1	3	6	7	13	14	100
	L2	14	0	0	1	3	3	5	9	64,3

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L3	14	0	1	1	3	7	10	13	92,9
	L4	13	0	2	2	3	8	10	13	100
	L5	12	0	0	2	3	3	8	10	71,4
cpr5-2	L1	14	0	1	2	3	3	5	5	35,7
	L2	14	0	0	0	4	4	4	4	28,6
	L3	14	0	0	0	0	3	3	5	35,7
	L4	14	1	1	2	3	4	5	5	35,7
	L5	14	0	0	0	0	1	3	4	28,6
jin1	L1	10	0	5	8	10	10	10	10	100
	L2	10	2	4	10	10	10	10	10	100
	L3	10	0	3	10	10	10	10	10	100
	L4	10	0	3	10	10	10	10	10	100
	L5	10	0	2	6	8	10	10	10	100
eds8-1	L1	12	0	0	0	0	0	0	2	16,7
	L2	12	0	0	0	0	0	2	5	41,7
	L3	12	0	0	0	0	1	5	10	83,3
	L4	12	0	0	0	1	3	4	10	83,3
	L5	12	0	0	0	0	0	1	8	66,7
dcl2/dcl4	L1	10	0	0	3	4	10	10	10	100
	L2	10	0	0	1	3	7	8	10	100
	L3	10	0	0	0	1	9	10	10	100
	L4	10	0	0	0	4	7	9	9	90
	L5	10	0	0	2	6	10	10	10	100
hsp90.1	L1	10	0	0	2	3	3	6	9	90
	L2	10	0	2	3	7	9	9	10	100
	L3	10	0	4	6	7	8	8	10	100
	L4	10	0	1	6	7	8	10	10	100
	L5	10	0	0	0	0	1	2	2	20
i4g2	L1	10	0	0	0	0	1	3	4	40
	L2	10	0	0	0	0	2	3	5	50
	L3	10	0	0	0	0	2	3	7	70
	L4	10	0	0	0	0	2	3	6	60
	L5	10	0	0	0	0	1	2	7	70
dbp2	L1	10	0	0	4	10	10	10	10	100
	L2	10	0	2	3	10	10	10	10	100
	L3	10	0	0	1	3	3	4	6	60

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L4	10	0	0	3	6	8	10	10	100
	L5	12	0	1	5	8	8	10	10	83,3
P58^{ipk}	L1	10	0	0	0	0	6	8	10	100
	L2	10	0	0	0	1	3	7	10	100
	L3	10	0	0	0	3	6	8	9	90
	L4	10	0	1	1	5	8	10	10	100
	L5	10	0	1	1	3	6	9	10	100

mutante	linaje	plantas inoculadas	6 dpi	7dpi	8 dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	0	2	5	6	6	6	60
	L2	10	0	1	2	4	5	6	6	60
	L3	10	0	0	1	3	4	6	6	60
	L4	10	0	0	1	5	6	6	6	60
	L5	10	0	0	3	5	5	5	5	50
cpr5-2	L1	14	0	1	4	4	4	4	4	28,6
	L2	14	0	0	3	3	3	3	3	21,4
	L3	14	0	1	2	2	2	2	2	14,3
	L4	14	2	4	5	8	9	9	9	64
	L5	14	0	0	1	2	2	2	2	14,3
jin1	L1	8	1	4	6	6	6	7	7	87,5
	L2	8	2	4	7	7	7	7	7	87,5
	L3	8	3	8	8	8	8	8	8	100
	L4	8	1	5	8	8	8	8	8	100
	L5	8	2	8	8	8	8	8	8	100
eds8-1	L1	14	0	0	0	1?	1? 2	2	3	21,4
	L2	14	0	0	0	0	2	5	6	42,9
	L3	12	0	0	0	0	3	5	6	42,9
	L4	10	0	0	0	1	3	6	8	80
	L5	12	0	0	0	2	2	2	4	33,3
dcl2/dcl4	L1	10	1	2	7	10	10	10	10	100
	L2	10	0	0	1	2	4	5	5	50
	L3	10	0	1	5	8	8	9	9	90
	L4	10	0	0	2	6	7	7	7	70
	L5	10	0	2	6	8	8	8	9	90

MATERIAL SUPLEMENTARIO

hsp90.1	L1	8	0	0	1	3	4	4	4	50
	L2	8	0	1	2	3	5	6	6	75
	L3	8	1	3	5	6	6	8	8	100
	L4	8	0	1	2	3	5	7	8	100
	L5	16	0	0	1	6	8	11	13	81,3
i4g2	L1	10	0	0	0	0	1	1	1	10
	L2	10	0	0	0	0	0	0	1	10
	L3	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	L4	10	0	0	0	0	2	3	3	30
	L5	10	0	0	0	0	1	4	4	40
dbp2	L1	10	0	2	6	6	6	6	6	60
	L2	10	0	0	2	2	3	4	7	70
	L3	14	0	0	1	9	10	10	10	71
	L4	10	0	1	2	2	3	4	4	40
	L5	10	0	2	0	9	10	10	10	100
P58^{ipk}	L1	10	0	1	1	4	7	9	9	90
	L2	10	0	0	2	5	7	8	8	80
	L3	10	0	0	2	2	7	8	8	80
	L4	10	0	0	2	3	6	8	8	80
	L5	10	0	0	2	2	5	7	7	70

Mutante	linaje	plantas inoculadas	5 dpi	6dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	14	1	2	2	5	7	8	9	9	64,3
	L2	14	0	0	1	3	6	6	8	8	57,1
	L3	14	0	0	1	1	1	2	5	8	57,1
	L4	14	0	0	1	1	3	3	6	7	50,0
	L5	14	0	2	3	3	4	5	9	10	71,4
cpr5-2	L1	14	0	0	1	3	5	6	6	7	50,0
	L2	14	0	0	2	4	4	4	4	4	28,6
	L3	14	0	0	1	3	3	3	6	7	50,0
	L4	14	0	0	2	3	5	5	7	7	50,0
	L5	14	0	0	3	5	5	5	5	6	42,9
jln1	L1	14	1	2	4	6	7	8	10	10	71,4
	L2	14	1	6	11	14	14	14	14	14	100,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L3	14	1	4	9	13	13	13	14	14	100,0
	L4	14	0	3	10	12	12	12	12	12	85,7
	L5	14	0	4	9	11	12	13	13	13	92,9
eds8-1	L1	14	0	0	0	1	3	3	4	4	28,6
	L2	14	0	0	0	0	0	1	4	4	28,6
	L3	14	0	0	0	0	1	1	4	4	28,6
	L4	14	0	0	1	1	3	3	6	6	42,9
	L5	14	0	0	1	1	2	3	6	6	42,9
dcl2/dcl4	L1	14	0	6	13	14	14	14	14	14	100,0
	L2	14	0	2	9	13	13	14	14	14	100,0
	L3	14	0	0	6	8	9	9	9	9	64,3
	L4	14	0	2	6	8	9	9	9	9	64,3
	L5	14	0	3	6	10	10	10	10	12	85,7
hsp90.1	L1	12	0	0	0	5	7	8	9	9	75,0
	L2	12	0	0	0	5	6	6	7	9	75,0
	L3	12	0	0	4	7	7	7	9	9	75,0
	L4	12	0	0	3	8	8	9	11	12	100,0
	L5	14	0	0	8	12	12	12	12	12	85,7
i4g2	L1	14	0	1	1	3	3	3	4	4	28,6
	L2	14	0	0	0	0	1	1	1	1	7,1
	L3	14	0	0	0	1	3	3	4	4	28,6
	L4	14	0	1	1	1	1	1	2	2	14,3
	L5	16	1	1	1	2	3	4	7	7	43,8
dbp2	L1	14	0	0	4	7	8	10	12	12	85,7
	L2	14	0	0	4	6	7	9	10	10	71,4
	L3	18	0	0	1	1	2	4	6	7	38,9
	L4	14	0	0	1	1	3	4	5	6	42,9
	L5	14	0	0	4	7	8	8	9	9	64,3
P58^{ipk}	L1	12	0	0	0	4	4	4	5	6	50,0
	L2	12	0	3	3	4	6	6	8	8	66,7
	L3	12	0	0	0	1	1	2	3	3	25,0
	L4	12	0	1	2	3	4	5	7	7	58,3
	L5	12	0	1	1	3	3	3	5	5	41,7

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Mutante	linaje	plantas inoculadas	5 dpi	6dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	14	0	2	4	6	7	9	10	10	71,4
	L2	14	0	2	7	11	12	14	14	14	100,0
	L3	14	0	1	3	4	5	8	9	9	64,3
	L4	16	0	2	7	13	13	14	15	15	93,8
	L5	14	0	3	6	11	11	11	14	14	100,0
cpr5-2	L1	14	0	0	2	3	3	3	3	4	28,6
	L2	18	0	0	0	0	0	0	2	3	16,7
	L3	14	0	0	6	7	7	8	9	9	64,3
	L4	14	0	0	2	3	3	5	6	7	50,0
	L5	14	0	0	2	2	4	5	5	5	35,7
jln1	L1	18	4	5	15	17	17	18	18	18	100,0
	L2	14	0	4	13	13	13	13	13	13	92,9
	L3	14	0	1	11	14	14	14	14	14	100,0
	L4	16	2	3	15	15	16	16	16	16	100,0
	L5	14	2	4	13	14	14	14	14	14	100,0
eds8-1	L1	13	0	0	1	1	3	9	10	11	84,6
	L2	16	0	1	1	2	5	9	11	13	81,3
	L3	16	1	1	2	3	7	9	14	16	100,0
	L4	18	0	0	1	4	6	14	15	18	100,0
	L5	14	0	0	2	3	5	10	13	14	100,0
dcl2/dcl4	L1	14	3	11	13	14	14	14	14	14	100,0
	L2	14	0	6	12	14	14	14	14	14	100,0
	L3	18	1	2	8	14	18	18	18	18	100,0
	L4	16	0	8	14	15	15	16	16	16	100,0
	L5	14	0	2	7	8	9	11	11	11	78,6
hsp90.1	L1	14	1	5	10	11	12	12	13	13	92,9
	L2	14	0	1	9	9	10	12	12	12	85,7
	L3	16	0	2	11	14	15	16	16	16	100,0
	L4	12	0	3	10	11	11	11	11	11	91,7
i4g2	L5	14	1	6	13	14	14	14	14	14	100,0
	L1	14	0	1	2	3	5	7	9	9	64,3
	L2	18	1	2	3	3	3	11	13	13	72,2
	L3	14	1	2	5	7	7	11	11	11	78,6
	L4	18	0	4	5	5	10	15	15	15	83,3

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dbp2	L5	14	1	4	4	5	7	10	10	10	71,4
	L1	14	0	5	12	14	14	14	14	14	100,0
	L2	14	0	3	10	13	13	13	14	14	100,0
	L3	18	1	4	17	18	18	18	18	18	100,0
	L4	14	1	7	10	14	14	14	14	14	100,0
P58^{ipk}	L5	16	1	5	11	13	15	15	15	15	93,8
	L1	16	1	6	13	16	16	16	16	16	100,0
	L2	14	1	1	4	6	6	8	10	10	71,4
	L3	18	0	4	8	15	16	17	17	17	94,4
	L4	14	0	1	5	10	10	12	12	12	85,7
	L5	14	0	1	3	9	9	9	9	9	64,3

Mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	1	6	7	8	9	9	10	10	100,0
	L2	10	0	0	4	6	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	3	5	6	8	9	10	10	100,0
	L4	10	0	1	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	4	5	7	9	9	9	10	100,0
cpr5-2	L1	10	0	0	5	7	9	9	9	9	9	90,0
	L2 (#5)	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	L3	10	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	15	0	0	7	11	11	11	12	12	14	93,3
jin1	L1	10	1	2	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	6	6	8	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	7	8	9	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	9	0	0	1	2	2	7	7	8	9	100,0
	L2	10	0	0	0	2	3	6	7	9	10	100,0
	L3	9	0	0	0	2	3	5	8	8	9	100,0
	L4	10	0	0	0	2	2	4	5	7	10	100,0
	L5	10	0	0	0	1	1	5	6	8	9	90,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dcl2/dcl4	L1	10	0	5	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	2	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	7	7	9	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	4	7	8	8	10	10	10	100,0
hsp90.1	L1	10	0	1	8	8	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	3	4	5	6	8	8	10	100,0
	L3	10	0	0	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	9	9	9	9	9	9	10	100,0
	L5	10	0	0	8	10	10	10	10	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	0	4	7	9	9	9	9	10	100,0
	L2	10	0	0	1	2	2	3	4	4	4	40,0
	L3	10	0	0	5	8	8	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	7	7	8	9	9	10	10	100,0
	L5	10	0	0	3	8	8	8	8	9	10	100,0
dbp2	L1	10	0	0	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	6	6	9	9	9	9	9	90,0
	L4	10	0	1	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	7	9	9	10	10	10	100,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	5	8	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	3	5	7	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	2	4	6	8	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	3	6	6	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	7	9	10	10	10	10	100,0

Mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	2	7	8	9	9	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	4	7	8	9	9	10	10	100,0
	L3	10	0	1	6	9	9	9	0	10	10	100,0
	L4	10	0	1	9	9	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	4	6	6	6	8	9	9	90,0
cpr5-2	L1	10	0	0	6	8	8	8	8	8	9	90,0
	L3	10	0	0	5	9	9	9	9	10	10	100,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L4	10	0	0	7	8	9	9	9	9	10	100,0
	L5	10	0	0	7	8	8	9	9	10	10	100,0
jin1	L1	10	0	1	8	9	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	1	2	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	3	8	9	9	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	2	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	1	9	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	0	2	2	2	6	8	9	90,0
	L2	10	0	1	3	3	5	5	6	7	8	80,0
	L3	10	0	1	2	4	6	6	8	10	10	100,0
	L4	10	0	0	2	3	3	5	7	8	9	90,0
	L5	10	0	0	1	2	3	3	6	10	10	100,0
dcl2/dcl4	L1	10	0	0	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	8	8	8	8	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	10	10	10	10	10	10	10	100,0
hsp90.1	L1	10	0	0	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	3	5	6	8	9	10	10	100,0
	L3	10	0	0	8	9	9	9	9	10	10	100,0
	L4	10	0	1	4	9	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	9	9	10	10	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	1	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	4	5	7	7	7	8	8	80,0
	L3	10	0	0	7	8	8	8	8	8	9	90,0
	L4	10	0	0	8	8	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
dbp2	L1	10	0	1	6	8	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	1	1	3	5	7	9	9	10	10	100,0
	L3	10	0	0	3	7	7	8	9	10	10	100,0
	L4	10	0	0	6	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	4	7	7	9	10	10	10	100,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	1	6	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	2	8	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	2	8	9	9	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	3	7	7	8	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	2	6	7	8	10	10	10	100,0

Mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	0	0	3	6	7	7	9	9	90,0
	L2	10	0	0	0	3	5	8	8	9	9	90,0
	L3	10	0	0	1	6	9	9	9	9	9	90,0
	L4	10	0	1	4	7	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	7	7	8	8	9	10	100,0
cpr5-2	L1	10	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	9	9	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100,0
jin1	L1	10	0	1	2	8	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	1	2	8	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	5	8	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	1	3	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	0	0	1	1	1	3	3	30,0
	L2	10	0	0	0	0	1	2	3	6	6	60,0
	L3	10	0	0	0	0	1	2	3	4	4	40,0
	L4	10	0	0	0	0	1	2	3	5	5	50,0
	L5	9	0	0	0	0	2	2	5	6	7	77,8
dcl2/dcl4	L1	10	0	0	2	4	5	5	5	5	5	50,0
	L2	10	0	1	3	6	7	7	7	7	8	80,0
	L3	10	0	0	4	8	9	9	9	9	9	90,0
	L4	10	0	0	1	3	5	5	6	6	7	70,0
	L5	10	1	2	7	9	10	10	10	10	10	100,0
hsp90.1	L1	10	0	0	2	2	3	6	7	10	10	100,0
	L2	10	0	0	0	0	2	5	6	6	8	80,0
	L3	10	0	0	0	4	8	9	9	9	9	90,0
	L4	10	0	0	0	0	4	6	7	9	9	90,0
	L5	10	0	0	1	2	9	9	9	9	9	90,0
i4g2	L1	10	0	0	1	2	3	4	4	5	6	60,0
	L2	10	0	0	1	1	1	3	3	4	5	50,0
	L3	10	0	0	0	0	2	2	4	5	8	80,0
	L4	10	0	0	1	1	5	5	6	8	8	80,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L5	10	0	0	1	3	5	5	7	7	8	80,0
dbp2	L1	10	0	0	2	7	7	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	2	6	7	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	2	4	5	7	7	8	8	80,0
	L4	10	0	0	0	3	6	8	8	8	8	80,0
	L5	10	0	0	1	3	4	5	6	6	6	60,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	1	5	7	8	8	8	8	80,0
	L2	10	0	0	0	0	3	3	6	7	7	70,0
	L3	10	0	0	0	2	4	5	7	9	9	90,0
	L4	10	0	0	0	1	2	2	6	7	7	70,0
	L5	10	0	0	0	1	4	4	7	7	7	70,0

mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	0	3	4	6	6	7	8	9	90,0
	L2	10	0	1	5	7	7	7	8	10	10	100,0
	L3	10	0	0	2	6	6	7	9	9	9	90,0
	L4	10	0	2	4	4	6	6	6	6	6	60,0
	L5	10	0	0	1	4	6	6	6	6	6	60,0
cpr5-2	L1	10	0	0	2	8	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	8	10	10	10	10	10	100,0
jin1	L1	10	0	2	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	1	2	5	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	1	3	6	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	1	4	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	4	9	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	0	2	3	4	7	8	10	100,0
	L2	10	0	0	0	0	1	3	6	10	10	100,0
	L3	10	0	0	0	0	0	2	7	10	10	100,0
	L4	10	0	0	0	0	0	1	4	9	10	100,0
	L5	10	0	0	0	2	2	3	7	8	10	100,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dcl2/dcl4	L1	10	1	4	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	6	8	9	9	9	10	10	100,0
	L3	10	0	2	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	3	5	5	8	10	10	10	100,0
	L5	10	0	2	5	10	10	10	10	10	10	100,0
hsp90.1	L1	10	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	1	3	8	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	1	5	8	8	9	9	9	90,0
	L4	10	0	1	4	7	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	1	4	7	9	10	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	0	1	4	4	4	4	5	5	50,0
	L2	10	0	0	0	1	1	1	1	2	2	20,0
	L3	10	0	0	0	0	1	2	4	5	5	50,0
	L4	10	0	0	0	0	0	0	1	1	1	10,0
	L5	10	0	0	0	0	0	0	1	1	3	30,0
dbp2	L1	10	1	2	3	7	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	4	7	7	8	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	1	4	5	7	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	1	7	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	2	7	7	9	10	10	10	100,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	1	4	8	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	1	3	4	8	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	2	6	8	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	0	0	5	6	8	9	9	90,0
	L5	10	0	0	4	6	9	9	10	10	10	100,0

mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	3	5	8	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	5	6	7	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	2	3	5	7	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	3	6	9	9	9	9	9	90,0
	L5	10	0	1	3	4	7	10	10	10	10	100,0
cpr5-2	L1	10	0	0	5	8	9	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	4	9	9	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

	L5	10	0	0	2	8	10	10	10	10	10	100,0
jin1	L1	10	0	4	9	9	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	2	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	1	6	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	3	9	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	0	0	1	5	8	10	10	100,0
	L2	10	0	0	0	0	1	3	4	7	8	80,0
	L3	10	0	0	0	0	1	7	8	10	10	100,0
	L4	10	0	0	0	0	2	6	8	10	10	100,0
	L5	10	0	0	0	0	1	5	6	9	9	90,0
dcl2/dcl4	L1	10	1	5	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	6	8	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	2	5	6	6	9	9	9	9	90,0
	L4	9	0	1	3	5	7	7	8	8	8	88,9
	L5	10	0	0	2	2	3	4	5	5	5	50,0
hsp90.1	L1	10	0	0	5	5	5	6	7	7	7	70,0
	L2	10	0	0	1	2	5	8	9	9	9	90,0
	L3	10	0	0	2	7	8	9	9	9	9	90,0
	L4	10	0	0	4	6	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	4	4	8	9	9	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	0	2	3	4	9	9	9	9	90,0
	L2	10	0	0	1	1	3	8	9	9	9	90,0
	L3	10	0	0	1	2	4	8	8	8	8	80,0
	L4	10	0	0	1	3	3	8	8	8	8	80,0
	L5	10	0	0	1	1	1	2	2	3	3	30,0
dbp2	L1	10	0	0	5	7	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	5	6	9	9	9	9	9	90,0
	L3	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	5	7	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	3	5	7	8	8	9	8	80,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	6	7	7	8	8	8	8	80,0
	L2	10	0	0	3	6	9	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	6	8	9	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	3	7	8	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	5	9	9	10	10	10	10	100,0

mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	0	4	8	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	4	9	9	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	4	7	9	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	7	8	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
cpr5-2	L1	10	0	0	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	4	7	7	8	8	9	9	90,0
	L5	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
jin1	L1	10	1	8	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	1	7	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	7	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	9	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	8	9	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	2	2	4	5	8	9	9	90,0
	L2	10	0	0	2	2	3	4	6	8	9	90,0
	L3	10	0	0	1	2	4	6	9	10	10	100,0
	L4	10	0	0	0	0	4	5	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	1	2	4	4	10	10	10	100,0
dcl2dcl4	L1	10	3	8	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	2	5	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	6	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	3	7	9	9	9	9	9	9	90,0
	L5	10	0	3	5	5	7	7	7	7	7	70,0
hsp90.1	L1	10	0	0	6	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	1	9	9	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	1	5	9	9	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	2	8	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	1	6	10	10	10	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	2	5	7	9	9	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	4	7	9	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	2	5	6	8	8	10	10	10	100,0
	L5	10	0	2	5	7	7	7	8	8	8	80,0

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dbp2	L1	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	4	8	8	8	9	9	9	90,0
	L3	10	0	1	5	8	8	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	3	8	9	9	10	10	10	100,0
	L5	10	0	2	7	8	10	10	10	10	10	100,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	5	7	7	8	8	8	9	90,0
	L2	10	0	0	1	8	8	8	8	8	8	80,0
	L3	10	0	0	5	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	1	4	5	5	5	7	7	70,0
	L5	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0

mutante	linaje	plantas inoculadas	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8dpi	9dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección
npr1-1	L1	10	0	0	3	7	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	1	6	9	9	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	5	9	9	9	9	10	10	100,0
	L4	10	0	1	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	6	10	10	10	10	10	10	100,0
cpr5-2	L1	10	0	0	5	7	8	9	9	9	9	90,0
	L3	10	0	0	5	8	9	9	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	5	9	9	9	9	9	10	100,0
	L5	10	1	1	9	10	10	10	10	10	10	100,0
jin1	L1	10	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	2	4	10	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	1	3	9	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	1	5	10	10	10	10	10	10	10	100,0
eds8-1	L1	10	0	0	1	5	8	8	9	9	10	100,0
	L2	10	0	0	1	2	4	5	9	10	10	100,0
	L3	10	0	0	4	6	8	9	9	10	10	100,0
	L4	10	0	0	0	3	6	6	6	9	9	90,0
	L5	10	0	0	1	3	7	7	9	10	10	100,0
dcl2dcl4	L1	10	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	1	2	6	10	10	10	10	10	10	100,0

	L4	10	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	1	7	10	10	10	10	10	10	100,0
hsp90.1	L1	10	0	0	7	8	9	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	5	9	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	7	9	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100,0
i4g2	L1	10	0	0	3	8	9	9	9	9	9	90,0
	L2	10	0	1	5	8	9	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	1	6	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	1	3	9	9	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	2	5	9	10	10	10	10	10	100,0
dbp2	L1	10	0	0	9	9	10	10	10	10	10	100,0
	L2	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	8	10	10	10	10	10	10	100,0
	L4	10	0	0	6	7	10	10	10	10	10	100,0
	L5	10	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100,0
P58^{ipk}	L1	10	0	0	5	7	7	9	9	10	10	100,0
	L2	10	0	0	2	4	7	9	10	10	10	100,0
	L3	10	0	0	4	6	8	9	9	9	10	100,0
	L4	10	0	0	2	3	5	7	7	7	7	70,0
	L5	10	0	0	4	5	6	8	8	10	10	100,0
cpr 5-2	TuMV anc.	7	0	0	0	3	4	5	6	6	6	85,7

3. Tablas y figuras experimento de evolución

Tabla 28. Título viral de los linajes ancestrales en npr 1-1 a pase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
npr1-1 L1	6299897,5	71752,8189	96239,8041	4,98335473
npr1-1 L2	12000982	126060,735		
npr1-1 L3	10940014	95130,5565		
npr1-1 L4	10062435,8	104382,114		
npr1-1 L5	9729244,33	83872,796		



fig. 66. Plantas del genotipo npr 1-1 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 29. Título viral de los linajes evolucionados en npr 1-1 a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
npr1-1 L1	10831188	99186,7033	122648,517	5,0886623
npr1-1 L2	9465339	84211,2011		
npr1-1 L3	15443333,3	155678,763		
npr1-1 L4	11749658,3	111265,704		
npr1-1 L5	15051979,7	162900,213		



fig. 67. Plantas del genotipo npr 1-1 infectadas a fase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla. 30. Título viral de los linajes evolucionados en npr 1-1 a fase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
npr1-1 L1	22806054,7	245754,899	275917,446	5,44077916
npr1-1 L2	24124237,3	236512,131		
npr1-1 L3	33088842,7	321250,9		
npr1-1 L4	30176217,3	347652,273		
npr1-1 L5	23389903,3	228417,025		

3.1. Resultados *cpr5-2*

Tabla 31. Título viral de los linajes evolucionados en cpr 5-2 a fase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
cpr5-2 L1	17522369,7	169461,989	128765,741	5,10980033
cpr5-2 L2				
cpr5-2 L3	12170343,3	136745,431		
cpr5-2 L4	12977855	126243,726		
cpr5-2 L5	8773375,33	82611,8205		



fig. 68. Plantas del genotipo cpr 5-2 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 32. Título viral de los linajes evolucionados en cpr 5-2 a pase 5.				
Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
cpr5-2 L1	18706852	205569,802	198773,191	5,29835781
cpr5-2 L2				
cpr5-2 L3	17606427,3	172274,24		
cpr5-2 L4	27003217,3	267358,587		
cpr5-2 L5	12590771,3	149890,135		



fig. 69. Plantas del genotipo cpr 5-2 infectadas a pase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 33. Título viral de los linajes evolucionados en cpr 5-2 a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
cpr5-2 L1	18246790,3	169895,627	179496,472	5,25405592
cpr5-2 L2				
cpr5-2 L3	22039716	218215,01		
cpr5-2 L4	19012208,3	180381,483		
cpr5-2 L5	13484338	149493,769		

3.2. Resultados *jin1*

El título viral en este genotipo tiene variaciones negativas a lo largo del experimento entre los pases 0 y 5. El cambio promedio $\Delta\log$ entre los pases 5 y 0 es de -0,143 y entre los pases 12 y 5 es de 0,134; que es un aumento positivo de la carga pero menor que en el primer tramo del experimento, lo que hace que el cambio en la carga del experimento globalment sea ligeramente negativo, en concreto, -0,010 (Tablas 19-21).

Tabla 34. Título viral de los linajes evolucionados en jin1 a pase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
jin1 L1	18988999,3	179820,069	235559,437	5,37210051
jin1 L2	34914528,7	306267,795		
jin1 L3	30138659,3	327594,123		
jin1 L4	16655060,7	187980,369		
jin1 L5	15570319	176134,83		



fig. 70. Plantas del genotipo jin1 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla. 35. Título viral de los linajes evolucionados en jin1 a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
jin 1 L1	19153019	207283,755	169090,694	5,22811971
jin 1 L2	23812108,7	216868,021		
jin 1 L3	23094275,3	197050,131		
jin 1 L4	12075809	102511,112		
jin 1 L5	10445330,5	121740,449		



fig. 71. Plantas del genotipo jin1 infectadas a fase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 36. Título viral de los linajes evolucionados en jin1 a fase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
jin1 L1	25915523,3	258637,957	230053,065	5,36182802
jin1 L2	24255926	242559,26		
jin1 L3	23915239,3	253339,4		
jin1 L4	18995987,7	167809,078		
jin1 L5	24296232,7	227919,631		

3.3. Resultados *eds8-1*

Tabla 37. Título viral de los linajes evolucionados en eds 8-1 a fase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
eds8-1 L1	36358546,7	333564,648	296144,617	5,4715038
eds8-1 L2	23222870	213053,853		
eds8-1 L3	25119850,7	284161,207		
eds8-1 L4	33095092,7	366907,901		
eds8-1 L5	30398010	283035,475		



fig. 72. Plantas del genotipo eds 8-1 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 38. Título viral de los linajes evolucionados en eds 8-1 a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
eds8-1 L1	13076122,7	130240,266	126953,484	5,10364462
eds8-1 L2	12609498,7	127111,882		
eds8-1 L3	15329532,7	170707,491		
eds 8-1 L4	9817005	121799,069		
eds8-1 L5	9373921,67	84908,7107		



fig. 73. Plantas del genotipo eds 8-1 infectadas a fase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 39. Título viral de los linajes evolucionados en eds 8-1 a fase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
eds8-1 L1	36886849,3	334726,4	284911,936	5,45471064
eds8-1 L2	23871251,3	238236,041		
eds8-1 L3	23444622,7	227617,696		
eds8-1 L4	33769196	416903,654		
eds8-1 L5	22695517,3	207075,888		

3.4. Resultados *dcl2dcl4*

Tabla 40. Título viral de los linajes evolucionados en dcl2 dcl4 a fase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dcl2dcl4 L1	13264377,2	150389,764	181351,974	5,25852229
dcl2dcl4 L2	23507794,3	231375,928		
dcl2dcl4 L3	13659303	134177,829		
dcl2dcl4 L4	23275990	239464,918		
dcl2dcl4 L5	12289736,3	151351,433		



fig. 74. Plantas del genotipo dcl2 dcl4 infectadas a fase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 41. Título viral de los linajes evolucionados en dcl2 dcl4 a fase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dcl2dcl4 L1	28552515,3	267345,649	235572,162	5,37212397
dcl2dcl4 L2	23463223,3	237963,725		
dcl2dcl4 L3	19043089,3	213967,296		
dcl2dcl4 L4	28085706,7	253481,107		
dcl2dcl4 L5	16941510,7	205103,035		



fig. 75. Plantas del genotipo dcl2 dcl4 infectadas a pase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 42. Título viral de los linajes evolucionados en dcl2 dcl4 a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dcl2dcl4 L1	35778522	383889,721	245011,328	5,38918616
dcl2dcl4 L2	24034025,3	248285,386		
dcl2dcl4 L3	21729584	267605,714		
dcl2dcl4 L4	16493026,7	166260,349		
dcl2dcl4 L5	15360894,3	159015,469		

3.5. Resultados *hsp90.1*

Tabla 43. Título viral de los linajes evolucionados en *hsp 90.1* a pase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
hsp90.1 L1	13954793,7	137080,488	146842,048	5,16685043
hs90.1 L2	10716403,7	112096,273		
hsp 90.1 L3	14691434	157295,867		
hsp90.1 L4	11469889	132753,345		
hsp90.1 L5	19459430	194984,269		



fig. 76. Plantas del genotipo *hsp 90.1* infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 44. Título viral de los linajes evolucionados en *npr 1-1* a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
hsp90.1 L1	19891032,3	231291,074	203559,41	5,30869118
hsp90.1 L2	20104177,3	180144,958		
hsp90.1 L3	24048430,7	278338,318		
hsp90.1 L4	18591574,7	175392,214		
hsp90.1 L5	14347265,7	152630,486		



fig. 77. Plantas del genotipo hsp90.1 infectadas a pase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 45. Título viral de los linajes evolucionados en hsp 90.1 a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
hsp90.1 L1	33838575,3	346706,714	323358,047	5,50968367
hsp90.1 L2	24086391,3	276220,084		
hsp90.1 L3	33302195,3	361980,384		
hsp90.1 L4	34677911,3	372080,594		
hsp90.1 L5	22602814	259802,46		

3.6. Resultados *i4g2*

El título viral en *i4g2* ha aumentado a lo largo de los pases de forma similar a los linajes evolucionados en npr1-1, hsp 90.1 y dcl2 dcl4. El cambio promedio $\Delta\log$ entre los pases 5 y 0 es de 0,191 y entre los pases 12 y 5 es de 0,036; siendo el total de 0,227 (Tablas 31-33). En este caso, el aumento principal se produce entre los pases 0 y 5 del experimento, algo que no sucede en otros genotipos.

Tabla 46. Título viral de los linajes evolucionados en i4g2 a pase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
i4g2 L1	11454686	110566,467	128488,616	5,10886465
i4g2 L2	13156804	130523,849		
i4g2 L3	17983750,3	172258,145		
i4g2 L4	13232385,5	129984,14		
i4g2 L5	11021085	99110,4766		



fig. 78. Plantas del genotipo i4g2 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 47. Título viral de los linajes evolucionados en i4g2 a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
i4g2 L1	28308119,3	260184,92	199585,848	5,30012974
i4g2 L2	16175297,3	156434,21		
i4g2 L3	19371961	190668,907		
i4g2 L4	26101184	252429,246		
i4g2 L5	15452096,7	138211,956		



fig. 79. Plantas del genotipo i4g2 infectadas a pase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 48. Título viral de los linajes evolucionados en i4g2 a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
i4g2 L1	15549276,3	182503,243	216808,251	5,33607581
i4g2 L2	27208899,3	295107,368		
i4g2 L3	22149359,3	255176,951		
i4g2 L4	21521162,7	190116,278		
i4g2 L5	16790518,5	161137,414		

3.7. Resultados *dbp2*

El título viral en *dbp2* ha disminuido a lo largo de los pases, especialmente en el segundo tramo del experimento (pases 7-12). El cambio promedio $\Delta\log$ entre los pases 5 y 0 es de 0,046 y entre los pases 12 y 5 es de -0,119; siendo el total de -0,072 (Tablas 34-36). El comportamiento del virus es parecido al de los linajes en *jin1* y *eds* 8-1.

Tabla 49. Título viral de los linajes evolucionados en dbp2 a pase 0.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dbp2 L1	22951072	286888,4	198045,788	5,29676561
dbp2 L2	25218544	239265,123		
dbp2 L3	9246907,67	113598,374		
dbp2 L4	23986906,7	239869,067		
dbp2 L5	12520823	110607,977		



fig. 80. Plantas del genotipo dbp2 infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 50. Título viral de los linajes evolucionados en dbp2 a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dbp2 L1	30731338,7	304874,392	220323,513	5,34306085
dbp2 L2	15518596,3	168680,395		
dbp2 L3	16219395,3	163501,969		
dbp2 L4	23499605,3	214412,457		
dbp2 L5	26115488	250148,352		



fig. 81. Plantas del genotipo dbp2 infectadas a fase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 51. Título viral de los linajes evolucionados en dbp2 a fase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
dbp2 L1	21573135,3	221945,837	167676,685	5,22447268
dbp2 L2	21102709,7	233437,054		
dbp2 L3	14700058	173349,741		
dbp2 L4	14085934,3	129944,044		
dbp2 L5	8703977,17	79706,7506		

3.9. Resultados $p58^{ipk}$

El título viral en $p58^{ipk}$ es el que mayor disminución ha sufrido entre todos los genotipos estudiados, especialmente en el segundo tramo del experimento (pases 7-12). El cambio promedio $\Delta\log$ entre los pases 5 y 0 es de 0,044 y entre los pases 12 y 5 es de -0,290; siendo el total de -0,247 (Tablas 37-39). El comportamiento del virus es parecido al de los linajes en jin1 y eds 8-1, aunque más acusado para este rasgo fenotípico de las poblaciones virales.

Tabla 52. Título viral de los linajes evolucionados en p58^{ipk} a pase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
p58 ^{ipk} L1	20995390,3	199197,252	236805,431	5,37439166
p58 ^{ipk} L2	41824474,7	422469,441		
p58 ^{ipk} L3	16112342	144895,162		
p58 ^{ipk} L4	24120188,7	278524,119		
p58 ^{ipk} L5	15922659,3	138941,181		



fig. 82. Plantas del genotipo p58^{ipk} infectadas a pase 5.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 53. Título viral de los linajes evolucionados en p58^{ipk} a pase 5.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
p58 ^{ipk} L1	16914943,3	211436,792	262244,537	5,41870645
p58 ^{ipk} L2	24557979,3	288917,404		
p58 ^{ipk} L3	30121026,7	284697,795		
p58 ^{ipk} L4	17631670,3	202662,877		
p58 ^{ipk} L5	30409734,7	323507,816		



fig. 83. Plantas del genotipo p58^{ipk} infectadas a fase 12.
De arriba a abajo e izda a dcha: C- y L1 a L5.

Tabla 54. Título viral de los linajes evolucionados en p58^{ipk} a fase 12.

Genotype	Mean genomes	genomes/ng total RNA	Mean load per genotype	Log mean load
p58 ^{ipk} L1	18931056,7	229745,833	134216,982	5,12780747
p58 ^{ipk} L2	11707792,7	136454,46		
p58 ^{ipk} L3	7887404,25	79993,9579		
p58 ^{ipk} L4	8031546	72096,4632		
p58 ^{ipk} L5	13079183,3	152794,198		

4. Tabla mutaciones fijadas en el experimento de evolución

Tabla 55. Mutaciones fijadas en las secuencias consenso de las poblaciones evolucionadas de cada linaje en cada genotipo mutante.

ORF	LINAJE	TIPO DE CAMBIO	CAMBIO NT	CAMBIO CODON	CAMBIO AA	CAMBIO GRUPO AA	SIN./NO SIN.
P1	P58 L4	Único	A233G	CGA → CGG	Arg → Arg	Sin	8 cambios NT 3 Sin 5 no-Sin
	dcl2/dcl4 L1	Único	T289C	GTG → GCG	Val → Ala	no-Sin, hidrofóbicos	
	eds8.1 L3	Único	G298T	GGA → GTA	Gly → Val	no-Sin, hidrofóbicos	
	P58 L1	Único	A490G	GAG → GGG	E Glu → Gly	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico	
	npr1.1 L3	Único	C633T	CCA → TCA	Pro → Ser	no-Sin, pequeño a polar minúsculo	
	eds8.1 L3	Único	T692C	TCT → TCC	Ser → Ser	Sin	
	i4g2 L3	Único	C806T	GAC → GAT	Glu) → Glu	Sin	
	hsp90.1 L4	Único	G1087A	GGA → GAA	Gly → Glu	no-Sin, hidrofóbico a polar cargado	

HC-Pro	dbp2 L4	Único	G1273A	AGT → AAT	Ser → Asn	no-Sin, polar	8 cambios NT 4 Sin 4 no-Sin
	cpr5-2 L4	Único	A1430G	CCA → CCG	Pro → Pro	Sin	
	dbp2 L4	Único	G1512A	GAT → AAT	Glu → Asn	no-Sin, polar cargado a polar	
	dcl2/d cl4 L1	Único	T1520C	TAT → TAC	Tyr → Tyr	Sin	
	jin1 L4	Comp artido	C1760T	CGC → CGT	Arg → Arg	Sin	
	jin1 L5						
	npr1.1 L3	Único	C1916T	ACC → ACT	Thr → Thr	Sin	
	i4g2 L4	Único	G2316A	GTT → ATT	Val → Ile	no-Sin, alifático	
	dbp2 L2	Único	A2493G	ACT → GCT	Thr → Ala	no-Sin, polar a hidrofóbico	
P3	dbp2 L3	Único	C3205T	GCC → GTC	Gly → Val	no-Sin, hidrofóbicos	5 cambios NT 2 Sin 3 no-Sin
	jin1 L4	Comp artido	T3269C	GTT → GTC	Val → Val	Sin	
	jin1 L5						
	cpr5-2 L5	Único	C3541T	ACG → ATG	Thr → Met	no-Sin, polar a hidrofóbico	
	cpr5-2 L5	Único	A3564T	ACG → TCG	Thr → Ser	no-Sin, polars	

6K1	cpr5-2 L5	Único	T3686C	CGT → CGC	Arg → Arg	Sin	2 Sin
	P58 L5	Único	T3743C	TGT → TGC	Cys → Cys	Sin	
CI	dcl2/d cl4 L5	Único	G4032A	GCA → ACA	Ala → Thr	no-Sin, hidrofóbico a polar	19 cambios NT 6 Sin 13 no-Sin
	dcl2/d cl4 L5	Único	G4148A	CGG → CGA	Arg → Arg	Sin	
	cpr5-2 L4	Comp artido	G3269A	GTA → ATA	Val → Ile	no-Sin, alifático	
	cpr5-2 L5						
	npr1.1 L1	Único	A4357G	AAT → AGT	Asn → Ser	no-Sin, polars	
	npr1.1 L3	Único	T4409G	AAT → ATG	Ile → Met	no-Sin, hidrofóbicos	
	i4g2 L5	Único	G4448A	GAG → GAA	Glu → Glu	Sin	
	jin1 L1	Único	C4559T	GAC → GAT	Asp → Asp	Sin	
	jin1 L2	Único	A4674G	ATC → GTC	Ile → Val	no-Sin, hidrofóbicos	
	dcl2/d cl4 L1	Único	A4941G	ATT → GTT	Ile → Val	no-Sin, hidrofóbicos	
	jin1 L1	Único	C4945A	CCA → CAA	Pro → Gln	no-Sin, pequeño a polar	
	cpr5-2 L4	Comp artido	G5183A	TTG → TTA	Leu → Leu	no-Sin, alifático	
	cpr5-2 L5						

	i4g2 L3	Único	G5193T	GCC → TCC	Ala → Ser	no-Sin, hidrofóbico a polar	
	npr1.1 L1	Único	G5213A	GTG → GTA	Val → Val	Sin	
	i4g2 L1	Comp artido	T5372C	GGT → GGC	Gly → Gly	Sin	
	i4g2 L4						
	i4g2 L1	Único	C5193G	GCT → GGT	Ala → Gly	no-Sin, hidrofóbicos	
	P58 L2	Único	T5519C	TGT → TGC	Cys → Cys	Sin	
6K2	jin1 L3	Único	A5900G	GAA → GAG	Glu → Glu	Sin	1 Sin
VPg	eds8.1 L4	Único	C5977T	CAC → TAC	His → Tyr	no-Sin, polar cargado a polar	13 cambios NT 13 no-Sin
	eds8.1 L5	Comp artido	C6219T	CTC → TTC	Leu → Phe	no-Sin, hidrofóbicos	
	hsp90.1 L1						
	dcl2/dcl4 L4						
	dbp2 L1	Comp artido	G6237A	GAT → AAT	Asp) → Asn	no-Sin, polar cargado a polar	
	dbp2 L5						
	i4g2 L2						
	i4g2 L5						

dcl2/d cl4 L2						
dcl2/d cl4 L3						
eds8.1 L4						
P58 L4						
npr1.1 L2						
eds8.1 L2	Único	G6237C	GAT → CAT	Asp → His	no-Sin, negativo a positivo cargado	
cpr5-2 L3	Comp artido	A6238G	GAT → GGT	Glu → Gly	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico	
cpr5-2 L4						
cpr5-2 L5						
npr1.1 L1						
npr1.1 L5						
hsp90. 1 L2						
npr1.1 L4	Único	T6239A	GAT → GAA	Asp → Glu	no-Sin, polar cargado	
i4g2 L3	Comp artido	A6243C	AAT → CAT	Asn → His	no-Sin, polar a polar cargado	
eds8.1 L3						

	dbp2 L1	Comp artido	A6243G	AAT → GAT	Asn → Glu	no-Sin, polar a polar cargado
	dcl2/d cl4 L5					
	P58 L1					
	dbp2 L2	Comp artido	A6244G	AAT → AGT	Asn → Ser	no-Sin, polar
	dbp2 L3					
	dbp2 L4					
	jin1 L3					
	eds8.1 L1	Comp artido	A6247G	GAA → GGA	Glu → Gly	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico
	hsp90.1 L5					
	P58 L2					
	i4g2 L1	Comp artido	T6252C	CGT → TGT	Arg → Cys	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico
	i4g2 L4					
	dcl2/d cl4 L1					
	P58 L3					

	jin1 L1	Comp artido	G6253A	CGT → CAT	Arg → His	no-Sin, polar cargado	
	jin1 L2						
	jin1 L4						
	jin1 L5						
	hsp90. 1 L3	Comp artido	A6261G	AAG → GAG	Lys → Glu	no-Sin, positivo cargado a negativo	
	hsp90. 1 L4						
	cpr5-2 L1						
	npr1.1 L3						
	eds8.1 L4						
	P58 L5						
NlaPro	npr1.1 L4	Único	G6950A	ACG → ACA	Thr → Thr	Sin	4 cambios NT 2 Sin 2 no-Sin
	dcl2/d cl4 L3	Único	A7002T	ATC → TTC	Ile → Phe	no-Sin, hidrofóbicos	
	dcl2/d cl4 L3	Único	G7029A	GAT → AAT	Asp → Asn	no-Sin, polar cargado a polar	
	jin1 L3	Único	C7181T	CTC → CTT	Leu → Leu	Sin	
Nib	i4g2 L5	Único	A7394G	AAA → AAG	Lys → Lys	Sin	7 cambios NT
							4 Sin 3 no-Sin

	eds8.1 L3	Comp artido	C8271T	CTA → TTA	Leu → Leu	Sin	
	eds8.1 L5						
	npr1.1 L5	Único	T8302C	CTT → CCT	Leu → Pro	no-Sin, hidrofóbico a no-hidrof.	
	npr1.1 L5	Único	C8308T ^c	ACT → ATT ^c	Thr → Ile	no-Sin, polar a hidrofóbico	
	dbp2 L3	Único	C8337G	CTG → GTG	Leu → Val	no-Sin, hidrofóbicos	
	i4g2 L1	Único	T8345C	TAT → TAC	Tyr → Tyr	Sin	
	dbp2 L3	Único	G8360A	AGG → AGA	Arg → Arg	Sin	
CP	jin1 L3	Comp artido	G8965A	AGC → AAC	Ser → Asn	no-Sin, polars	6 cambios NT 6 no-Sin
	jin1 L4						
	jin1 L5						
	npr1.1 L4	Único	A9091G	GAC → GGC	Asp → Gly	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico	
	i4g2 L2	Único	A9091C	GAC → GCC	Asp) → Ala	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico	
	cpr5-2 L4	Único	G9224A	ATG → ATA	Met → Ile	no-Sin, hidrofóbicos	
	dbp2 L2	Único	A8308G ^c	GAA → GGA ^c	Glu → Gly	no-Sin, polar cargado a hidrofóbico	
	hsp90.1 L1	Único	C9541T	GCA → GTA	Ala → Val	no-Sin, hidrofóbicos	

5. Resultados de la Matriz de Infección

5.1. Resultados en *npr1-1*

Tabla 56. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	Nº. plantas con síntomas										% infección	Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dp i	5 dp i	6 dp i	7 dp i	8 dp i	9 dp i	10 dp i	11 dp i	12 dp i	Cada planta		media	
<i>npr1-1</i> L1	0	1	3	7	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>npr1-1</i> L2	0	0	3	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>npr1-1</i> L3	0	4	6	10	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>npr1-1</i> L4	0	2	5	9	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>npr1-1</i> L5	0	5	9	10	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>cpr5-2</i> L1	0	0	1	4	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>cpr5-2</i> L3	0	0	0	2	6	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>cpr5-2</i> L4	0	2	4	7	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>cpr5-2</i> L5	0	1	2	4	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>jin1</i> L1	0	0	0	2	4	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8
<i>jin1</i> L2	0	0	0	3	4	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,2,2,2,2	2,6
<i>jin1</i> L3	0	1	4	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>jin1</i> L4	0	3	6	8	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
<i>jin1</i> L5	0	7	7	7	8	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8
<i>eds 8-1</i> L1	0	0	0	1	7	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>eds 8-1</i> L2	0	0	1	2	5	6	7	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3

MATERIAL SUPLEMENTARIO

eds8-1 L3	0	1	7	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L4	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L5	0	5	6	8	9	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L1	0	0	6	6	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L2	0	0	3	5	6	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L3	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L4	0	1	3	9	9	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L5	0	3	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
hsp90.1 L1	0	0	1	2	2	7	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L2	0	0	0	2	4	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L3	0	0	3	5	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L4	0	0	3	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L5	0	0	2	4	8	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2L1	0	0	0	1	6	6	7	7	8	80	3,3,3,3,3,3,3,2,0, 0	2,3
i4 g2L2	0	0	0	1	7	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2L3	0	1	5	6	9	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4 g2L4	0	1	3	5	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4 g2L5	0	1	2	6	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L1	0	0	2	3	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L2	0	0	1	4	9	9	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
dbp2 L3	0	1	7	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L4	0	0	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L5	0	4	8	8	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9

p58 ^{IPK} L1	0	0	1	3	7	8	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
p58 ^{IPK} L2	0	0	0	1	5	8	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
p58 ^{IPK} L3	0	1	5	7	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8
p58 ^{IPK} L4	0	0	4	6	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
p58 ^{IPK} L5	0	3	6	7	7	7	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3

5.2. Resultados *cpr 5-2*

Los linajes evolucionados en *cpr 5-2* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento del 100%, salvo en el caso de los linajes L1 y L4 evolucionados en *dcl2 dcl4*, *hsp 90.1 L5*, *i4g2 L3* y *P58^{ipk} L1*, en los que esta es del 90%. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 2,90 y la varianza 0.02.

Tabla 57. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas										Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección	Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	8	8	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L2	0	1	5	8	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L3	0	0	7	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L4	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L5	0	2	6	8	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L1	0	1	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L3	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L4	0	1	7	8	9	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3

MATERIAL SUPLEMENTARIO

cpr5-2 L5	0	2	10	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L1	0	0	7	7	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
jin1 L2	0	0	9	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
jin1 L3	0	3	8	8	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
jin1 L4	0	3	3	4	4	4	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L5	0	1	6	7	7	7	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds 8-1 L1	0	0	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds 8-1 L2	0	0	6	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L3	0	1	7	8	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
eds8-1 L4	0	0	6	8	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
eds8-1 L5	0	0	4	8	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L1	0	1	6	7	9	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,6
dcl2dcl4 L2	0	1	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L3	0	2	6	8	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L4	0	0	2	7	7	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
dcl2dcl4 L5	0	0	6	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L1	0	0	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
hsp90.1 L2	0	0	5	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
hsp90.1 L3	0	0	5	8	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
hsp90.1 L4	0	0	6	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
hsp90.1 L5	0	0	1	8	9	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2,2, 0	2,4
i4g2 L1	0	2	6	8	8	8	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
i4 g2 L2	0	0	6	8	8	8	8	8	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8

MATERIAL SUPLEMENTARIO

i4g2 L3	0	0	3	6	7	8	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
i4g2 L4	0	0	2	7	8	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
i4g2 L5	0	1	6	7	7	7	7	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dbp2 L1	0	0	6	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L2	0	0	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
dbp2 L3	0	0	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L4	0	1	4	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L5	0	0	3	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
p58 ^{IPK} L1	0	0	3	9	9	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
p58 ^{IPK} L2	0	0	2	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L3	0	0	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
p58 ^{IPK} L4	0	0	4	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
p58 ^{IPK} L5	0	0	0	9	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2

Inóculo	No. plantas con síntomas									% infección	Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi		Cada planta	Media
npr1-1 L1	1	2	4	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
npr1-1 L2	0	1	3	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
npr1-1 L3	1	5	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
npr1-1 L4	2	4	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
npr1-1 L5	0	4	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
cpr5-2 L1	0	1	2	4	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
cpr5-2 L3	0	0	2	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9

MATERIAL SUPLEMENTARIO

cpr5-2 L4	0	3	3	6	9	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
cpr5-2 L5	0	5	5	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L1	0	4	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L2	1	3	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L3	1	4	6	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
jin1 L4	0	3	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
jin1 L5	1	5	9	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L1	0	2	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L2	0	1	7	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L3	0	1	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L4	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L5	0	1	5	8	9	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L1	0	3	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L2	0	1	6	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L3	0	4	7	9	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
dcl2dcl4 L4	0	2	2	7	8	8	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
dcl2dcl4 L5	0	0	4	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L1	2	3	7	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L2	0	0	4	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L3	0	0	5	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L4	0	2	6	9	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
hsp90.1 L5	0	0	2	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L1	0	2	4	6	9	9	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9

i4g2 L2	0	2	4	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4g2 L3	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3	3,2
i4g2 L4	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,3
i4g2 L5	0	1	4	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L1	0	3	3	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L2	0	0	4	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3	3,4
dbp2 L3	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L4	0	1	5	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L5	0	3	9	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L1	0	3	8	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L2	0	1	6	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L3	0	1	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L4	0	0	5	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L5	0	1	3	9	9	9	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,7

5.3. Resultados *jin1*

Los linajes evolucionados en *jin1* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento del 100% excepto en *cpr 5-2 L4* y *dcl2 dcl4 L4*, que es del 90%. Este último linaje también tenía ese porcentaje de infectividad para el *npr 1-1*. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 3.02 y la varianza 0.03.

Tabla 58. Inefectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas									% infección	Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi		Cada planta	Media
npr1-1 L1	1	2	4	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L2	0	1	3	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L3	1	5	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
npr1-1 L4	2	4	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L5	0	4	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L1	0	1	2	4	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8
cpr5-2 L3	0	0	2	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
cpr5-2 L4	0	3	3	6	9	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,7
cpr5-2 L5	0	5	5	7	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L1	0	4	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L2	1	3	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L3	1	4	6	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
jin1 L4	0	3	8	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
jin1 L5	1	5	9	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L1	0	2	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L2	0	1	7	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L3	0	1	5	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L4	0	2	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L5	0	1	5	8	9	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,1

dcl2 dcl4 L1	0	3	8	0	1	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2 dcl4 L2	0	1	6	9	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2 dcl4 L3	0	4	7	9	0	1	1	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
dcl2 dcl4 L4	0	2	2	7	8	8	8	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
dcl2 dcl4 L5	0	0	4	8	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp 90.1 L1	2	3	7	8	9	0	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp 90.1 L2	0	0	4	8	9	0	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp 90.1 L3	0	0	5	7	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp 90.1 L4	0	2	6	9	0	1	1	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
hsp 90.1 L5	0	0	2	8	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L1	0	2	4	6	9	9	9	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
i4g2 L2	0	2	4	9	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L3	0	2	7	0	0	1	1	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
i4g2 L4	0	0	5	0	0	1	1	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,3
i4g2 L5	0	1	4	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L1	0	3	3	9	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L2	0	0	4	0	0	1	1	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3, 3	3,4
dbp2 L3	0	2	7	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L4	0	1	5	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L5	0	3	9	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L1	0	3	8	9	9	0	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L2	0	1	6	8	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L3	0	1	8	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L4	0	0	5	0	0	1	1	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L5	0	1	3	9	9	9	9	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,7

5.4. Resultados *eds8-1*

Los linajes evolucionados en *eds 8-1* mostraron un porcentaje de infectividad más variable que en *npr 1-1*, *cpr 5-2* y *jin1*. El porcentaje varía entre el 70% y el 100 %. La severidad de síntomas en este genotipo es también más variable, y la media es de 2.83 y la varianza 0.35.

Tabla 59. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas									% infección	Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi		Cada planta	Media
<i>npr1-1</i> L1	0	0	0	1	2	5	9	9	9	90	4,4,4,4,4,4,4,4,4,0	3,6
<i>npr1-1</i> L2	0	0	0	0	1	5	7	7	7	70	4,4,4,4,4,4,4,0,0,0	2,8
<i>npr1-1</i> L3	0	0	0	1	3	5	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>npr1-1</i> L4	0	0	0	0	2	7	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
<i>npr1-1</i> L5	0	0	1	1	1	2	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
<i>cpr5-2</i> L1	0	0	0	0	0	7	9	9	9	90	4,4,4,4,4,4,4,4,4,4	3,6
<i>cpr5-2</i> L3	0	0	0	0	0	9	9	9	9	90	4,4,4,4,4,4,4,4,4,4	3,6
<i>cpr5-2</i> L4	0	0	0	0	1	3	6	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,2,0,0	2,3
<i>cpr5-2</i> L5	0	0	0	0	2	5	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
<i>jin1</i> L1	0	0	0	0	1	6	8	8	9	90	4,4,4,4,4,4,4,4,4,4	3,6
<i>jin1</i> L2	0	0	0	0	0	7	9	9	9	90	4,4,4,4,4,4,4,4,4,4	3,6
<i>jin1</i> L3	0	0	0	0	0	1	5	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2,0	2,6
<i>jin1</i> L4	0	0	0	1	2	6	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2,0	2,6
<i>jin1</i> L5	0	0	0	1	1	3	5	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0,0	2,4

MATERIAL SUPLEMENTARIO

eds8-1 L1	0	0	0	0	6	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,4,4,4, 4	4
eds8-1 L2	0	0	1	1	8	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,4,4,4, 4	4
eds8-1 L3	0	0	2	4	7	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L4	0	0	0	1	5	7	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3, 3	3,4
eds8-1 L5	0	0	2	3	3	3	9	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
dcl2dcl4 L1	0	0	0	0	0	3	4	7	8	80	2,2,2,2,2,2,2,2,0, 0	1,6
dcl2dcl4 L2	0	0	0	0	0	4	5	5	7	70	3,3,2,2,2,2,2,0,0, 0	1,6
dcl2dcl4 L3	0	0	0	3	5	7	8	8	8	80	4,3,3,3,3,3,3,3,0, 0	2,5
dcl2dcl4 L4	0	0	1	3	5	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
dcl2dcl4 L5	0	0	0	0	0	2	6	8	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
hsp90.1 L1	0	0	0	2	3	7	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
hsp90.1 L2	0	0	0	1	2	4	5	7	8	80	3,3,2,2,2,2,2,2,0, 0	1,8
hsp90.1 L3	0	0	0	1	3	6	8	8	9	90	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 0	3
hsp90.1 L4	0	0	0	2	4	7	9	9	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3, 3	3,7
hsp90.1 L5	0	0	0	0	0	1	5	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,6
i4g2 L1	0	0	0	0	3	3	3	4	8	80	3,3,3,3,2,2,2,2,0, 0	2
i4g2 L2	0	0	0	0	1	1	3	4	7	70	3,3,3,3,2,2,2,0,0, 0	1,8
i4g2 L3	0	0	0	0	4	6	9	9	9	90	4,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,9
i4g2 L4	0	0	0	0	4	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L5	0	0	1	2	3	3	5	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0, 0	2,4
dbp2 L1	0	0	0	1	3	3	4	6	8	80	3,3,3,3,3,2,2,2,0, 0	2,1
dbp2 L2	0	0	0	1	4	4	4	6	8	80	4,4,4,3,3,3,3,2,0, 0	2,6
dbp2 L3	0	1	1	3	6	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3

dbp2 L4	0	0	0	5	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L5	0	0	0	1	1	1	7	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8
p58 ^{IPK} L1	0	0	0	1	3	6	6	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L2	0	0	0	1	4	4	5	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L3	0	0	0	2	6	6	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,5
p58 ^{IPK} L4	0	1	1	3	6	6	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,5
p58 ^{IPK} L5	0	0	0	2	2	2	7	8	9	90	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,8

5.5. Resultados *dcl2 dcl4*

Los linajes evolucionados en *dcl2 dcl4* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento del 100% salvo en dos linajes: *dcl2 dcl4* L1 y p58^{IPK} L4, donde fue del 80%. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 3.13 y la varianza 0.16.

Tabla 60. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas										Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dp i	5 dp i	6 dp i	7 dp i	8 dp i	9 dp i	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección	Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	2	6	8	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,4,4,4,4	4
npr1-1 L2	0	0	3	6	8	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3,3	3,3
npr1-1 L3	0	1	6	8	9	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,1
npr1-1 L4	0	2	3	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L5	0	8	9	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,4
cpr5-2 L1	0	0	0	8	9	10	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,4
cpr5-2 L3	0	0	0	6	8	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,4,4,3,3	3,8

MATERIAL SUPLEMENTARIO

cpr5-2 L4	0	1	3	4	8	9	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 3	4,3
cpr5-2 L5	0	0	2	7	7	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,4,3,3, 3	3,7
jin1 L1	0	0	0	6	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L2	0	0	0	5	8	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
jin1 L3	0	2	3	5	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
jin1 L4	0	3	5	7	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L5	0	9	10	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L1	0	0	5	8	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
eds 8-1 L2	0	0	6	7	9	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,3
eds8-1 L3	0	1	5	7	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
eds8-1 L4	0	6	10	10	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
eds8-1 L5	0	4	8	9	9	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,3,3,3, 3	3,6
dcl2dcl4 L1	0	3	5	6	8	8	8	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0, 0	2,4
dcl2dcl4 L2	1	4	7	7	9	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L3	2	7	10	10	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L4	2	4	7	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,3,3,3,3, 3	3,5
dcl2dcl4 L5	0	8	10	10	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
hsp 0.1 L1	0	1	3	7	9	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
hsp90.1 L2	0	0	2	4	7	8	8	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0, 0	2,7
hsp 0.1 L3	1	5	7	9	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
hsp90.1 L4	0	3	7	9	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
hsp90.1 L5	0	1	5	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L1	0	0	1	5	8	8	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3

i4 g2 L2	0	0	1	7	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4g2 L3	0	2	7	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4 2 L4	0	3	6	8	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,1
i4g2 L5	0	2	5	7	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L1	1	3	3	6	8	8	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L2	0	1	1	4	7	8	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
dbp2 L3	0	1	4	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
dbp2 L4	0	2	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L5	0	6	9	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L1	0	0	2	4	7	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L2	0	0	1	3	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L3	0	0	5	6	7	7	7	7	7	70	3,3,3,3,3,3,2,0,0,0	2
p58 ^{IPK} L4	2	2	5	5	7	8	8	8	8	80	3,3,3,3,3,3,2,2,0,0	2,2
p58 ^{IPK} L5	0	2	8	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,3,3,3,3,3	3,5

5.6. Resultados *hsp90.1*

Los linajes evolucionados en *hsp 90.1* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento del 100% salvo npr 1-1 L3, i4g2 L1, dbp2 L2 y p58^{IPK} L3, en los que se ha obtenido el 90% de plantas infectadas. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 3.07 y la varianza 0.02.

Tabla 61. Inefectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas									% infección	Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi		Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	2	4	7	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,3,3,3,3,3	3,5
npr1-1 L2	0	0	1	3	8	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3,3	3,3
npr1-1 L3	0	0	1	7	9	9	9	9	9	90	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,8
npr1-1 L4	0	0	3	6	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L5	0	4	9	9	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L1	0	0	1	3	5	10	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,4
cpr5-2 L3	0	0	0	2	3	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L4	0	0	1	3	7	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L5	0	0	1	4	9	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
jin1 L1	0	0	1	1	6	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L2	0	1	2	2	5	9	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
jin1 L3	0	1	3	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
jin1 L4	0	0	3	6	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,9
jin1 L5	0	7	9	9	9	9	9	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,1
eds 8-1 L1	0	0	1	4	7	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds 8-1 L2	0	1	2	4	7	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
eds8-1 L3	0	1	4	9	9	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,1
eds8-1 L4	0	0	2	8	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
eds8-1 L5	0	2	5	8	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dcl2dcl4 L1	0	3	5	7	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L2	0	0	1	4	7	8	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L3	0	1	2	8	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dcl2dcl4 L4	0	0	2	7	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L5	0	4	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L1	0	1	4	5	5	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L2	0	0	2	7	8	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L3	0	1	3	10	10	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3, 3	3,3
hsp90.1 L4	0	2	3	10	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
hsp90.1 L5	0	1	4	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L1	0	0	3	4	6	7	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
i4g2 L2	0	1	4	6	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L3	0	1	4	4	9	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
i4g2 L4	0	0	1	5	8	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
i4g2 L5	0	3	4	5	5	6	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dbp2 L1	0	1	6	8	9	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L2	0	0	4	8	9	9	9	9	9	90	4,4,4,4,3,3,3,3, 0	3
dbp2 L3	0	1	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L4	0	0	3	8	10	10	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
dbp2 L5	0	1	6	6	6	8	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
p58^{IPK} L1	0	0	1	2	5	7	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
p58^{IPK} L2	0	0	0	2	8	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
p58^{IPK} L3	0	0	5	8	8	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,8

p58 ^{IPK} L4	0	0	4	7	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58 ^{IPK} L5	0	0	1	5	6	7	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3,3	3,3

5.7. Resultados *i4g2*

Los linajes evolucionados en *i4g2* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento de entre el 70% y el 100% de las plantas infectadas. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 2,65 y la varianza 0.14.

Tabla 62. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas										Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dp i	5 dp i	6 dp i	7 dp i	8 dp i	9 dp i	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección	Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	3	3	4	7	9	9	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,2,2	3
npr1-1 L2	0	0	3	5	6	6	7	7	7	70	3,3,3,3,2,2,2,0,0,0	1,8
npr1-1 L3	0	1	2	6	6	7	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3,2	3
npr1-1 L4	0	0	1	5	7	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2,2,0	2,4
npr1-1 L5	0	1	4	7	7	7	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,2,2,2,2	2,6
cpr5-2 L1	0	0	1	2	4	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,2,2,2,2,0	2,3
cpr5-2 L3	0	0	1	2	2	4	7	8	8	80	3,3,3,3,2,2,2,2,0,0	2
cpr5-2 L4	0	0	0	2	6	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2,0	2,5
cpr5-2 L5	0	0	1	4	5	6	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2,0	2,6
jin1 L1	0	0	0	0	1	6	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,2,2,2,2	2,6
jin1 L2	1	1	1	2	3	6	8	8	9	90	3,3,3,3,2,2,2,2,2,0	2,2
jin1 L3	0	0	1	3	4	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2	2,8

MATERIAL SUPLEMENTARIO

jin1 L4	0	1	2	4	6	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,6
jin1 L5	0	4	7	7	7	7	8	8	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
eds8-1 L1	0	0	2	2	5	6	7	8	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
eds8-1 L2	0	0	1	2	4	6	6	8	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
eds8-1 L3	0	0	3	7	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L4	0	0	4	7	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
eds8-1 L5	0	1	4	6	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dcl2dcl4 L1	1	2	5	6	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dcl2dcl4 L2	0	0	1	2	7	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
dcl2dcl4 L3	0	1	3	8	8	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,2
dcl2dcl4 L4	0	2	3	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dcl2dcl4 L5	0	2	7	9	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L1	0	0	2	3	5	6	7	7	8	80	2,2,2,2,2,2,2,0,0, 0	1,6
hsp90.1 L2	0	0	0	1	3	6	7	7	9	90	3,3,3,3,2,2,2,2,2, 0	2,2
hsp90.1 L3	0	0	1	7	8	8	8	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0, 0	2,4
hsp 90.1 L4	0	0	3	7	8	9	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
hsp90.1 L5	0	2	3	6	6	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L1	0	0	2	8	8	8	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L2	0	0	2	8	8	9	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
i4g2 L3	0	1	8	8	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
i4g2 L4	0	2	7	8	8	9	9	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,2,2, 2	2,8
i4g2 L5	0	2	5	7	7	7	8	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,9
dbp2 L1	0	0	1	7	7	7	8	8	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,7

dbp2 L2	0	0	1	5	6	8	8	8	9	90	4,3,3,3,3,3,3,3,3,0	2,8
dbp2 L3	0	0	6	7	8	8	8	10	10	100	3,3,3,3,3,2,2,2,2,2	2,5
dbp2 L4	0	0	5	6	8	8	8	8	8	80	3,3,3,2,2,2,2,2,0,0	2,5
dbp2 L5	0	2	3	3	3	3	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,7
p58^{IPK} L1	0	0	2	3	5	5	7	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	3,3
p58^{IPK} L2	0	0	1	4	5	6	6	8	9	90	3,3,3,3,2,2,2,2,2,2,0	2,2
p58^{IPK} L3	0	2	6	6	8	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2,2,0	2,4
p58^{IPK} L4	0	0	4	5	8	8	9	9	9	90	4,3,3,3,3,3,2,2,2,0	2,5
p58^{IPK} L5	0	1	3	6	6	7	10	10	10	100	4,4,4,4,4,4,3,3,3,3	3,6

5.8. Resultados *dbp2*

Los linajes evolucionados en *dbp2* mostraron un porcentaje de infectividad al final del experimento del 100% en la mayor parte de los casos salvo en npr 1-1 L5, jin1 L1, dcl2 dcl4 L5 en los que fue del 90%, i4g2 L4 (80%) y dos linajes en los que bajó al 70%: jin1 L3 y dcl2 dcl4 L4. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 2,93 y la varianza 0.09.

Tabla 63. Infectividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas										Intensidad síntomas 12 dpi	
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección	Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	0	3	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L2	0	0	2	4	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
npr1-1 L3	0	2	5	10	10	10	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2

MATERIAL SUPLEMENTARIO

npr1-1 L4	0	1	3	8	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
npr1-1 L5	0	1	5	8	8	8	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,6
cpr 5-2 L1	0	0	0	3	6	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
cpr5-2 L3	0	0	0	2	4	7	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
cpr5-2 L4	0	0	3	6	6	9	10	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3, 3	3,1
cpr5-2 L5	0	0	0	5	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
jin1 L1	0	0	0	1	3	8	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,5
jin1 L2	0	0	1	2	7	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
jin1 L3	0	1	1	4	6	7	7	7	7	70	3,3,3,3,3,3,2,0,0, 0	2
jin1 L4	0	2	5	8	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
jin1 L5	0	3	3	6	7	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
eds 8-1 L1	0	0	0	1	7	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L2	0	0	1	1	6	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L3	0	1	4	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
eds8-1 L4	0	0	3	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
jin1 L5	0	3	3	6	7	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 2	2,9
dcl2 dcl4 L1	0	0	3	9	9	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dcl2dcl4 L2	0	0	1	5	9	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dcl2dcl4 L3	0	2	4	7	8	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3, 3	3,3
dcl2dcl4 L4	0	1	2	5	5	7	7	7	7	70	3,3,3,3,3,3,2,0,0, 0	2
dcl2dcl4 L5	0	0	3	8	8	8	8	8	9	90	4,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,7
hsp90.1 L1	0	0	1	3	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
hsp90.1 L2	0	0	0	1	5	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3

hsp90.1 L3	0	1	6	9	9	10	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3,3,3	3,4
hsp90.1 L4	0	0	3	9	9	9	10	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
hsp90.1 L5	0	1	3	6	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4g2 L1	0	0	2	4	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4g2 L2	0	0	3	5	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
i4g2 L3	0	0	1	2	5	6	6	7	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,2,2,0	2,5
i4g2 L4	0	0	1	2	4	4	7	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0,0	2,4
i4g2 L5	0	0	4	6	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
dbp2 L1	0	1	5	8	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L2	0	1	5	8	10	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,5
dbp2 L3	0	0	7	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L4	1	1	6	9	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
dbp2 L5	0	3	8	10	10	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58^{IPK} L1	0	0	0	5	7	7	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
p58^{IPK} L2	0	0	0	2	7	9	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58^{IPK} L3	0	0	2	7	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58^{IPK} L4	0	0	2	4	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
p58^{IPK} L5	0	0	2	8	8	10	10	10	10	100	4,4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3,5

5.9. Resultados *p58^{ipk}*

Los linajes evolucionados en *p58^{ipk}* mostraron un porcentaje de infectividad variable al final del experimento entre el 80% y el 100%. La media de severidad de síntomas para todos los linajes en este genotipo es de 2,64 y la varianza 0.15.

Tabla 64. Infektividad y severidad de síntomas de las infecciones cruzadas de cada linaje en cada genotipo.

Inóculo	No. plantas con síntomas							Intensidad síntomas 12 dpi				
	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi	12 dpi	% infección	Cada planta	Media
npr1-1 L1	0	0	3	5	8	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,2	2,9
npr1-1 L2	0	0	1	2	4	5	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2,0	2,5
npr1-1 L3	0	0	2	5	7	8	9	10	10	100	4,4,3,3,3,3,3,3,3,3	3,2
npr1-1 L4	0	0	2	3	4	7	9	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,9
npr1-1 L5	0	0	2	5	5	7	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2,2,0	2,6
cpr5-2 L1	0	0	0	3	4	5	10	10	10	100	4,4,4,4,3,3,3,3,3,3	3
cpr5-2 L3	0	0	0	1	1	2	5	5	5	50	3,3,3,3,3,0,0,0,0,0	1,5
cpr5-2 L4	0	0	0	1	3	3	6	7	7	70	3,3,3,3,3,3,2,0,0,0	2
cpr5-2 L5	0	0	0	0	1	4	6	6	6	60	3,3,3,3,3,3,0,0,0,0	1,8
jin1 L1	0	0	0	2	4	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,7
jin1 L2	0	0	0	3	5	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,8
jin1 L3	0	0	2	4	7	7	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L4	0	0	1	4	7	7	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	3
jin1 L5	0	1	3	5	5	7	8	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,2,0,0	2,3
eds8-1 L1	0	0	1	1	3	7	8	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,7
eds8-1 L2	0	0	1	1	2	7	7	9	9	90	3,3,3,3,3,3,2,2,2,2	2,4
eds8-1 L3	0	0	0	2	5	7	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3,3	2,7
eds8-1 L4	0	0	2	3	6	8	8	8	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,7
eds8-1 L5	0	0	0	2	4	4	6	8	8	80	3,3,3,3,3,3,3,3,0,0	2,4
dcl2dcl4 L1	0	0	6	7	8	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2,2,2	2,8

MATERIAL SUPLEMENTARIO

dcl2dcl4 L2	0	0	3	3	7	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dcl2dcl4 L3	0	0	0	0	1	7	7	7	7	70	3,3,3,3,3,3,3,0,0, 0	2,1
dcl2dcl4 L4	0	1	1	1	2	7	7	7	7	70	3,3,3,3,3,2,2,0,0, 0	1,9
dcl2dcl4 L5	0	1	2	7	7	7	8	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,2, 0	2,6
hsp90.1 L1	0	1	3	3	3	8	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
hsp90.1 L2	0	0	0	0	4	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,2,2,2, 2	2,6
hsp90.1 L3	0	0	0	1	1	5	6	7	9	90	4,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,6
hsp90.1 L4	0	0	2	2	3	6	6	6	8	80	4,3,3,3,3,3,2,2,0, 0	2,3
hsp90.1 L5	0	0	0	5	5	8	9	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
i4g2 L1	0	0	0	3	5	7	8	9	10	100	3,3,3,3,3,3,2,2,2, 2	2,6
i4 g2 L2	0	0	0	4	7	8	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
i4g2 L3	0	0	0	0	3	3	7	8	9	90	4,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,6
i4g2 L4	0	0	0	1	1	1	4	5	6	60	4,3,3,3,2,2,0,0,0, 0	2
i4g2 L5	0	0	2	3	3	6	7	9	10	100	3,3,3,3,3,3,3,2, 2	2,8
dbp2 L1	0	0	0	3	9	9	9	10	10	100	4,3,3,3,3,3,3,3,3, 2	3
dbp2 L2	0	0	1	3	9	10	10	10	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 3	3,3
dbp2 L3	0	0	4	6	7	10	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
dbp2 L4	0	0	1	3	6	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
dbp2 L5	0	0	4	7	7	8	9	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L1	0	0	2	5	8	9	10	10	10	100	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 3	3
p58 ^{IPK} L2	0	0	0	4	7	8	9	9	9	90	3,3,3,3,3,3,3,3,3, 0	2,7
p58 ^{IPK} L3	0	0	1	3	5	5	6	7	8	80	3,3,3,3,3,3,2,2,0, 0	2,2
p58 ^{IPK} L4	0	0	1	3	5	5	7	9	9	90	4,3,3,3,3,3,3,2,2, 0	2,6
p58 ^{IPK} L5	0	0	1	7	7	8	9	9	10	100	4,4,4,3,3,3,3,3,3, 2	3,2

