



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE INDUCTORES  
QUÍMICOS EN LA TOLERANCIA Y EXPRESIÓN DE GENES  
DURANTE LA INTERACCIÓN DE *Capsicum spp.* Y  
*Phytophthora capsici*.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

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

P r e s e n t a

**Antonio de Jesús Pérez Aranda**

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2023.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 13 del Mes de Marzo del 2023, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### **Caracterización de los efectos de inductores químicos en la tolerancia y expresión de genes durante la interacción de *Capsicum spp.* Y *Phytophthora capsici***

Presentada por el alumno:

#### **Antonio de Jesús Pérez Aranda**

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

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

#### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. María Goretty Caamal Chan  
Co-Directora de Tesis



Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Co-Tutor de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Revisora de Tesis



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

La Paz, Baja California Sur, a 26 de enero de 2023.

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

- Herramienta antiplagio:

Ithenticate.

- Filtros utilizados:

Excluir citas.

Excluir bibliografía.

- Porcentajes de similitud:

13%

Se muestra captura de pantalla

INFORME DE ORIGINALIDAD

**13%**  
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS:

1	hdl.handle.net	482 palabras — 2%
2	colposdigital.colpos.mx:8080	236 palabras — 1%
3	cicy.repositorioinstitucional.mx	176 palabras — 1%
4	repositorio.una1.edu.co	165 palabras — 1%
5	docplayer.es	164 palabras — 1%
6	cibnor.repositorioinstitucional.mx	104 palabras — < 1%
7	www.smf.org.mx	90 palabras — < 1%
8	tesis.ipn.mx	85 palabras — < 1%
9	www.scielo.org.mx	79 palabras — < 1%
10	rmf.smf.org.mx	

#### Firmas del comité



Dra. María Goretty Caamal Chan

Co-Directora de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Revisora de Tesis



Dr. Raúl Álvarez Venegas

Co-Tutor de Tesis

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Directora de Tesis  
(Período 17 de noviembre del 2020-31 de agosto del 2022)

Dra. María Goretty Caamal Chan  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. María Goretty Caamal Chan  
Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

### **Jurado de Examen**

Dra. María Goretty Caamal Chan  
Dr. Raúl Álvarez Venegas  
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

### **Suplente**

Dra. Elizabeth Monreal Escalante

## Resumen

El género *Capsicum* es perteneciente a la familia de las Solanaceae, la cual debido a su gran variedad de uso en la gastronomía resulta a su vez de gran importancia agrícola. *Phytophthora capsici* es un oomiceto de tipo hemibiotrófico altamente destructivo para diversas especies de plantas, especialmente *Capsicum*. México es considerado un centro de diversidad de *Capsicum* encontrándose variedades susceptibles y en menor número las resistentes a *P. capsici*. Diversos autores reportan que la resistencia ante un patógeno es conferida por los mecanismos de defensa de la planta, la eficiencia de la respuesta de defensa contra un patógeno depende de la regulación mediada por las principales fitohormonas: ácido salicílico (SA), etileno (ET) y jasmonatos (JA). El estilo de infección del agente patógeno es un factor fundamental en la regulación de defensa; para patógenos de tipo biotrófico, la ruta de señalización de SA es activada, para uno de tipo necrotrófico se activa la ruta de JA, para los de tipo hemibiotrófico se requiere una respuesta bifásica en donde primero se activa SA y posteriormente JA/ET.

Cada ruta de señalización regula la expresión de genes relacionados con ella, los cuales pueden ser considerados marcadores de la ruta. La ruta de señalización de SA regula positivamente la expresión de los genes NPR1, PR1 y PR4. En la ruta de señalización del JA, los genes asociados a la síntesis de Jasmonatos como LOX2 y el gen de respuesta a patógenos PDF1 (una defensina vegetal) son inducidos. Por otro lado, diversos marcadores asociados a las fases del ciclo infectivo del patógeno también han sido estudiados, donde Hmp1, NPP1 y CDC14 están asociados a diferentes etapas de la infección. En base a estas evidencias, se ha incrementado el estudio del efecto de aplicar estas fitohormonas en activar la defensa de la planta y contrarrestar a los agentes patógenos en plantas susceptibles.

Evaluar el efecto de estos inductores (fitohormonas) en la respuesta de defensa en variedades de *Capsicum* durante el ciclo infectivo de *P. capsici* es el objetivo del presente proyecto. Se determinó el grado de virulencia del patógeno en variedades de *Capsicum spp.* evaluando la aparición de síntomas de *Capsicum chinense* y *Capsicum annuum* posterior a la infección ante dos cepas de *P. capsici* de manera independiente. También se evaluó el efecto de los inductores en *C. annuum* Ancho, y su efecto ante la infección de *P. capsici* Oaxaca en la planta a nivel macroscópico y molecular, se observó que la inducción de MeJA 0.15 mM previo a la infección tiene un efecto en la activación de los mecanismos de defensa de la planta, ante el patógeno afecta la tolerancia a la enfermedad en comparación con plantas sin un tratamiento previo, retrasando levemente la aparición de los primeros síntomas, indicado por un cambio en la expresión de los genes marcadores de defensa de la planta y de ciclo infectivo del patógeno que interactúan como consecuencia de la infección

**Palabras clave:** *Capsicum*, *Phytophthora capsici*, fitohormonas, inducción de defensa.

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4305-8339>

Dra. María Goretty Caamal Chan  
Vo.Bo. Co-Directora de Tesis

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Vo. Bo. Revisora de Tesis

## Summary

The *Capsicum* genus belongs to the Solanaceae family, which, due to its wide variety of uses in gastronomy, is also of great agricultural importance. *Phytophthora capsici* is a highly destructive hemibiotrophic oomycete for various plant species, especially *Capsicum*. México is considered a center of diversity of *Capsicum*, with susceptible varieties and fewer resistant ones to *P. capsici*. Several authors report that resistance to a pathogen is conferred by the defense mechanisms of the plant, the efficiency of the defense response against a pathogen depends on the regulation mediated by the main phytohormones: salicylic acid (SA), ethylene (ET) and jasmonates (JA). The infection style of the pathogen is a fundamental factor in defense regulation; for biotrophic type pathogens, the SA signaling pathway is activated, in necrotrophic pathogens the JA pathway is activated, for those of the hemibiotrophic type a biphasic response is required where it is first activated SA and later on JA/ET.

Each signaling pathway regulates the expression of genes related to it, which can be considered pathway markers. The SA signaling pathway positively regulates the expression of the NPR1, PR1, and PR4 genes. In the JA signaling pathway, genes associated with jasmonate synthesis such as LOX2 and the pathogen response gene PDF1 (a plant defensin) are induced. On the other hand, various markers associated with the phases of the infective cycle of the pathogen have also been studied, where Hmp1, NPP1 and CDC14 are associated with different stages of the infection. Based on this evidence, the study of the effect of applying these phytohormones in activating plant defense and countering pathogens in susceptible plants has increased.

Evaluating the effect of these inducers (phytohormones) on the defense response in *Capsicum* varieties during the infective cycle of *P. capsici* is the objective of this project. The degree of virulence of the pathogen in varieties of *Capsicum spp.* evaluating the appearance of symptoms of *Capsicum chinense* and *Capsicum annuum* after infection with two strains of *P. capsici* independently. The effect of the inducers on *C. annuum* Ancho was also evaluated, and its effect against the infection of *P. capsici* Oaxaca in the plant at the macroscopic and molecular level, it was observed that the induction of MeJA 0.15 mM prior to infection has an effect in the activation of the defense mechanisms of the plant, against the pathogen it affects the tolerance to the disease in comparison with plants without a previous treatment, slightly delaying the appearance of the first symptoms, indicated by a change in the expression of the marker genes of defense of the plant and of the infective cycle of the pathogen that interact as a consequence of the infection.

**Keywords:** *Capsicum*, *Phytophthora capsici*, Phytohormones, Defense induction.

**ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4305-8339>

Dra. María Goretty Caamal Chan  
Vo.Bo. Co-Directora de Tesis

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega  
Vo. Bo. Revisora de Tesis

**Dedicatoria**

*Para mi Familia.*

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por ofrecerme la oportunidad de avanzar en mis estudios, a pesar de las limitaciones ocasionadas por la pandemia del COVID-19.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de manutención otorgada 1081895.

A la Dra. María Goretty Caamal Chan, factor principal de mi evolución en este periodo de maestría, por su constante apoyo y guía.

A La Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes, por estar al pendiente de mis actividades y por el apoyo otorgado a lo largo de todo el proceso.

Al Dr. Raúl Álvarez Venegas, por sus puntuales comentarios que ayudaron a enriquecer en gran medida este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega, por sus comentarios finales y disponibilidad para ser parte del comité de revisión.

Al M.C. Ángel Edgardo Carrillo García, por los consejos otorgados y por ser un ejemplo en el laboratorio.

A los técnicos Margarito Rodríguez Álvarez, Gabriela Mendoza Carrión y Delia Irene Rojas Posadas, por permitirme realizar actividades en sus Laboratorios como apoyo para mi trabajo, y su disponibilidad a lo largo de este periodo.

A mis Padres, principal razón por la cual he podido avanzar en mis estudios, pues su apoyo es fundamental.

A mis Hermanos, que me sirven de motivación para continuar mejorando.

A mis Amigos, por ser fundamentales al momento de tomar un respiro y despejar la mente.

## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
2.1 Generales.....	6
2.2 Antecedentes del objetivo particular 1 .....	7
2.2.1 Problemáticas asociadas a la producción de cultivos.....	7
2.2.2 Oomicetos.....	8
2.2.3 <i>Phytophthora capsici</i> y sus diversos hospederos .....	11
2.2.4 <i>Phytophthora capsici</i> y el género <i>Capsicum</i> .....	12
2.3 Antecedentes del objetivo particular 2 .....	16
2.3.1 La respuesta de defensa de la planta se induce al reconocer elementos del patógeno .....	16
2.3.2 Los mecanismos de defensa en plantas son altamente regulados.....	18
2.3.3 Respuestas de tipo compatible e incompatible.....	21
2.3.4 Los inductores químicos como elementos para activar la defensa en plantas .....	22
2.4 Antecedentes del objetivo particular 3 .....	24
2.4.1 Interacciones compatibles con patógenos hemibiotróficos.....	24
2.4.2 Inductores químicos inducen tolerancia en interacciones de tipo compatible contra patógenos hemibiotróficos .....	25
2.4.3 Efecto de inductores químicos sobre la tolerancia de <i>Capsicum</i> a patógenos.....	28
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>30</b>
3.1 Importancia Científica.....	30
3.2 Importancia Tecnológica .....	30
3.3 Importancia para el desarrollo nacional y mundial.....	31
3.3.1 Pertinencia Económica.....	31
3.3.2 Pertinencia Ambiental .....	32
3.3.3 Pertinencia Social.....	32
<b>4. HIPOTESIS .....</b>	<b>33</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Objetivo general .....	34
5.2 Objetivos particulares.....	34
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
6.1 Obtención de material biológico (aplica en todos los objetivos) .....	35
6.1.1 Obtención de plántulas <i>in vitro</i> .....	36
6.1.2 Preparación del patógeno.....	36
6.1.2.1 Zoosporas .....	36

6.1.2.2 Micelio .....	37
6.2 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 1 .....	37
6.2.1 Análisis de patogenicidad con escala de severidad .....	37
6.2.2 Detección de los genes de fase infectiva por RT-PCR .....	39
6.3 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 2 .....	40
6.3.1 Tratamiento químico con inductores .....	40
6.3.2 Extracción de ARN total de tejido vegetal .....	40
6.3.3 Cuantificación de marcadores de defensa por RT-qPCR .....	41
6.4 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 3 .....	43
6.4.1 Infección de las plantas de Chile previamente tratadas con inductores químicos para análisis macroscópico y molecular .....	43
6.4.2 Análisis a nivel macroscópico .....	44
6.4.3 Análisis de marcadores de defensa y de fases infectivas por RT-PCR en plantas afectadas en su nivel de tolerancia a <i>P. capsici</i> .....	44
6.4.4 Análisis estadístico .....	45
<b>7. RESULTADOS</b> .....	46
7.1 Determinación del grado de virulencia de <i>P. capsici</i> sobre <i>Capsicum spp.</i> .....	46
7.1.1 Análisis de virulencia a nivel macroscópico con inóculo Zoosporas <i>P. capsici</i> .....	46
7.2 Análisis del efecto de elicitores sobre marcadores de defensa en planta .....	57
7.2.1 Evaluación del efecto de la concentración de los elicitores moduladores de la señalización de defensa en <i>Capsicum annuum</i> variedad poblano .....	57
7.3 Análisis del efecto de elicitores sobre las fases de infección a nivel macroscópico y molecular .....	64
7.3.1 Efecto del tratamiento con SA, ET y BABA en la tolerancia a <i>P. capsici</i> basado en escala de severidad .....	64
7.3.2 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a <i>P. capsici</i> basado en escala de severidad .....	69
7.3.3 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a <i>P. capsici</i> basado en la expresión de genes de <i>P. capsici</i> .....	80
7.3.4 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a <i>P. capsici</i> basado en la expresión de genes de defensa de <i>C. annuum</i> Ancho .....	84
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	88
8.1 Discusión sobre el objetivo particular 1 .....	88
8.2 Discusión sobre el objetivo particular 2 .....	89
8.3 Discusión sobre el objetivo particular 3 .....	91
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	96
9.1 Conclusión sobre el objetivo particular 1 .....	96
9.2 Conclusión sobre el objetivo particular 2 .....	96
9.3 Conclusión sobre el objetivo particular 3 .....	97
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	98
<b>11. ANEXOS</b> .....	107
Anexo A: Análisis de patogenicidad a nivel molecular (valuación de los oligonucleótidos de <i>P. capsici</i> ) .....	108
Anexo B: Análisis de fases infectivas en <i>Capsicum annuum</i> Jalapeño y Ancho .....	110
Anexo C: Análisis del efecto a nivel macroscópico de tratamientos con BABA, ET y SA .....	111

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Resumen de metodología .....	35
<b>Figura 2.</b> Análisis de marcadores de fase infectiva 72hpi. ....	53
<b>Figura 3.</b> Electroforesis extracción ARN muestras de tratamiento con BABA. ....	58
<b>Figura 4.</b> Expresión relativa de genes en <i>Capsicum annuum</i> Ancho en respuesta a tratamientos y concentraciones múltiples de elicitores.....	61
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa de genes PR1-a, PR1-B y PDF1.2-B en <i>Capsicum annuum</i> Ancho en respuesta a tratamientos y concentraciones múltiples de elicitores. ....	63
<b>Figura 6.</b> Índice de Severidad de la enfermedad para <i>Capsicum annuum</i> Ancho (CaA) tratadas con BABA a las 24, 48 y 72 horas post infección con <i>P. capsici</i> . ....	68
<b>Figura 7.</b> Índice de Severidad de la enfermedad para <i>Capsicum annuum</i> Ancho (CaA). Plantas pretratadas con Jasmonato de Metilo y Tritón x-100 1%. ....	74
<b>Figura 8.</b> Comparativa entre los síntomas de <i>Capsicum annuum</i> Ancho 72 horas posterior a la remoción de la hoja inoculada con <i>P. capsici</i> .....	75
<b>Figura 9.</b> Síntomas iniciales de infección de <i>C. annuum</i> Ancho + <i>P. capsici</i> , presentes a las 48 horas post infección .....	76
<b>Figura 10.</b> Índice de Severidad de la enfermedad para <i>Capsicum annuum</i> Ancho infectada con <i>P. capsici</i> Oaxaca. ....	79
<b>Figura 11.</b> Expresión relativa de genes de fases infectivas en tejido de <i>Capsicum annuum</i> Ancho pretratado con MeJA, e infectado con <i>P. capsici</i> .....	81
<b>Figura 12.</b> Expresión relativa de genes de efectores citoplasmáticos y apoplásticos en tejido de <i>Capsicum annuum</i> Ancho pretratado con MeJA, e infectado con <i>P. capsici</i> .....	83
<b>Figura 13.</b> Expresión relativa de genes marcadores de defensa de <i>Capsicum annuum</i> Ancho tratado con MeJA, infectado con <i>P. capsici</i> .....	86
<b>Figura 14.</b> Índice de Severidad de la enfermedad para variedades <i>Capsicum chinense</i> Chiapas (CcC), <i>Capsicum annuum</i> Jalapeño (CaJ) y <i>Capsicum annuum</i> Ancho (CaA) a las A) 24 hpi, B) 48 hpi, C) 72 hpi y D) 96 hpi. ....	107
<b>Figura 15.</b> Electroforesis en gel de Agarosa 1%. ....	108
<b>Figura 16.</b> Análisis de oligonucleótidos de <i>P. capsici</i> . ....	109
<b>Figura 17.</b> Electroforesis RNA muestras de Chile infectadas con micelio de <i>P. capsici</i> .....	110

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Proporciones de mezcla de reacción para PCR punto final, volumen de 25 microlitros.	38
<b>Tabla 2.</b> Primers asociados a diferentes fases del ciclo infectivo de <i>P. capsici</i> .....	39
<b>Tabla 3.</b> Primers marcadores de defensa en planta para RT-qPCR.....	41
<b>Tabla 4.</b> Primers de marcadores de efectores de infección por <i>P. capsici</i> .....	45
<b>Tabla 5.</b> Progreso de síntomas a 24, 48, y 72 hpi. Infección con zoosporas de <i>P. capsici</i> Oaxaca en <i>C. chinense</i> variedad Chiapas y variedad Mayan Ba'alche, progreso de la síntomas en diferentes fenotipos. ....	47
<b>Tabla 6.</b> Progreso de síntomas a 24, 48, y 72 hpi. Infección con zoosporas de <i>P. capsici</i> Veracruz en <i>C. chinense</i> variedad Chiapas, progreso de síntomas en diferentes fenotipos.....	49
<b>Tabla 7.</b> Efecto de inoculación con zoosporas en plantas (10 µl) 0 y 72 hpi sin síntomas. Efecto de la reinoculación con zoosporas a 96 hpi (15 y 20 µl), para las variedades de Chiapas (CcC) y Mayan Ba'alche (CcMB) .....	50
<b>Tabla 8.</b> Síntomas a la 72 hpi en <i>Capsicum chinense</i> inoculado con <i>P. capsici</i> Oaxaca por método de inoculación con zoosporas. ....	52
<b>Tabla 9.</b> Síntomas de enfermedad en <i>Capsicum chinense</i> Chiapas y <i>Capsicum annum</i> variedades Jalapeño y Ancho. a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección con discos de micelio de <i>P. capsici</i> Oaxaca. ....	55
<b>Tabla 10.</b> Índice de enfermedad de <i>Capsicum chinense</i> Chiapas, <i>Capsicum annum</i> variedades Jalapeño y Ancho.....	56
<b>Tabla 11.</b> Síntomas de <i>C. annum</i> Ancho pretratado con BABA e infectado con <i>P. capsici</i> , tiempos de inoculación postratamiento de 24 y 72 horas.....	65
<b>Tabla 12.</b> Índice de Severidad <i>Capsicum annum</i> Ancho con tratamientos con BABA a 24, 48 y 72horas post infección con <i>P. capsici</i> .....	66
<b>Tabla 13.</b> Síntomas de enfermedad en <i>Capsicum annum</i> variedad Ancho, tratamiento con MeJA. a las 24, 48, Y 72 post infección con discos de micelio de <i>P. capsici</i> Oaxaca).....	71
<b>Tabla 14.</b> Índice de Severidad tratamientos con Jasmonato de Metilo (MeJA)en <i>Capsicum annum</i> variedad Ancho, infectados con <i>P. capsici</i> Oaxaca. ....	72
<b>Tabla 15.</b> Progreso de síntomas en <i>C. annum</i> Ancho, infección con <i>P. capsici</i> Oaxaca, a las 48 y 72 hpi.....	77
<b>Tabla 16.</b> Índice de Severidad tratamientos con Jasmonato de Metilo (MeJA)en <i>Capsicum annum</i> variedad Ancho, infectados con <i>P. capsici</i> Oaxaca. ....	78
<b>Tabla 17.</b> Cuantificación de ADN genómico extraído de cuatro muestras de <i>P. capsici</i> Oaxaca.	108
<b>Tabla 18.</b> Efecto fisiológico de tratamiento con BABA a concentraciones de 2.5 y 5 mM a las 24, 48 y 72 hpt.....	111
<b>Tabla 19.</b> Efecto fisiológico del tratamiento con Etileno a concentraciones 0.1, 1 y 2.5 mM a las 24, 48 y 72 hpt.....	112
<b>Tabla 20.</b> Efecto fisiológico del tratamiento con Etileno a concentraciones 0.1, 1 y 2.5 mM a las 24, 48 y 72 hpt.....	113

**Abreviaturas**

<b>MeJA</b>	Jasmonato de Metilo
<b>BABA</b>	Acido beta aminobutírico
<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>ET</b>	Etileno
<b>CCC</b>	<i>Capsicum chinense</i> Chiapas
<b>CAJ</b>	<i>Capsicum annuum</i> Jalapeño
<b>CAA</b>	<i>Capsicum annuum</i> Ancho
<b>PCO</b>	<i>Phytophthora capsici</i> Oaxaca
<b>Hpi</b>	Horas post infección
<b>Hpt</b>	Horas post tratamiento
<b>NLPs</b>	Proteínas tipo Nep1 (Nep1-like proteins)
<b>PAMPs</b>	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns)
<b>PRRs</b>	Receptores de Reconocimiento de Patrones (Pattern Recognition Receptor)

## 1. INTRODUCCIÓN

La agricultura se ha intensificado para garantizar la seguridad alimentaria, la cual es importante en el desarrollo de una población. Con este fin, varias hectáreas de alimento son producidas anualmente, entre los diversos cultivos que se producen se encuentran las hortalizas, que tienen una importancia gastronómica ampliamente conocida, como es el caso del chile. *Capsicum* es un género de plantas de la familia de las *Solanaceae* que comprende alrededor de 25 especies, entre las cuales se encuentran *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, entre otras. Estas plantas se caracterizan principalmente por contener capsaicinoides, molécula de la cual deriva su nombre y que determina la pungencia del fruto. Los capsaicinoides proporcionan el característico sabor picante que es utilizado por la industria gastronómica, además de tener usos diversos por parte de diversas industrias como la farmacéutica, tabacalera, cosmética, y también es ingrediente activo en diversos productos. Además de este componente característico, el género *Capsicum* ha generado interés por su alto contenido de alcaloides y de vitaminas A y C (Borges Gómez *et al.*, 2010; Villota Ceron *et al.*, 2012).

Mesoamérica (centro de México a noroeste de Costa Rica) es considerada una de las más importantes regiones donde los cultivos fueron domesticados en las Américas (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009) debido a esto, a la región se le adjudica el nacimiento de diversas especies de cultivos importantes. México es el país con mayor diversidad genética de *Capsicum* en el mundo, considerando que en el país se encuentra una gran variedad de climas y suelos que propician el desarrollo de diversas especies de plantas del género. Debido a esto último, el cultivo de plantas de chile en el país ha adquirido importancia económica y cultural, por lo que el estudio correspondiente a los diversos factores que puedan afectar a la planta genera interés en la comunidad científica. Dichos factores pueden ser abióticos, los cuales se asocian a factores ambientales que afectan el desarrollo de las plantas, tales como nutrientes disponibles, disponibilidad de recursos, y condiciones como la temperatura, entre otras. Por otro lado, también existen factores bióticos, los cuales se asocian a la interacción de plantas con otros organismos, algunos de estos capaces de afectar negativamente a la planta, por interacción con organismos patógenos que suelen generar estrés (Nieto-Garibay *et al.*, 2022). Estos patógenos son causantes comunes de pérdidas a nivel global de diversos cultivos con un alto valor

económico, incluso han ocasionado a lo largo de la historia diversas crisis alimentarias importantes que han dado a conocer la relevancia de su control, dentro de los más problemáticos por lo complicado que resulta eliminarlos se encuentran los oomicetos. Los oomicetos son microorganismos eucariontes identificados y caracterizados como agentes causales de diversas enfermedades de plantas (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Reyes-Tena *et al.*, 2019). La mayoría de los oomicetos de tipo hemibiotróficos pertenecen al género *Phytophthora*, que inician la infección con una fase biotrófica, en la cual las células no parecen estar afectadas, posterior a esta fase inicial de infección el patógeno inicia una fase de transición en la cual pasa de ser de tipo biotrófico y empieza a afectar el tejido vivo, dando inicio a una etapa necrotrófica, que mata las células infectadas y provoca un colapso y necrosis tisular importantes, una vez concluida la muerte celular al final de la infección, el patógeno es capaz de transmitirse a hospederos cercanos y dar inicio a un nuevo ciclo de infección (Lamour *et al.*, 2012b). El género *Phytophthora* es responsable de algunas de las enfermedades más importantes desde el punto de vista económico, afectando cultivos como la papa, tomate, pepino, pimientos, entre otros (Lamour *et al.*, 2012b). *Phytophthora capsici* es el agente patógeno de la enfermedad de la marchitez del chile, una enfermedad destructiva en diversas áreas del mundo el cual ocasiona pérdidas de 25-90% en un periodo de tiempo de 14 días, dependiendo de la virulencia de la cepa. Esta enfermedad tiene efectos negativos en diversas partes de la planta, afectando desde la raíz, hasta los frutos (Lamour *et al.*, 2012b; Kamoun *et al.*, 2015; Reyes-Tena *et al.*, 2019). Desde su identificación por primera vez en Nuevo México, por Fabian García en 1908, y posteriormente descrito por Leonian en 1922, como agente causal de la enfermedad de la marchitez del chile, *Phytophthora capsici* se ha reportado en diversas zonas de cultivos en el país como en Michoacán, Guanajuato, Chihuahua, Ciudad de México, Aguascalientes y recientemente en Yucatán (Reyes-Tena *et al.*, 2019). Además, en las últimas décadas se han reportado la emergencia de este patógeno en otras familias de plantas importantes, por lo que los esfuerzos han sido enfocados en entender el mecanismo de infección, virulencia del patógeno y la defensa de la planta (García, 1908; Leonian, 1922; Babadoost *et al.*, 2015).

Los síntomas característicos de esta enfermedad son principalmente el pudrimiento de la semilla, así como un tizón, los cuales se han reportado en diversas solanáceas y cucurbitáceas.

El pudrimiento de tejidos suele llevarse a cabo previo a la emergencia del patógeno, fase de la infección en la cual se puede observar presencia de micelio que cubre las áreas infectadas de las plantas. En plantas desarrolladas, los síntomas causados por *Phytophthora* son variados, y algunos dependen del hospedero. La infección puede ocurrir a diversos niveles de la planta, sin embargo, suele ser más común a nivel de suelo, donde los primeros síntomas visibles son un área oscura que presenta exceso de agua, las raíces infectadas adoptan una coloración café oscura. En hoja, suelen aparecer pequeños puntos de daño, aunado al exceso de agua en hoja, que tiene una apariencia remojada, estos puntos se hacen más grandes con el tiempo, cambiando la coloración de la hoja y esta se vuelve frágil. Posteriormente se presenta en áreas infectadas el crecimiento de regiones similares al crecimiento de hongos, de color blanco que corresponden al característico micelio del oomiceto. Cuando estos síntomas recorren toda la planta, esta presenta una apariencia de marchitez y daños severos en su totalidad, los frutos se secan y cambian de tamaño, estando arrugados y de coloración café y al final la planta muere (Hausbeck y Lamour, 2004; Gevens *et al.*, 2008).

Para contrarrestar el estrés biótico, las plantas tienen mecanismos sofisticados de reconocimiento y defensa ante agentes patógenos, esto da lugar a una interacción de tipo compatible si los mecanismos de defensa se ven superados por los mecanismos de infección de un patógeno; por otro lado, en la interacción de tipo incompatible se contrarresta el ataque del agente patógeno. El primer nivel del sistema inmune de la planta corresponde a la percepción de patógenos a través del patrón molecular asociado a patógenos de reconocimiento (PAMP) (o patrón molecular asociado a microbios o daños) -inmunidad activada (PTI). La percepción de patógenos también puede ocurrir a través del reconocimiento de efectores de patógenos (moléculas sintetizadas para mejorar la aptitud de los patógenos) a través de proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) de las plantas que pueden implementar una inmunidad llamada inmunidad activada por efectores (ETI), siendo por ello los genes de resistencia (Genes R) a enfermedades en plantas importantes componentes genéticos de resistencia (Jiang & Tyler, 2012).

Varios autores sugieren que la diferencia entre plantas resistentes y susceptibles es si estas pueden activar las vías involucradas en tiempo e intensidad de manera oportuna y eficiente

ante un agente patógeno (Li *et al.*, 2020). Los mecanismos de defensa como respuesta al reconocimiento de ciertos patógenos se da por un complejo sistema de señalización celular que genera un gran número de cambios en la planta, de tipo metabólico y morfológico, y de la expresión de genes de resistencia. La inducción de estos mecanismos de defensa es regulada por la presencia de ciertas moléculas en las plantas, las fitohormonas, las cuales son encargadas de diversas funciones relacionadas con procesos de desarrollo y crecimiento en plantas, así como en la respuesta a estrés biótico y abiótico en las mismas. Dentro de las fitohormonas más conocidas por ser partícipes en estos mecanismos de defensa inducida se encuentran el ácido Salicílico (SA), etileno (ET) y el Jasmonato (JA) (Bari y Jones, 2009). La modulación de la respuesta de defensa depende del estilo de infección del agente patógeno. El SA actúa en respuesta de infecciones de patógenos biotróficos y hemibiotróficos (en etapas tempranas de la infección) mientras que el ET y el JA inducen respuesta correspondiente a los patógenos necrotróficos y en etapa de transición a fase necrotrófica en patógenos hemibiotróficos (Bektas y Eulgem, 2015).

Debido a estas características, dichas fitohormonas se asocian a tipos de respuesta específicos. El SA se asocia a la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), la cual es, como su nombre lo indica, adquirida como consecuencia de infecciones previas, proporcionando cierta inmunidad a la planta para infecciones posteriores. Esta respuesta se asocia con la expresión de genes que sirven en la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis, denominadas PR (Camarena y de la Torre, 2007). Para el caso de ET y JA, estas son asociadas a la Resistencia Sistémica Inducida (ISR) la cual se relaciona con la acción de rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGRP), y que, contrario a la SAR, no involucra la síntesis de proteínas PR (Samaniego-Gómez *et al.*, 2017), adicionalmente se ha reportado el papel de esta fitohormona en la defensa contra microorganismos necrotróficos y hemibiotróficos. Estas fitohormonas están asociadas a respuestas diversas ante patógenos, donde se ha observado la inducción de genes PR. Se ha evaluado que para el efecto de contrarrestar patógenos de tipo biotrófico, el mecanismo de respuesta asociado al ácido salicílico es el que suele tener más influencia, mecanismo en el cual suele interactuar genes PR como el PR1 y PR4, mientras que la respuesta ante patógenos de tipo necrotrófico suele llevarse a cabo la respuesta asociada a la ruta de Jasmonatos y Etileno, donde intervienen los genes PDF1.

Diversos estudios han reportado que la aplicación exógena en plantas de moléculas inductoras como Jasmonato de metilo (MeJA), ácido salicílico (SA) o Ácido beta aminobutírico (BABA) puede inducir una protección de amplio espectro y de larga duración frente a patógenos. Se ha observado que estos inductores pueden regular positivamente la inducción de genes marcadores de defensa confiriendo resistencia ante los agentes patógenos. Se tiene la hipótesis que la activación en tiempo e intensidad de los mecanismos de defensa es lo que marca la diferencia entre una planta susceptible a una resistente. En el género *Capsicum spp.* se ha observado que tanto en las variedades resistentes y susceptibles a la antracnosis, provocada por el agente patógeno *Collectotrichum truncatum* la expresión de genes se ve modificada, la diferencia entre ambas variedades es el tiempo y la intensidad en que la expresión de los genes relacionados con la resistencia se presenta durante la infección (Mishra *et al.*, 2017). Ante estas evidencias, el estudio de estas variaciones en la expresión de genes de resistencia en variedades susceptibles y tolerantes puede ayudar a entender que factores influyen en conferir resistencia a la planta en contra del patógeno, donde puede influir la regulación mediada por diversas fitohormonas (Li *et al.*, 2020). En este trabajo se busca evaluar las variaciones en la expresión de genes en el género *Capsicum* frente a diversos tratamientos con fitohormonas y con el inductor de memoria celular BABA al enfrentarse a una infección con el patógeno *P. capsici*. Con el objetivo de analizar los niveles de tolerancia asociados a cada uno de los tratamientos a nivel macroscópico y a nivel de expresión de genes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generales

Al ser organismos sésiles, las plantas a menudo están expuestas a una amplia gama de estreses. Para adaptarse a situaciones tan adversas, las plantas han desarrollado mecanismos que ayudan a percibir la señal de estrés y permiten una respuesta óptima. Las fitohormonas juegan un papel vital en la estimulación de los mecanismos de respuesta de defensa de las plantas. Las elaboradas redes de señalización hormonal y su capacidad de diafonía las convierten en candidatas ideales para mediar en las respuestas de defensa (Vishwakarma *et al.*, 2017). Estudios han demostrado que las fitohormonas aumentan su concentración en algunas plantas en respuesta a infecciones de diversos patógenos, e incluso se ha observado que la aplicación de fitohormonas de manera exógena puede inducir la expresión de genes relacionados a la defensa del organismo. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se inducen estas respuestas son complejos, y es importante considerar que en la naturaleza normalmente la planta enfrenta diversos patógenos al mismo tiempo, teniendo una serie de respuestas complejas para cada uno. Algunas de las interacciones entre diferentes fitohormonas pueden ser antagónicas, como es el caso de SA y JA para el caso de *Arabidopsis* de acuerdo con lo descrito por Bari y Jones (2009), de igual forma puede presentarse lo contrario, una interacción sinérgica, como ocurre con ET y JA, en el mismo estudio, en el cual también se hace referencia a que se han presentado evidencias indicando que también puede haber interacciones sinérgicas entre SA y JA/ET (Bari y Jones, 2009).

Para poder entender los mecanismos de defensa, diversos estudios se han realizado durante interacciones compatibles e incompatibles, en donde se ha observado que el tiempo y la intensidad de la respuesta son un punto importante (Mishra *et al.*, 2017; Kondratev *et al.*, 2020). A pesar de que se conocen muchos de los elementos clave de los mecanismos de defensa, aún existen brechas por comprender. Como alternativa el empleo de moléculas inductoras no biológicas ha ganado gran popularidad en el análisis de vías biológicas. Los inductores sintéticos pueden desencadenar reacciones de defensa al imitar las interacciones de los inductores naturales o moléculas de señalización de defensa. Una vez que un patógeno infecta las plantas preparadas (con tratamiento previo de inductores químicos) las respuestas

de defensa se activan más rápido y con más fuerza (Bektas y Eulgem, 2015). Venegas-Molina y colaboradores (2020) analizaron diversos inductores químicos en conferir la tolerancia inducida ante estrés biótico y abiótico en brócoli (*Brassica oleracea*) y la compararon con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Estudios recientes han incluido a los inductores químicos para el estudio de los mecanismos de defensa contra los complicados patógenos de tipo hemibiotróficos (Halim *et al.*, 2007; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011); se ha observado que la aplicación de MeJA en camelia, sésamo y papa reducen lesiones necrotroficas contra patógenos hemibiotróficos (Chowdhury *et al.*, 2017; Kondratev *et al.*, 2020; Arévalo-Marín *et al.*, 2021). En plantas del género *Capsicum* se han realizado estudios para evaluar los efectos de fitohormonas al aplicarse previo a la infección con el patógeno, un ejemplo de ello se observa en *Capsicum chinense* previamente tratado con varias fitohormonas (SA, ET y MeJA) y posteriormente retado con *P. capsici*, donde el tratamiento previo con ET logró prevenir la infección del agente patógeno, siendo la expresión del gen PR1 (que regularmente se asocia a SA) un factor importante (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha reportado que la aplicación de BABA en *C. annuum* confiere una tolerancia a este patógeno. Debido a la complejidad de los mecanismos de defensa de las plantas ante un agente patógeno, un análisis correspondiente a la expresión de los genes que forman parte de dicha respuesta puede ayudar a entender a detalle que inductores tienen efecto sobre la resistencia de la planta al patógeno y los genes que se expresan como consecuencia.

## **2.2 Antecedentes del objetivo particular 1**

### **2.2.1 Problemáticas asociadas a la producción de cultivos**

El uso de *Capsicum* se extiende a diversas aplicaciones, la mayoría en el ámbito gastronómico, actuando como especia, como colorante, e incluso con aplicaciones medicinales como analgésico. A lo largo de los años la producción de chile en diversas partes del mundo ha ido incrementando, siendo considerado como un cultivo de alto valor. El crecimiento y desarrollo de *Capsicum* es limitado por factores bióticos y abióticos. La producción de este cultivo es afectada entre el 27 al 42% por factores bióticos, la gama de patógenos de *Capsicum* incluye

hongos, virus, bacterias, oomicetos e insectos (Parisi *et al.*, 2020). Para contrarrestar estos agentes patógenos se han utilizado tradicionalmente plaguicidas de síntesis química causando otros tipos de problemas (Barra-Bucarei y Ortiz, 2020). Los agentes patógenos del suelo son complejos de erradicar, entre estos se encuentran los oomicetos; se estima de acuerdo con un estudio realizado por Bosland en 2008 que, a nivel global, las pérdidas estimadas por el oomiceto hemibiotrófico *P. capsici* son mayores a los USD \$100 millones en pérdidas anuales. *P. capsici* es parte de un complejo de especies, estudios de población de *P. capsici* indican que existe un alto nivel de heterociguidad, debido a esta característica, las poblaciones del patógeno pueden variar considerablemente, presentando una elevada variedad genotípica. Este aspecto se considera parte importante de la capacidad del patógeno de atacar a diversos grupos de hospederos (Barchenger *et al.*, 2018). La existencia de diversas poblaciones de patógenos y razas fisiológicas dentro de *P. capsici* ha limitado el desarrollo de cultivares resistentes. Se ha reportado que variedades resistentes a un aislado de una región determinada de *P. capsici* no resisten a aislados de otras regiones, siendo el grado diferencial de la virulencia de *P. capsici* en un hospedero otro factor que determina la resistencia de una variedad (Oelke *et al.*, 2003; Foster y Hausbeck, 2010).

### 2.2.2 Oomicetos

Los oomicetos son organismos eucariotas filamentosos, pertenecientes al *phylum* de Oomycota, que comprenden más de 1500 especies, entre las cuales se encuentran patógenos importantes. Los oomicetos presentan diversos estilos de vida dependiendo su ambiente, si es acuático o terrestre, y debido a algunas de sus características han sido comúnmente asociados a los hongos, denominados en anterioridad como hongos acuáticos, no obstante, se han diferenciado de los mismos debido sus características estructurales como una pared celular compuesta de celulosa, y más importante diferencias en secuencias de ADN, que clasifican a hongos y oomicetos en reinos diferentes, siendo estos últimos más cercanos evolutivamente a las algas. Actualmente los oomicetos comprenden algunos de los patógenos más devastadores conocidos, causando enfermedades ampliamente conocidas y estudiadas (Zoghbi-Rodríguez y Teresa Hernández-Sotomayor, 2019; Judelson y Ah-Fong, 2019).

El *phylum* Oomycota se divide en dos clases principales, Saprolegniomycetes y Peronosporomycetes, en esta última clase es en la cual se encuentran los patógenos más dañinos, especies como *Phytophthora*, *Pythium* y *Albugo*. Los oomicetos han evolucionado en diversas formas de vida infecciosas, presentándose en ellos los tres tipos característicos de infección, biotrófico, necrotrófico y hemibiotrófico. Se han reportado pocos oomicetos con actividad biotrófica obligada, donde el patógeno resulta dependiente en su totalidad del hospedero. En el género *Pythium* se encuentran organismos necrotróficos, que atacan tejidos de plantas con inmunidad comprometida, ya sea por estrés o por alguna otra circunstancia. Las diferentes especies de *Phytophthora* por otra parte, tienen un estilo de vida hemibiotrófico, caracterizado por una infección inicial de tipo biotrófico, con poco o ningún daño presente al tejido de hospederos, posteriormente cambiando a una infección de tipo necrotrófica, una vez establecida la colonización en el hospedero, en general esta especie, a diferencia de otros oomicetos, es manejable y susceptible a transformaciones, por lo cual es común como objeto de estudio, y ha formado parte de diversos estudios moleculares (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Jiang y Tyler, 2012; Judelson y Ah-Fong, 2019).

La interacción de los oomicetos con sus hospederos comienza con la diseminación e infección por medio de esporas, donde la colonización en el hospedero da inicio con la liberación de zoosporas, enquistándose en la planta. Posterior a esta colonización, los oomicetos entran en el hospedero, haciendo uso de diversas rutas, por el apoplasto de la planta, o a través de las estomas y otras aperturas naturales en la planta. Una vez dentro de la misma, se adhieren al hospedero para iniciar la infección, en esta primera instancia, por lo general las plantas manejan sistemas de defensa para detección de microbios, por detección de PAMPs y activación se la inmunidad activada por PAMPs, donde interactúan rutas de ácido salicílico y de jasmonatos para la defensa de la planta. Los oomicetos han desarrollado un comportamiento que dificulta su detección en la primera etapa de infección de tipo biotrófica, minimizando la respuesta inmune de la planta al mantener la integridad del hospedero, con lo cual son capaces de superar esta línea de defensa por parte de la planta y continuar con su desarrollo dentro de la misma, una de las características importantes que presentan en esta fase es la interacción con el hospedero haciendo uso de su haustorio, que junto con células del hospedero forman una membrana denominada extrahaustorial, la cual tiene un rol importante en esta interacción, que

no ha sido del todo descrito y requiere más estudios para su comprensión, se ha hipotetizado que tiene un rol importante en la adquisición de nutrientes del oomiceto, obteniendo recursos del hospedero. La última etapa de la infección corresponde a las estrategias del patógeno para abandonar el hospedero, en esta fase los organismos hemibiotróficos producen esporas asexuales las cuales quedan presentes en suelo, en la superficie de las raíces de las plantas infectadas. En hemibiótrofos que infectan en hoja esta esporulación se produce en esporangiosporas para poder pasar a través de las estomas, procediendo a infectar hospederos cercanos (Judelson y Ah-Fong, 2019).

La virulencia que presentan los oomicetos está asociada a diversas familias de proteínas que son capaces de producir, entre las cuales se incluyen toxinas extracelulares, enzimas hidrolíticas, inhibidores, proteínas efectoras capaces de entrar al citoplasma de las células de plantas hospederas, entre otras. Los oomicetos que tienen éxito en infectar a su hospedero son aquellos que por medio de sus efectores pueden intervenir en procesos celulares de las plantas, afectando los mecanismos de defensa. Por ejemplo, algunos efectores en *Phytophthora* y *Hyaloperonospora* son capaces de suprimir la inmunidad activada ante la detección de flg22, que es un PAMP asociado a la flagelina, otros efectores son capaces de interferir por medio de la inhibición de enzimas, como las proteasas y peroxidasas. Estos mecanismos de infección son diversos, y varían para cada patógeno y para cada hospedero (Fawke *et al.*, 2015). Se ha reportado que la infección de patógenos del género *Phytophthora* se asocia a la producción de proteínas tipo péptido que inducen necrosis (NLPs) los cuales activan la muerte celular en un amplio rango de plantas dicotiledóneas. Esta familia de proteínas está ampliamente representada en diversas especies de *Phytophthora*, e incluso se ha generado la hipótesis de que estas proteínas son responsables del cambio de fase de la infección de tipo hemibiotrófica que presentan estos patógenos. Entre otro tipo de efectores importantes que producen estos patógenos se encuentran enzimas hidrolíticas, enzimas inhibidoras y efectores RxLR (Jiang y Tyler, 2012; Fan *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2021).

Los oomicetos de tipo hemibiotrófico como *P. infestans* tienen un sistema elegantemente coordinado para controlar la transición de la fase biotrófica, la cual se caracteriza por ser la etapa temprana asintomática de la infección, a la fase necrotrófica que se presenta en tiempos

más tardíos y está caracterizada por la degradación del tejido de la planta y la aparición de síntomas de la enfermedad. Se ha indicado que cada una de estas fases puede estar asociada a diferentes proteínas efectoras que suprimen la respuesta de defensa de la planta, y posteriormente inducir necrosis en la misma (Lee y Rose, 2010). Cada fase está caracterizada por síntomas específicos los cuales están correlacionados con genes específicos del patógeno que pueden ser considerados genes marcadores de la fase infectiva. La duración de cada fase de infección en patógenos hemibiotróficos parece ser específico del género o la especie. En *P. capsici* los genes marcadores de fase infectiva son *PcHmp1* (Proteína 1 de la membrana del haustorio), *PcNpp1* (Proteína 1 de *Phytophthora* inductora de necrosis) y *PcCdc14*, la expresión de estos genes durante la infección ha sido un indicador del tipo de vida hemibiotrófico que presenta, donde las primeras 24 horas de la infección corresponden a una fase biotrófica, seguida de una transición entre las 24 y 48 horas a una fase necrotrófica y a las 72 horas se genera esporulación. El gen *Hmp1* está asociado a la fase biotrófica, pues es encargado de co-regular diversos genes asociados a metabolismo de proteínas y procesos biosintéticos que sugieren la actuación de maquinarias celulares que promueven un incremento en la producción de proteínas requeridas en la iniciación y mantenimiento de una fase biotrófica. El gen *PcNpp1* se asocia a la fase de transición donde se pasa de un carácter biotrófico a uno de tipo necrotrófico, este gen está asociado a diversos procesos catabólicos, indicando tener un papel en la degradación de proteínas del patógeno durante la fase de transición. El gen *Cdc14* se asocia a la fase tardía de la infección, interviniendo en señales de transducción y de procesos metabólicos requeridos en los procesos de reprogramación celular y la formación de esporas. (Lamour *et al.*, 2012b; Jupe *et al.*, 2013; Zuluaga *et al.*, 2016).

### **2.2.3 *Phytophthora capsici* y sus diversos hospederos**

Una de las características más importantes de los oomicetos, y del género *Phytophthora* es su alta variabilidad genotípica, la cual le otorga una alta capacidad de adaptarse e infectar diversos hospederos, estén o no cercanamente relacionados evolutivamente, actualmente se conocen más de 150 especies de *Phytophthora* dentro de las cuales se encuentran algunos de los patógenos más nocivos para las plantas a nivel mundial, como *Phytophthora infestans*, *Phytophthora capsici*, entre otros. Cada especie de *Phytophthora* tiene un amplio rango de

hospederos, En 2008 se estimó que aproximadamente 58 géneros en 28 familias diferentes eran hospederos de *P. capsici*, entre ellos cultivos de importancia comercial, plantas ornamentales y nativas, siendo principalmente cucurbitáceas y solanáceas las familias de mayor susceptibilidad a este patógeno. Este patógeno se ha ido esparciendo geográficamente, y debido a sus características genotípicas es capaz de adaptarse dinámicamente a nuevos hospederos (Cline *et al.*, 2008; Lamour *et al.*, 2012b).

De acuerdo con Lamour y Hausbeck (2004) existen diversos cultivos importantes susceptibles a *P. capsici* en Estados Unidos, que en condiciones favorables para el patógeno se estima causan pérdidas del 25% del valor del estado correspondiente al cultivo de estas diversas especies, principalmente de Cucurbitáceas, Solanáceas y Leguminosas. Tian y Babadoost (2004) reportaron por primera vez a la remolacha (*Beta vulgaris*), acelga (*Beta vulgaris* var. *cicla*), frijol lima (*Phaseolus lunatus*), nabo (*Brassica rapa*), espinaca (*Spinacia oleracea*) y hoja de terciopelo (*Abutilon theophrasti*) como hospederos de un aislado de *P. capsici* obtenido de tejido infectado de calabaza. Adicionalmente los autores observaron que diversos aislados de este oomiceto presentaron menor virulencia en *Cucurbita moschata* que en *Cucurbita pepo*, ellos concluyeron que el genotipo del hospedero también influye en la interacción con *P. capsici* con el hospedero. Es posible que la susceptibilidad a esta infección en diversos hospederos se deba a diferencias en la virulencia y patogenicidad de la población local del patógeno, presentándose incluso entre variedades mismas del hospedero diferencias de tiempo del ciclo infectivo y en la sintomatología (Tian y Babadoost, 2004; Hausbeck y Lamour, 2004).

#### **2.2.4 *Phytophthora capsici* y el género *Capsicum***

En 1908 Fabian García evaluó el cultivo de chile en Nuevo México, donde establece diversas características de cultivo y problemáticas asociadas. Leonian (1922) fue el primero en identificar como tal que la enfermedad de la marchitez del chile era causada por un patógeno, descubriendo los síntomas comunes como la aparición de pequeños puntos en frutos, con un aparente exceso de agua o remojo del tejido, lesiones que con el paso del tiempo aumentan en tamaño y resecan el tejido, convirtiéndose en la marchitez característica, este patógeno identificado se le denominó *Phytophthora capsici* Leonian. Desde ese reporte el número de

estudios sobre esta interacción se ha incrementado. La colonización de *Capsicum spp.* por *P. capsici* ha sido evaluada por diferentes estrategias, a nivel microscópico mediante el análisis de los síntomas basados en una escala de severidad de la enfermedad, usando microscopia electrónica y óptica, empleando histoquímica e inmunquímica, cuantificando al patógeno por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estas herramientas han permitido la identificación de plantas resistentes y susceptibles (Fernández Pavía *et al.*, 2004; Saltos *et al.*, 2021).

Adicionalmente, el método de inoculación utilizado también ha sido ampliamente evaluado para poder realizar un cribado confiable de plantas tolerantes a este agente patógeno. La idea es que el método de inoculación debe permitir una infección consistente en toda la población para evitar seleccionar falsos tolerantes, con la finalidad de llevar a cabo estudios confiables que permitan evaluar estas interacciones y que se estén llevando a cabo de manera consistente, es por esta razón que diversas metodologías existen que promueven la infección en plantas estudiadas, bajo diversas estrategias, una de estas es la inoculación por medio de zoosporas, otra metodología comúnmente utilizada consiste en inocular con discos de medio PDA con crecimiento de la cepa, estos métodos aportan cada uno ciertos beneficios de acuerdo al enfoque del estudio, dependiendo del patosistema evaluado, puesto que el método de inoculación puede ser la diferencia entre evaluar una interacción compatible y una incompatible, debido al estadio de desarrollo del patógeno al momento de inocular (Gevens *et al.*, 2006; Monroy-Barbosa y Bosland, 2010; Kondratev *et al.*, 2020).

Diversos estudios se han realizado para determinar la tolerancia de diversas variedades de *Capsicum* a esta enfermedad y evaluar sus efectos, en 1991 Bosland y Lindsey establecieron un nuevo método para identificar la resistencia y susceptibilidad a diferentes cultivares de chile ante la pudrición de la raíz causada por *Phytophthora*, en este estudio evaluó diversas líneas de chile, inoculando con el patógeno por medio de discos de medio con crecimiento de *P. capsici*, donde estableció un índice de severidad de 0 a 9, que permitía evaluar la aparición de síntomas a lo largo del tiempo posterior a la inoculación de la planta con el patógeno. El método de inoculación mencionado permitió la diferenciación de plantas resistentes y susceptibles a la enfermedad de pudrición de la raíz, las plantas resistentes mostraban poca o ninguna presencia de síntomas, mientras que las variedades susceptibles presentaban síntomas cada vez más

severos con el paso del tiempo, hasta llegar a la muerte de la planta. En 2010 Monroy-Barbosa y Bosland evaluaron los efectos de la enfermedad asociada a diversas cepas de *P. capsici* con un método que permitió evaluar en una planta, por medio del establecimiento de diversas escalas de severidad de 0 a 5, a nivel macroscópico, el efecto de las diversas cepas del patógeno sobre la misma. Esta técnica estableció una forma rápida de evaluar los efectos de diversas cepas de patógeno sobre una misma planta. en este estudio estableció también la aparición de los primeros síntomas a los 2 días posteriores a la inoculación, y se evaluó comparando variedades susceptibles a la enfermedad con la variedad resistente Criollo de Morelos (CM-334). En 2005 Silvar y colaboradores establecieron una metodología para la detección y cuantificación de *P. capsici* en plantas, por medio de una correlación con la concentración de ADN del patógeno y la susceptibilidad de la planta a la infección por *Phytophthora*. El método se basa en hacer uso de la técnica de qPCR para la medición del contenido de ADN del patógeno en las muestras, haciendo uso de primers específicos del gen CAP que corresponde a una región ITS específica de *Phytophthora capsici*, al evaluar la concentración de este gen en diversas muestras infectadas, y correlacionarlo con una curva estandarizada se pudo establecer una relación entre la cantidad de CAP y la del patógeno en la planta, de manera que determinaron si había un aumento en el contenido de patógeno en la planta y asociarlo a la susceptibilidad de la misma a la infección, en este estudio evaluaron la susceptibilidad a la enfermedad en diversas variedades de Chile. El único cultivar conocido que presenta resistencia a diversos aislados de *P. capsici* es la variedad Criollo de Morelos CM-334, el cual posee frutos de pocas características agronómicas que limitan su comercialización, el estudio de esta resistencia forma parte de la estrategia para entender la interacción de las plantas con el patógeno y encontrar una vía de mejoramiento de cultivos (Silvar *et al.*, 2005b; a; Monroy-Barbosa y Bosland, 2010; Granke *et al.*, 2012).

Uno de los factores más relevantes al momento de estudiar interacciones entre plantas y patógenos es el grado de virulencia que presenta un patógeno en particular, el cual puede variar de acuerdo con diversas condiciones, siendo diferente incluso entre diversas cepas de un mismo organismo. Muchos de los estudios que tratan las interacciones planta patógeno suelen enfocarse en el estudio de genes de avirulencia (Avr). Se ha evaluado que los genes que determinan la resistencia y susceptibilidad en las plantas son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en los patógenos (Kenneth Madriz Ordeñana, 2002).

Debido a que *P. capsici* presenta una variabilidad en la virulencia, donde se pueden presentar diversos fenotipos asociados a la infección, es que es complicado encontrar material vegetal con resistencia al patógeno.

Un estudio realizado con aislados de *P. capsici* Leonian recolectados en el noroeste de España, sobre genotipos de *C. annuum* con orígenes diversos (Incluido el criollo de Morelos 334) indicó que existen diferencias significativas en la interacción genotipo-aislado, y diferencias de virulencia entre los diferentes aislados inoculados (Andrés Ares *et al.*, 2005). Un estudio sobre la variabilidad morfológica de diversas cepas de *P. capsici* aisladas de Chile pimiento morrón (*Capsicum annuum*) indica que este patógeno presenta alta variabilidad de virulencia y de sensibilidad a fungicidas, al obtenerse diversos tipos de colonias con morfologías diferentes (estrellada, petaloide y radial), así como variación en la sensibilidad hacia mefenoxam. Siendo un alto porcentaje (86.6%) de los aislados inoculados altamente virulentos, produciendo síntomas a los cuatro días posteriores a la inoculación (Sánchez-Gurrola *et al.*, 2019). También se ha evaluado el fenotipo de la enfermedad asociado a la virulencia en Chile de *P. capsici* aislado de las regiones de Michoacán, México. Reyes-Tena y colaboradores en 2019 evaluaron estos fenotipos asociados a la infección de *P. capsici* en Chile *Capsicum annuum*, usando 26 Chile de líneas recombinantes de Nuevo México (NMRILs) en condiciones de invernadero, donde determinaron 10 aislados patógenos asociados a 10 fenotipos de virulencia.

México tiene una gran cantidad de haplotipos de *Capsicum*, se ha observado una gran variabilidad genética entre ellos. Diversos autores han reportado que las diferentes variedades del género *Capsicum* presenta diferente grado de tolerancia ante el patógeno *P. capsici*. Moran-Bañuelos y colaboradores (2010) evaluaron la resistencia a *P. capsici* de 29 poblaciones de Chile nativos del sur de Puebla bajo condiciones de invernadero, registrando aparición de síntomas, incidencia, y acumulación de necrosis en diversas partes de la planta, indicando que existen diferencias significativas entre las distintas poblaciones, dando indicios de que la defensa particular de ciertas poblaciones de Chile pueden presentarse como alternativa de estudio en programas de mejoramiento de cultivo, resultados similares son los presentados por Reyes Tena y colaboradores (2019). Todas estas evidencias indican que existen diferencias significativas en la interacción genotipo-aislado, observándose por ello diferente virulencia de

una cepa ante las diferentes variedades del género *Capsicum* (Andrés Ares *et al.*, 2005; Morán-Bañuelos *et al.*, 2010; Reyes-Tena *et al.*, 2019).

## **2.3 Antecedentes del objetivo particular 2**

### **2.3.1 La respuesta de defensa de la planta se induce al reconocer elementos del patógeno**

Las plantas pueden contrarrestar el estrés biótico, con mecanismos sofisticados de reconocimiento y defensa ante agentes patógenos, esto da lugar a una interacción de tipo compatible si los mecanismos de defensa se ven superados por los mecanismos de infección de un patógeno; por otro lado, en la interacción de tipo incompatible se contrarresta el ataque del agente patógeno. Los mecanismos de defensa pueden ser constitutivos, estando siempre presentes en la planta, y formando parte de la primera línea de defensa ante cualquier amenaza que pueda encontrarse en su ambiente, donde se provee una forma pasiva de resistencia. Ejemplos de estos son la formación de capas gruesas de cutícula en las plantas, que forman barreras físicas que impiden el ataque de patógenos, y también hay defensas químicas constitutivas como la acumulación de compuestos tóxicos en células vegetales, estos mecanismos se encuentran siempre presentes y sus características dependen del organismo. El primer nivel del sistema inmune de la planta corresponde a la percepción de patógenos a través del patrón molecular asociado a patógenos de reconocimiento (PAMP) (o patrón molecular asociado a microbios o daños) lo cual genera una inmunidad activada (PTI, esto se lleva a cabo mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que detectan y reconocen diversos estímulos, tanto químicos como físicos y biológicos. Las proteínas de reconocimiento más estudiadas son las RLPs y las RLKs, las primeras tienen dominios de repeticiones ricas en leucina, con un C-terminal ligado a la membrana, mientras que las RLKs son quinasas que poseen un dominio extracelular con un N-terminal, un dominio transmembranal y un dominio quinasa C-terminal dentro de la célula, es intercelular. La percepción de patógenos también puede ocurrir a través del reconocimiento de efectores de patógenos (moléculas sintetizadas para mejorar la aptitud de los patógenos) a través de proteínas de resistencia a enfermedades (proteínas R) de las plantas que pueden implementar una inmunidad llamada inmunidad activada por efectores (ETI), siendo por ello los genes de resistencia (Genes R) a enfermedades en plantas importantes

componentes genéticos de resistencia, estos genes R codifican en su mayoría para proteínas NBS-LRR (Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat), que suelen interactuar principalmente en mecanismos de detección de patógenos, como moléculas efectoras provenientes de estos, o proteínas asociadas a patógenos. Estas interacciones entre la planta y el patógeno dependen en gran medida del contenido genético de cada organismo, del cual dependerá la capacidad del organismo de poder contrarrestar ya sea las defensas o los ataques del otro. La resistencia inducida en plantas es un mecanismo de defensa que involucra la expresión de genes y una serie de cambios metabólicos, consecuencia del reconocimiento específico por parte de la planta, de estructuras asociadas a patógenos. Un ejemplo del reconocimiento de patrones moleculares se da en la interacción con el péptido flg22, que es derivado de la flagelina y actúa como un PAMP, y su reconocimiento activa cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), donde por ejemplo en *Arabidopsis* se activan las proteínas MPK3, MPK4 y MPK6 en respuesta a estímulos asociados con flg22, de manera que se regula la defensa en función de estas interacciones. En el caso de *Arabidopsis* se ha visto que la MPK6 y el factor de respuesta a etileno ERF104 están asociadas a esta respuesta ante la presencia de flg22, estimulando la producción de etileno en un mecanismo de interacción dinámico que no está del todo descrito (Bethke *et al.*, 2009; Chávez-Díaz y Zavaleta-Mejía, 2019).

Entre los mecanismos de defensa se encuentra la resistencia sistémica adquirida, que involucra la respuesta que se activa para contrarrestar ataques de patógenos, y la resistencia inducida, donde se involucran los cambios metabólicos y mecanismos de reconocimiento. La importancia de estos mecanismos de reconocimiento de patógenos es elevada, de esto depende la respuesta de defensa en la planta, y por lo regular estos mecanismos son el objetivo del ataque de diversos patógenos, que tratan de inhibir su detección para facilitar la infección. Los modelos que describen estos mecanismos consideran la interacción entre productos de un receptor codificado por genes *R* en planta, y un ligando, codificado por genes *Avr* del patógeno. Esta interacción genera una cascada de reacciones de defensa, actualmente gracias al avance de tecnologías para el estudio de estas interacciones se ha caracterizado a nivel molecular diversos genes *R* y *Avr*, los cuales son específicos de una planta con su patógeno. Por ejemplo, se caracterizó el Gen R, denominado *Prf*, asociado a la detección del gen *AvrPto* del patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, también el gen *Cf-2* asociado al gen *Avr2* en la interacción

de Tomate-*Cladosporium fulvum*. La mayoría de estas proteínas codificadas por genes R de las plantas tienen características específicas, como la presencia de proteínas NBS-LRR, que son proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR) y de sitios de unión a nucleótidos (NBS), por lo que son capaces de unirse a moléculas de ATP y GTP. Algunas de estas proteínas codificadas por genes R poseen dominios transmembrana, lo que permite que sean capaces de ejercer su labor de reconocimiento en el exterior de la célula, de forma complementaria también pueden localizarse en el citoplasma, para reconocimiento de productos Avr en el interior de la célula, de manera que este reconocimiento conforma el primer paso del complejo sistema de defensa que ejerce la planta. Estas proteínas NBS-LRR reconocen proteínas efectoras y Avr de todo tipo de patógenos y diversos genes R, lo que confiere resistencia a genes de *Phytophthora*, de los cuales se han investigado algunos, como Rb/RpiBlb1, R1, R3b y R3a, que confieren resistencia a *P. infestans*, también los genes Rps1k, Rps4 y Rps6, que se ha evaluado confieren resistencia a *P. sojae* (Kenneth Madriz Ordeñana, 2002).

### **2.3.2 Los mecanismos de defensa en plantas son altamente regulados**

Los mecanismos de defensa como respuesta al reconocimiento de ciertos patógenos se dan por un complejo sistema de señalización celular que genera un gran número de cambios en la planta, de tipo metabólico y morfológico, y de la expresión de genes relacionados con la defensa (Bari y Jones, 2009). Estos mecanismos por lo general incluyen aspectos como la muerte celular por reacción hipersensible, la acumulación de metabolitos con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo, para evitar el avance del patógeno. La inducción de estos mecanismos de defensa suele activarse por la presencia de ciertas moléculas en las plantas, las fitohormonas, las cuales son encargadas de diversas funciones relacionadas con procesos de desarrollo y crecimiento en plantas, así como en la respuesta a estrés biótico y abiótico en las mismas. Dentro de las fitohormonas más conocidas por ser partícipes en estos mecanismos de defensa inducida se encuentran el ácido Salicílico (SA), etileno (ET) y el Jasmonato (JA), también algunas otras como las auxinas, giberelinas, el ácido abscísico y citoquininas (Bari y Jones, 2009). Las fitohormonas regulan una gran variedad de procesos fisiológicos en las plantas. Además, el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico y el etileno son responsables de las respuestas de defensa primarias

contra el estrés abiótico y biótico, mientras que los reguladores de crecimiento de las plantas, como las auxinas, los brasinoesteroides (BR), las citoquininas (CK), el ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA), también contribuyen a la inmunidad de las plantas.

El SA, JA y ET ejercen funciones muy importantes en la regulación de respuesta de defensa en las plantas ante patógenos, plagas y diversos tipos de estrés abiótico. En lo que respecta a la defensa ante patógenos, se sabe que el SA actúa en respuesta de infecciones de patógenos biotróficos y hemibiotróficos, mientras que el ET y el JA inducen respuesta correspondiente a los patógenos necrotróficos. El rol que tiene el ácido salicílico en la defensa ante patógenos ha sido muy estudiado, esta molécula fue identificada como una molécula de señalización esencial en la respuesta de defensa de la planta. Para remarcar su importancia, se ha estudiado que plantas mutantes afectadas en su sistema de acumulación de SA, suelen ser más susceptibles a infecciones por este tipo de patógenos biotrófico y hemibiotróficos, en plantas *Arabidopsis* y de tabaco mutantes incapaces de acumular SA se observó una hiper susceptibilidad a patógenos virulentos, incapaces de activar la resistencia sistémica adquirida (SAR) estas mutaciones también afectan la respuesta hipersensible de las plantas, debido a que el SA también ejerce una función importante en esta respuesta. Los niveles de SA en tejidos infectados suelen estar correlacionados con la infección de patógenos de este tipo, e incluso se ha remarcado que la aplicación exógena de esta fitohormona puede resultar en la inducción de genes relacionados a la patogénesis (PR), potenciando la resistencia ante un amplio rango de patógenos. Las vías de señalización asociadas a SA, JA y ET se caracterizan por modular la expresión de genes relacionados con la defensa de la planta, uno de ellos es el gen no expresor de genes *PR 1(NPR1)*, que interactúa con factores de transcripción involucrados en la activación de genes PR en respuesta a SA, este gen es altamente importante en la expresión de genes PR, y de genes asociados a la resistencia sistémica inducida y adquirida. El gen NPR1 es mediador en el señalamiento cruzado entre SA, JA y ET, se ha demostrado que mutantes deficientes a este gen suelen ser más susceptibles a enfermedades, y mutantes que lo sobre expresan han adquirido un aumento en resistencia a patógenos diversos (Halim *et al.*, 2006; Diaz-Puentes, 2012).

Por otra parte, de igual forma se ha indicado la importancia del JA y el ET en la defensa ante organismos necrotróficos, se ha indicado incluso que las rutas de defensa entre SA y JA/ET

suelen resultar antagónicas, dando indicio de que los mecanismos de defensa son dependientes del tipo de infección que se genera en la planta. Defensas mediadas por JA están asociados a la expresión de los genes LOX, los cuales codifican para enzimas que cumplen roles importantes al inicio de la cascada de síntesis de Jasmonatos. En un estudio, plantas de *Nicotiana bentamiana* mutantes en el gen *LOX3* disminuyen la acumulación de Jasmonato, lo cual a su vez reduce la resistencia de la planta ante herbívoros, en este estudio, un tratamiento con MeJA permitió reestablecer el desarrollo de la planta mutante, demostrando la importancia de la fitohormona y su interacción con el gen *LOX3* en mecanismos de defensa y desarrollo. (Hammerschmidt y Schultz, 1996; Bari y Jones, 2009; Avanci *et al.*, 2010). Las vías mediadas por JA también están asociadas a la expresión del gen *PDF1.2*, el cual constantemente se ve regulado por la interacción con la vía de expresión antagónica asociada a SA, y suele ejercer su función río abajo de los genes LOX en la cascada de señalización. Estudios en *Arabidopsis* han demostrado que mutantes comprometiendo la capacidad biosintética de Jasmonato, o la percepción de este, inhibiendo la expresión de genes *JAR1*, *COI1*, *JIN1*, no fueron capaces de sintetizar ácido jasmónico, estas plantas comprometieron su defensa ante ataques de insectos y de hongos patógenos. El Etileno (ET) regula aspectos de crecimiento y desarrollo, el desprendimiento de frutas, senescencia de flores y abscisión de hojas, suele estar asociado a la expresión del gen *ETR1*, este gen ha sido ampliamente estudiado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y se ha demostrado que mutaciones en el mismo están asociados a una insensibilidad a etileno, dado que el gen codifica para un receptor de etileno (Chang *et al.*, 1993; Halim *et al.*, 2006). Estas fitohormonas suelen interactuar ya sea de manera antagónica o sinérgica, con la finalidad de afinar la respuesta de defensa, en *Arabidopsis*, por ejemplo se ha evaluado el efecto de suprimir una de estas vías de señalización, lo cual dio como resultado una mayor susceptibilidad ante el ataque de patógenos necrotróficos como *Botrytis cinérea* y *Alternaria brassicicola*, demostrando la importancia que tiene el jasmonato y etileno en los mecanismos de respuesta ante este tipo de patógenos (Pré *et al.*, 2008).

Las interacciones entre las vías de señalización de SA, JA y ET suelen ser antagónicas, debido a que suelen ejercer su función ante diversos tipos de patógenos (Biotróficos y necrotróficos), no obstante, estas interacciones en ocasiones también son sinérgicas, donde las tres vías de señalización interactúan entre sí para efectuar la respuesta de defensa en planta ante diversos

patógenos. Diversos estudios corroboran esta interacción sinérgica, en 2018, Van den Berg y colaboradores evaluaron el transcriptoma de una interacción incompatible entre *Persea americana* y *Phytophthora cinnamomi*, en este estudio revelaron una interacción en las vías de señalización de SA y JA en una respuesta de defensa exitosa ante el patógeno. Los autores indican que esto se lleva a cabo debido a la característica hemibiotrófica del patógeno, en la cual para una defensa exitosa se requiere tanto de las vías de señalización ante infecciones biotróficas (SA) como la que se asocia a infecciones necrotróficas (JA), esto debido al cambio de fase que presenta la infección hemibiotrófica, este estudio provee evidencia respecto a una respuesta de defensa de tipo bifásica en la planta, en la cual inicialmente se involucra el mecanismo mediado por SA, mientras que a medida que transcurre el tiempo y la infección transita a la fase necrotrófica, se lleva a cabo la defensa mediada por JA, en una interacción entre las dos vías que comúnmente son antagónicas (van den Berg *et al.*, 2018).

### **2.3.3 Respuestas de tipo compatible e incompatible**

Las interacciones planta patógeno presentan dos respuestas posibles, cuando una planta es resistente, la interacción se denomina incompatible, y cuando una planta es susceptible la interacción se denomina compatible. Comprender el reconocimiento, la transducción de señales y los mecanismos de defensa involucrados en la resistencia gen por gen no solo es de gran interés científico, sino que también es importante para controlar las enfermedades de las plantas. Varios genes muestran cambios en la expresión que se utilizan como marcadores de interacciones incompatibles, pero la magnitud y la complejidad de los cambios en la expresión génica se producen durante las interacciones incompatibles no se han documentado bien a nivel del genoma. Con base en estudios de expresión de varios genes, se propuso que la respuesta que ocurre en interacciones compatibles se acelera en interacciones incompatibles (Lamb *et al.*, 1992). No se sabe si es cierto a nivel del genoma. Aunque los mecanismos de transducción de señales de la planta se comparten en gran medida entre interacciones compatibles e incompatibles, una fuerte señalización a etapas tempranas posterior a la infección permite a las plantas superar los efectos de los factores de virulencia durante las interacciones incompatibles (Tao *et al.*, 2003).

La diferencia de fenotipo después de la infección en plantas resistentes o susceptibles depende de complejos mecanismos de señalización para iniciar una respuesta de defensa después del reconocimiento del patógeno. Se ha observado en varios estudios una rápida y fuerte expresión de los genes de defensa en variedades resistentes en contraste con un nivel basal o regulación a la baja en las susceptibles que presentan síntomas severos. En camelia, la resistencia o susceptibilidad al patógeno *Ciborinia camelliae* son definidos por el tiempo de la respuesta de defensa. Resultados similares se han observado en el modelo de *Capsicum* contra el agente patógeno *Phytophthora* y en las plantas de *Arabidopsis* contra el patógeno *Pseudomonas syringae* (Tao *et al.*, 2003; Kondratev *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021).

#### **2.3.4 Los inductores químicos como elementos para activar la defensa en plantas**

El efecto que tienen los inductores químicos sobre la planta puede variar dependiendo la concentración, siendo en algunos casos una delgada línea entre un efecto positivo y uno negativo en la planta. Se conocen varios elementos asociados a la respuesta de defensa en plantas, sin embargo, los detalles de su topología y dinámica aún no se conocen bien. Como alternativa a los estudios genéticos directos e inversos de los mecanismos de defensa, se ha optado por emplear como herramienta moléculas químicas bioactivas. El uso de tales sondas moleculares puede permitir a los investigadores acceder al espacio biológico que antes era inaccesible para los análisis genéticos debido a la redundancia de genes o la letalidad de las mutaciones. Los elicitores sintéticos son pequeñas moléculas parecidas a fármacos que inducen respuestas de defensa de las plantas (Bari y Jones, 2009). Esto se ha visto en diversos estudios, en 2006 Santana-Buzzy y colaboradores evaluaron el efecto de la inhibición del etileno en el cultivo de chile habanero in vitro, donde se demostró que este inductor tenía un efecto negativo en el desarrollo de las plántulas de chile, en el mismo estudio se evaluó la inhibición de etileno por acción de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ), donde en concentraciones adecuadas, estos componentes añadidos al medio de cultivo de las plantas podían inhibir el efecto de la fitohormona, sin afectar como tal la producción de etileno por parte de la planta. Sin embargo, la presencia de etileno a concentraciones adecuadas tiene efectos positivos, se sabe que existen factores en respuesta al etileno (ERF) que son importantes en los mecanismos de defensa y resistencia de la planta. Algunos factores de

transcripción específicos de plantas son responsivos a etileno y están asociados a la respuesta de señalización del mismo, como lo indican Zhang y colaboradores en 2004, donde aislaron factores de transcripción de tomate usando un sistema híbrido de levadura unido a la caja GCC, el cual es un elemento responsivo a etileno y a Jasmonato de Metilo, y se determinó la presencia de un cDNA denominado *JERF1*, el cual codifica para un factor de transcripción ERF, el cual induce su expresión en plantas de tomate por acción de etileno, Jasmonato de metilo, ácido abscísico y tratamientos con sales, esto sugirió que el factor de respuesta puede estar asociado con diferentes rutas de señalización. En el mismo estudio al evaluar este gen en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) la sobreexpresión de este activó la expresión de genes asociados a la tolerancia al estrés salino en la planta, con lo cual se sugirió que el gen *JERF1* estaba asociado a la modulación de tolerancia a estrés osmótico (Zhang *et al.*, 2004; Santana-Buzzy *et al.*, 2006).

El ácido Jasmónico es capaz de inducir cambios bioquímicos y fisiológicos en las plantas, se ha reportado que la aplicación exógena de Jasmonatos induce inhibidores de proteinasas y fenol oxidasas en tomate, la síntesis de nicotina en tabaco, y también está asociado a la síntesis de terpenos en diversas plantas, la síntesis de Jasmonato suele ser inducida por heridas en las plantas, indicando su función en vías de señalización inducidas por heridas. Los JA son reguladores de moléculas LOX, las cuales forman parte de una vía metabólica importante en la conversión de ácido linoléico en la membrana de plantas, a moléculas altamente importantes, entre las cuales se encuentra el mismo ácido jasmónico, el metil Jasmonato y Taumatina. Una de las características de la aplicación exógena de JA es que más que actuar como un inductor directo de la resistencia, a menudo actúa en conjunto con otros mecanismos, amplificando sus efectos (Hammerschmidt y Schultz, 1996; Ruan *et al.*, 2019).

Otro de los inductores que se han estudiado ampliamente por su efecto en diversos mecanismos de desarrollo de plantas es el ácido salicílico (SA). Diversas solanáceas de importancia económica han sido estudiadas bajo los efectos de diferentes concentraciones de fitohormonas, para evaluar si se confiere algún beneficio para el desarrollo de la planta y la defensa ante diversas amenazas, en un estudio de la planta de tomate en 2012 se evaluó el efecto de diversas concentraciones de ácido salicílico, ácido ascórbico y peróxido de hidrógeno

para determinar si conferirían a la semilla de la planta un mecanismo de defensa (priming) que permitiera mejorar la germinación en condiciones de estrés salino. En dicho estudio realizado por Ghoohestani y colaboradores se observó que a concentraciones de 150 ppm de ácido salicílico y ácido ascórbico en condiciones de estrés salino había una mejora significativa en el crecimiento de la planta, en contraste con otros tratamientos y con las semillas sin tratamiento. Demostrando el efecto positivo que puede tener en el desarrollo de la planta el tener una concentración adecuada de fitohormonas. Hay estudios que indican que la aplicación exógena de SA puede inducir resistencia a organismos ante patógenos, como ocurrió en el caso del pepino ante el patógeno *Colletotrichum lagenarium*, de igual forma, es ampliamente conocido que la aplicación exógena de SA tiene un efecto inductor de proteínas PR (Hammerschmidt y Schultz, 1996; Li *et al.*, 2022). En la señalización de defensa mediada por SA vía, la expresión de genes como PR1, PR2, PR4 Y PR5 se han reportado (Van Loon *et al.*, 2006). La ubicación de NPR1 en el núcleo se requiere para la expresión de genes regulados por SA (Spoel *et al.*, 2003).

Muchas de las fitohormonas tienen efectos en diferentes vías de señalización, algunas asociadas a diversos tipos de estrés y pueden tener similitudes entre sí. Yee-Shan Ku y colaboradores en 2018 evaluaron las vías de señalización de respuesta a estrés biótico y abiótico y los entrecruzamientos existentes entre dichas vías, tomando las vías del ácido abscísico, del ácido jasmónico y del ácido salicílico como las principales que interactúan para mitigar los efectos de los diferentes tipos de estrés, encontrando que en estas vías la señal de transducción se lleva a cabo por proteínas unidas a GTP (denominadas proteínas G), las cuales resultan clave en el funcionamiento simultáneo de estas vías de defensa, otorgando una perspectiva más cercana a lo que ocurre en el ambiente natural de la planta, tomando en cuenta que en la naturaleza las plantas se enfrentan a múltiples amenazas simultáneamente (Ku *et al.*, 2018).

## **2.4 Antecedentes del objetivo particular 3**

### **2.4.1 Interacciones compatibles con patógenos hemibiotróficos**

Se han realizado diversos estudios que evalúen la interacción de tipo compatible en diversos patosistemas que involucran patógenos de tipo hemibiotrófico. En 2016, Zuluaga y colaboradores realizaron un estudio para evaluar el transcriptoma de tomate (*S. lycopersicum*)

durante etapas sucesivas de una infección de tipo hemibiotrófico, causada por *P. infestans*, con la finalidad de evaluar los cambios en la expresión de genes y su relación con los mecanismos de defensa de la planta ante la evolución del proceso infectivo, en dicho estudio determinaron la aparición de síntomas claramente visibles en diferentes tejidos a partir de la etapa de transición de la primera fase infectiva (biotrófica) a la fase necrotrófica, presentándose síntomas más severos a lo largo del tiempo, los cuales tenían una aparente relación con los cambios en el transcriptoma de la planta, en la cual de acuerdo a lo evaluado, las primeras etapas de la infección presentaron actividad de genes asociados a la resistencia inducida por ácido salicílico, el cual se caracteriza por ser mecanismo de defensa ante patógenos de tipo biotrófico, en la etapa de transición se observó un decremento en la expresión de estos genes, y un aumento de la expresión de genes asociados al Jasmonato de Metilo, una vez entrando en la fase necrotrófica, donde esta fitohormona cobraría mayor importancia, al ser la principal encargada de la defensa ante patógenos de tipo necrotrófico. Alrededor de 10000 genes asociados a aproximadamente 400 rutas metabólicas mostraron diferencias durante las tres etapas del ciclo infectivo, alrededor de 100 genes de resistencia estaban asociados a los niveles de ambas fitohormonas, lo que provee una perspectiva de cómo se lleva a cabo la infección a nivel de transcripción, desde la perspectiva de la defensa de la planta. Resultados similares se observaron en el estudio de Jupe y colaboradores, evaluando la interacción compatible entre *P. capsici* y tomate, donde se determinó que cada fase de la infección estaba caracterizada por cambios en la expresión de genes específicos que se correlacionaban con vías de señalización en respuesta a diferentes procesos metabólicos, por medio de una dinámica transcripcional altamente regulada tanto en el patógeno como en el hospedero (Jupe *et al.*, 2013; Zuluaga *et al.*, 2016).

#### **2.4.2 Inductores químicos inducen tolerancia en interacciones de tipo compatible contra patógenos hemibiotróficos**

El uso de elicitores como herramienta ha aumentado debido al efecto sobre la reducción de la incidencia de patógenos, así como un efecto potenciador sobre la inducción de la expresión génica de defensa. Los inductores tienen influencia también sobre las fases infectivas de una planta al ser atacada por un patógeno. Diferentes inductores químicos tienen diversos efectos

relacionados con el tipo de infección que puede presentar un patógeno, ya sea biotrófico, necrotrófico o hemibiotrófico. En el caso de los jasmonatos, es conocido el hecho de que esta fitohormona tiene efectos en fases de infección de tipo necrotrófico y ante algunos insectos masticadores, esto se ha estudiado en múltiples sistemas de interacción planta-patógeno, se ha examinado el rol de la respuesta asociada a jasmonatos en la susceptibilidad de plantas ante diferentes patógenos con diferentes estilos de vida, en laboratorio y a nivel de campo. Se ha reportado en plántulas tratadas con Jasmonato de metilo antes del desafío, que los síntomas de necrosis ocurrieron en tiempos tardíos de la infección, contra patógenos hemibiotróficos en camelia, sésamo y papa (Chowdhury *et al.*, 2017; Kondratev *et al.*, 2020; Arévalo-Marín *et al.*, 2021). En otro estudio se examinó la interacción de diversos patógenos ante una planta de tomate (*Solanum lycopersicum* silvestre cv. Castlemart) tipo silvestre y una mutante deficiente de jasmonato (*def1*), se evaluaron ante patógenos de diversos estilos de infección (biotrófico, necrotrófico y hemibiotrófico), en este estudio se observó que la susceptibilidad de la planta ante 5 de 8 patógenos fue incrementada en las plantas deficientes de jasmonato, entre estos patógenos se encontraba *Phytophthora infestans*, ampliamente conocida por su capacidad infectiva y difícil control, siendo un patógeno de tipo hemibiotrófico. En el resto de patógenos la susceptibilidad no se vio afectada, esto indicó que la respuesta asociada a jasmonatos reduce el daño de diversos patógenos y se infiere que existen mecanismos diferentes para enfrentar a diferentes patógenos por parte de la planta, donde interactúan diferentes fitohormonas (Thaler *et al.*, 2004). En 2007 se realizó un estudio por Vincentius A. Halim y colaboradores, donde presentaron evidencia asociada a la importancia del ácido salicílico en la defensa basal de la planta de papa (*Solanum tuberosum*) ante el oomiceto *P. infestans*, causante del tizón tardío de la papa, donde una planta mutante, incapaz de acumular ácido salicílico demostró ser más susceptible a la infección por el patógeno, teniendo una reducida expresión de genes de defensa en etapa temprana de la infección, los cuales ayudan a retrasar los efectos negativos. Un tratamiento de recuperación en el mismo experimento, con un análogo de ácido salicílico demostró, al reducir el crecimiento del patógeno a niveles similares a la planta sin deficiencia, la importancia que ejerce el ácido salicílico en etapas tempranas de la infección, la fase biotrófica (Halim *et al.*, 2007).

En 2017, Chowdhury y colaboradores evaluaron el cambio de fase de la infección de tipo hemibiotrófico de la infección de *Macrophomina phaseolina*, indicando que existe una respuesta diferencial entre variedades resistentes y susceptibles de sésamo, donde se involucran diversas vías de señalización en las diferentes fases del ciclo infectivo. Se evaluó el efecto del priming y de inhibidores de fitohormonas, demostrando que la resistencia a la enfermedad es el resultado de la activación de las vías de señalización de JA-ET, de manera similar se indicó que la variedad de sésamo resistente efectuaba su respuesta de defensa por estas vías de manera más anticipada que la variedad susceptible, lo que parece establecer una importante diferencia en la tolerancia de la planta al patógeno (Chowdhury *et al.*, 2017). De manera similar, un estudio realizado por Kondratev en 2020 evaluando la susceptibilidad y resistencia de la Camelia a la enfermedad del tizón de pétalo indico que un aspecto importante que diferencia a las variedades de Camelia resistentes de las susceptibles es el tiempo de respuesta de las defensas, en este estudio evaluaron Camelias ante *Ciborinia camelliae*, causante de esta enfermedad. Al evaluar este patosistema en una variedad resistente y una susceptible de camelia observaron una diferencia en la expresión de genes, en la variedad resistente se indicó que la modulación de la actividad transcripcional dio inicio rápidamente ante un proceso de inoculación por ascosporas. Para corroborar si el tiempo de respuesta en defensa es un factor determinante en otorgar resistencia a esta variedad se evaluó por tratamientos previos con fitohormonas en la variedad susceptible si provocaba un cambio en el nivel de susceptibilidad de la planta. Al inocular en plantas de camelias susceptibles con un previo tratamiento con jasmonato de metilo se observó una notable reducción del desarrollo de la enfermedad, lo que llevo a determinar que una respuesta a tiempos tempranos puede ser un factor importante para otorgar resistencia ante un patógeno. Al evaluar la variedad resistente bajo las mismas condiciones con una inoculación por medio de micelio, esta variedad presento susceptibilidad al patógeno, resultado de un retraso en la expresión de genes de resistencia, a diferencia de la infección por medio de ascosporas donde esta variedad de camelia presentó resistencia ante el patógeno. Esto indica que eventos tempranos como la germinación de esporas o el crecimiento primario de hifas son aspectos críticos en la inducción de la respuesta de defensa en las variedades que presentan resistencia (Kondratev *et al.*, 2020).

La defensa asociada al priming inducido por el ácido beta aminobutírico (BABA) también ha sido de interés para su estudio en diversos experimentos, se ha estudiado la respuesta de este sistema de defensa ante *P. infestans* en plantas de papa (Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2015), donde indican que el pretratamiento con este inductor resulto en poca o nula expresión del gen PR1 asociado a la resistencia sistémica adquirida, sin embargo, la infección posterior al tratamiento resulto en una mejora en la acumulación del transcrito del gen PR1 y en un incremento en la resistencia basal a la enfermedad del tizón tardío. También se determinó que este estado inducido podía ser transmitido a la progenie de la planta. En un estudio realizado por F. Jafarbeigi y colaboradores (2020), se evaluó una interacción entre *Bemisia tabaci* y *Solanum lycopersicum* L. y la influencia de ácido salicílico, BABA y *Trichoderma* en la respuesta a este patógeno aplicados individualmente y en combinación en la raíz de la planta, donde se enfatiza el uso de diferentes inductores para la activación de una efectiva defensa de la planta ante los patógenos, siendo las combinaciones con *Trichoderma* las que mostraron mejores resultados en este aspecto (Jafarbeigi *et al.*, 2020).

#### **2.4.3 Efecto de inductores químicos sobre la tolerancia de *Capsicum* a patógenos**

En 2011 Núñez-Pastrana y colaboradores evaluaron el efecto de JA, SA y Etileno sobre chile habanero (*Capsicum chinense*) al tratar previamente a las plantas con concentraciones de estos tres inductores y posteriormente infectar con una cepa virulenta de *Phytophthora capsici*, en dicho estudio evaluaron la aparición de síntomas para cada tratamiento, que consistió en la aspersión de 1 ml de cada inductor en diferentes concentraciones (1, 5 y 10 mM de SA; 10, 100 y 150  $\mu$ M de MeJA y 5 mM de etefón), en este estudio se indicó que para SA y JA ninguno de los tratamientos generaron un efecto protector en las plántulas, al contrario de como ocurrió en el tratamiento con etefón 5 mM, donde el 30% de las plántulas retrasaron la presencia de síntomas, indicando la importancia de la percepción de etileno por parte de la planta para la respuesta de defensa. En el estudio se indicó una correlación entre la supervivencia de las plantas y la acumulación del gen marcador PR1, normalmente asociado a la resistencia sistémica adquirida (SAR) y al SA, sin embargo, mostrando independencia hacia la expresión del gen NPR1, normalmente asociado como mediador de las vías de señalización de estas fitohormonas (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011).

En 2006 Ueeda y colaboradores evaluaron el efecto del ácido jasmónico en la resistencia ante *P. capsici* en la variedad resistente de Chile "criollo de Morelos" *Capsicum annuum* cv. SCM334, se determinó que la variedad resistente a la enfermedad tenía un incremento en los niveles de ácido jasmónico inmediatamente después de infectarse la planta con el patógeno, no obstante, con el tiempo estos niveles de jasmonato disminuyeron, lo que conllevó un incremento en los niveles de SA, induciendo una respuesta hipersensible acompañada de muerte celular en el Chile SCM334. Por otro lado, Baysal y colaboradores (2005) realizaron un tratamiento con Acibenzolar-S-Metilbenzo [1,2,3]tiadiazol-7-carboxílico ácido-S-metil éster (ASM) a plantas de *C. annuum*, el tratamiento con ASM inhibió significativamente la infección con *P. capsici* hasta en un 45 % en la planta. Las plantas de pimiento respondieron a los tratamientos de ASM mediante la inducción de forma rápida pero transitoria del gen relacionado con la defensa como L-fenilalanina amoníaco liasa (PAL). En 2015 Stamler y colaboradores evaluaron el tratamiento de *C. annuum* con BABA previo a la infección, ellos observaron un efecto positivo en las plantas previamente tratadas con respecto a las plantas con la simple infección (Ueeda *et al.*, 2005; Baysal *et al.*, 2005).

### 3. JUSTIFICACIÓN

#### 3.1 Importancia Científica

Desde una perspectiva científica, el estudio de las interacciones planta patógeno permite abordar y conocer mejor diversos mecanismos que se asocian al proceso infectivo por parte del patógeno, y a los diferentes mecanismos de defensa que presenta la planta, estos aspectos son muy diversos y dependen principalmente de las especies que interactúan entre sí, así como los diversos factores a los cuales están asociados, como su entorno. La información que se tiene acerca de interacciones entre patosistemas específicos, principalmente en plantas no modelo, es limitada, cada nuevo estudio permite comprender un poco más los detalles específicos que lo caracterizan, en el caso de la interacción entre *Phytophthora capsici* y *Capsicum spp.* no hay muchos estudios que aborden a detalle las características específicas de la interacción, y siendo *P. capsici* uno de los principales causantes de pérdida de chile a nivel mundial, se considera importante su estudio y evaluar qué aspectos están asociados a la severidad que se produce en esta enfermedad. Puesto que este conocimiento conlleva el poder evaluar técnicas para el mejoramiento en el manejo de estos cultivos.

#### 3.2 Importancia Tecnológica

En términos tecnológicos, es importante considerar el desarrollo de nuevas técnicas y estrategias de cultivo, basadas en el conocimiento que se obtiene del estudio de interacciones entre agentes patógenos de alta severidad como es *P. capsici*, con cultivos de importancia económica, como es el chile. Las estrategias actuales del manejo de cultivos para combatir la enfermedad de la marchitez del chile causada por *P. capsici* no suelen ser procedimientos efectivos, debido a las características del patógeno, es complicada su eliminación por completo sin comprometer la integridad del cultivo, es por ello que evaluar alternativas, como el estudio de los mecanismos de defensa propios de la planta que tratan de contrarrestar los efectos de la infección cobra importancia, al entender mejor estos mecanismos se permite desarrollar estrategias que permitan potenciar y mejorar el desarrollo de estos cultivos ante diversas amenazas.

### **3.3 Importancia para el desarrollo nacional y mundial**

Los cultivos de chile en México son altamente importantes en diversos ámbitos, tales como el económico, social, cultural, entre otros. Nuestro país suele ser frecuentemente asociado al consumo elevado de diversos tipos de chile, que conforman parte importante de la gastronomía y por ende de la dieta de los mexicanos. Además, conlleva un factor cultural importante debido a la alta diversidad de cultivos de chile de diferentes especies que se producen en el país, lo cual a su vez influye en la importancia a nivel económico que se genera debido a que algunas de estas especies provienen principalmente de ser cultivadas en la región.

De acuerdo con la FAO, el chile es a nivel mundial el quinto producto hortícola por superficie cultivada, el interés se centra en diversos ámbitos, no solo a nivel económico o gastronómico, también tiene utilidad como fuente de colorantes naturales, efectos analgésicos y antioxidantes (Ruiz Lau *et al.*, 2011).

#### **3.3.1 Pertinencia Económica**

Debido a la importancia económica que conlleva el cultivo de chile en el país, es importante el estudio de los diversos factores que pueden provocar pérdidas importantes en la producción de estos cultivos, lo cual a su vez conllevaría que se den pérdidas económicas como consecuencia. Factores tales como enfermedades que pueden llegar a generar pérdidas totales de los cultivos, como el caso de la enfermedad de la marchitez del chile, que además de ser muy dañina, también suele afectar rápidamente a los cultivos y es difícil de erradicar una vez llegada a los cultivos. Por ejemplo, en Yucatán el cultivo de chile habanero es de gran importancia, ocupando el segundo lugar en cuanto a superficie cultivada, solo superada por el tomate (Ruiz Lau *et al.*, 2011).

Yucatán es junto a Campeche y Quintana Roo uno de los estados productores de chile, con rendimientos que varían entre 10 a 40 toneladas de chile por hectárea, es uno de los productos más rentables en el mercado nacional y de exportación, tanto por su consumo en fresco, como por su industrialización para exportación a países como Estados Unidos y Canadá (Macías Rodríguez *et al.*, 2013).

### **3.3.2 Pertinencia Ambiental**

Los agentes patógenos de cultivos producen pérdidas en grandes cantidades de estos, y suelen ser complicadas de manejar, pudiendo afectar el equilibrio del ecosistema en el cual se desarrollan dichos cultivos. La enfermedad de marchitez del chile es la principal causa de pérdida de cultivos de chile en el mundo, considerado un factor ambiental importante que afecta negativamente el desarrollo de estos cultivos, por esta razón es importante evaluar su interacción, con la finalidad de desarrollar estrategias que impidan que se generen altas pérdidas en las diferentes especies de chile que se producen.

### **3.3.3 Pertinencia Social**

La producción de chile tiene un alto valor sociocultural en el país, su uso suele estar asociado a la gastronomía frecuentemente, y, debido a la gran variedad de especies de chile que se encuentran en el país, se adjudica a México como una de las regiones de mayor importancia en este ámbito. El estudio de cómo algunos efectores pueden afectar el desarrollo de la enfermedad de la marchitez del chile es importante en este aspecto, principalmente por que ataca diversas especies de chile de manera muy severa, y dentro de las variedades conocidas, solo se tiene registro de una variedad, procedente del país, que presenta tolerancia a dicha enfermedad, la cual se considera una variedad de chile muy importante para el estudio de esta enfermedad.

Uno de los aspectos más importantes a tomar en cuenta es el ámbito de seguridad alimentaria, que contempla cuatro aspectos importantes respecto a la disponibilidad de alimentos, el acceso, su uso y la estabilidad de la oferta de estos, en México existen las dos formas más claras de malnutrición, la obesidad y la desnutrición. El país contempla en 2014 una disponibilidad energética de las más elevadas en el mundo, cuantificada en 3,145 kilocalorías por persona al día. En lo que respecta a la desnutrición, más del 18% del país se encuentra en pobreza alimentaria. Esta pobreza e inseguridad alimentaria está marcada por diversos factores, dentro de los cuales se encuentra una producción que no puede abastecer al total de la población, de igual forma el acceso a los alimentos no está a disponibilidad de todos, debido a carencias económicas (Urquía-Fernández Robles, 2013).

#### 4. HIPOTESIS

Si las vías de SA y MeJA/ET están involucradas en el establecimiento de respuesta defensa durante la interacción compatible de *Capsicum spp.* - *P. capsici* un patógeno hemibiotrófico, entonces la inducción previa de estas vías y la aplicación exógena de un inductor de la memoria celular como es BABA afectarán el nivel de tolerancia de *Capsicum spp.* a este patógeno, así como la expresión de los genes relacionados con la regulación de defensa.

## 5. OBJETIVOS

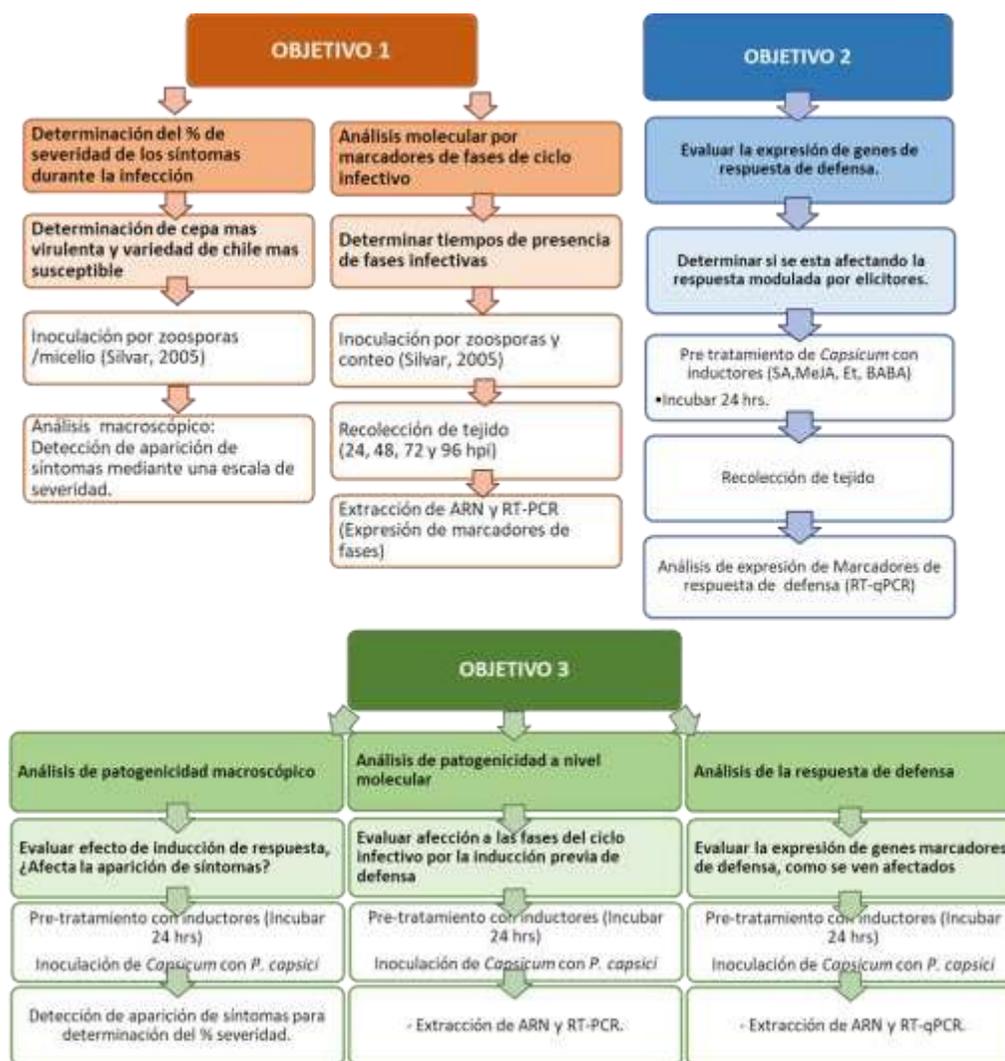
### 5.1 Objetivo general

Analizar los niveles de tolerancia conferidos por inductores químicos relacionados con la defensa en *Capsicum spp.* a nivel macroscópico y de la expresión de genes durante la interacción con el patógeno *Phytophthora capsici*.

### 5.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar el grado de virulencia del patógeno *P. capsici* sobre *Capsicum spp.*
- 2) Evaluar la concentración y el efecto de los inductores químicos sobre los marcadores de defensa de *Capsicum spp.*
- 3) Evaluar el efecto de los inductores químicos sobre la fase de infección a nivel macroscópico y molecular.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura 1.** Estrategia metodológica.

### 6.1 Obtención de material biológico (aplica en todos los objetivos)

En el grupo de trabajo se cuenta con varias accesiones de *Capsicum spp.*, las de *C. chinense* Chiapas y *C. chinense* Mayan Ba'alche pertenecen a un banco de germoplasma (CPV-279, otorgada por la Dra. Sylvia Fernández-Pavía, Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo), por otro lado *C. annum* variedad jalapeño y ancho son provenientes de semillas comerciales. Adicionalmente se cuenta con dos cepas resguardadas de *Phytophthora capsici*, aislados de tejido infectado de *Capsicum*, uno del estado de Oaxaca y otro del estado de Veracruz.

### **6.1.1 Obtención de plántulas *in vitro***

Semillas de 4 variedades de *Capsicum* se sometieron a un proceso de asepsia de la siguiente forma: en un tubo falcón de 50 ml con aproximadamente 25 semillas por tubo se adicionaron 50 ml de etanol al 70% y se realizó una ligera agitación por 5 min, se decantó el sobrenadante con ayuda de un colador. Se adicionaron 50 ml de agua destilada estéril, para lavar y eliminar resto de alcohol, se agitó ligeramente por 5 min y se decantó (este proceso se repitió dos veces). Posteriormente se adicionaron 50 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 30% y se agitó por 40 min, finalizado este período de tiempo se decantó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con 50 ml de agua destilada estéril, agitando por 5 min y decantando entre cada lavado. Las semillas se incubaron por 24 h en 50 mg/ml de cefotaxima y posteriormente las semillas se colocaron en cajas con algodón estéril húmedo, y fueron puestas en oscuridad para su germinación.

Las semillas germinadas fueron transferidas a cajas magentas con medio Murashige Skoog salts (sigma) (4.4 g/L, tiamina 40 mg/L, mio-inositol 100 mg/L, L-cisteína 25 mg/L, sacarosa 30 g/L y gel rite 2.2 g/L, antes de adicionar el Gelrite a la solución, se ajustó el pH a 5.6) para su desarrollo en condiciones de cámara de crecimiento a 25 °C en foto periodo de 18 horas de luz intensa y el resto en oscuridad. Se dejó desarrollar por aproximadamente un mes.

### **6.1.2 Preparación del patógeno**

#### **6.1.2.1 Zoosporas**

Una cepa de *P. capsici* de 7 días en medio PDA fue resembrada en medio V8 incubando por 7 días, pasados los 7 días se procedió a inundar el medio con 15 ml de agua destilada estéril y se dejó incubar en oscuridad por 72 hrs, pasadas las 72 hrs se indujo la liberación de zoosporas por choque térmico, incubando el patógeno inundado a 4°C por una hora, posteriormente se procedió a incubar por 30- 60 minutos a temperatura ambiente (25°C). Se realizó el conteo de zoosporas en cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio (Microscopio compuesto Motic Serie B1) a 40X.

### 6.1.2.2 Micelio

Para la obtención de discos de micelio para el análisis de infección, se resembró el patógeno en una placa con PDA, la cual se realizó con un disco de un diámetro de 1.8 cm de PDA proveniente de una placa de 4 semanas de desarrollo del patógeno. Pasados 6 días de desarrollo del patógeno resembrado se tomó discos de 0.4 cm de diámetro como inóculo para los análisis de infección de las plantas de 4 semanas de *Capsicum spp.*

## 6.2 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 1

### 6.2.1 Análisis de patogenicidad con escala de severidad

Plántulas de 4 semanas de desarrollo de *Capsicum spp.* fueron inoculadas con 10 µl de zoosporas o con un disco de micelio para el análisis a nivel macroscópico, se determinó la aparición de síntoma de un grupo de plantas en una cronología de tiempo basados en una escala de severidad. La escala de la enfermedad fue basada en lo reportado por Barbosa y Bosland (2010) con modificaciones menores en las que 0= Sin síntomas de la enfermedad, 1= Empapados en agua, 2= El área en contacto con el patógeno estaba necrosada, 3= Las hojas inoculadas estaban necrosadas, 4= El tallo de las plantas estaba necrosado y el micelio estaba creciendo, 5= hojas sistémicas necrosadas. Se documentó por fotografía los síntomas representativos en los tiempos de 24, 48 y 72 horas después de la inoculación (hpi). En paralelo se determinó el % de severidad del grupo analizado mediante la fórmula:

Porcentaje del índice de la enfermedad = (el grado numérico de la enfermedad X número de plantas enfermas de ese grado) / (el grado más alto de la enfermedad x el número total de sobrevivientes) X 100.

Se determinó por aparición de síntomas, tanto por tiempo y severidad, la variedad de *Capsicum* más susceptible a la infección.

Para la obtención de ADN genómico se maceraron muestras de micelio incubadas por 5 días en caldo V8 en oscuridad, cortando aproximadamente 500 mg de tejido y distribuyéndolo en tubos eppendorf, la maceración se realizó añadiendo 800 µl de buffer de lisis y lisando con ayuda de un pistilo de plástico hasta que quedó una mezcla pastosa. Se centrifugó por 5 minutos a 12000

rpm a temperatura ambiente. Se recolectaron 500  $\mu$ l de la fase acuosa y se añadieron 300  $\mu$ l de buffer de lisis. Posteriormente se añadieron 16  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y 16  $\mu$ l de proteinasa k. Se incubó a 55°C por 1 hora a 500 rpm en un Thermoblock. Posteriormente se adicionaron 600  $\mu$ l de mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos y se recolectaron 400  $\mu$ l de sobrenadante, posteriormente se dejó incubando por 24 hrs en congelador con isopropanol frío para precipitación. Una vez pasadas las 24 hrs se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 1 ml de etanol frío, centrifugando a 12000 rpm por 10 minutos entre cada lavado. Se eliminó el excedente de etanol incubando por 10 minutos en Thermoblock a 55°C sin agitación, una vez eliminado el excedente se resuspendió la muestra en 40  $\mu$ l de agua grado biología molecular. Una vez obtenido el ADN genómico se determinó su calidad e integridad, por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% y por cuantificación en Nanodrop.

Se evaluó el funcionamiento de los primers por medio de un PCR punto final para evaluar los productos de la reacción. El PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segs, 57°C por 30 segs y 72°C por 2.5 min, seguido de 10 minutos a 72°C. Mezclando las proporciones como se muestra en Tabla 1.

**Tabla 1.** Proporciones de mezcla de reacción para PCR punto final, volumen de 25 microlitros.

<b>Material</b>	<b>1X</b>
Primer Fw	0.62 $\mu$ l
Primer Rv	0.62 $\mu$ l
Muestra	0.5 $\mu$ l
dNTPs	0.5 $\mu$ l
Buffer 5X	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O grado Biología Molecular	17.635 $\mu$ l
<i>Taq</i> polimerasa	0.125 $\mu$ l

### 6.2.2 Detección de los genes de fase infectiva por RT-PCR

Plántulas de 4 semanas de desarrollo fueron inoculadas con el patógeno *P. capsici*. Se tomó tejido infectado a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación. La extracción de ARN de tejido vegetal se llevó a cabo macerando aproximadamente 300 mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido y recolectando en tubos eppendorf de 5 ml, se adiciono volumen apropiado de PureZOL (Peso/volumen) y se homogenizo. Se prosiguió a la extracción del ARN total, para ello se empleó el paquete de extracción "Direct-Zol RNA miniprep plus" de la casa comercial Zymo Research. La muestra posteriormente fue cuantificada en Nanodrop y visualizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, preparando Buffer TBE 2X con agua DEPC, para evaluar la integridad y calidad del ARN.

La síntesis de primera cadena se llevó a cabo con el kit de Maxima First Strand cDNA Synthesis de la casa comercial Thermo Scientific, para ello se empleó como templado 5 µg de ARN, el cual fue sometido al siguiente procedimiento indicado por el fabricante, omitiendo la reacción con DNAsas. El templado de 5 µg se mezcló con agua grado biología molecular para un volumen de 14 µl, al cual se le añadió 6 µl de 5x buffer reaction mix y 2 µl de Maxima Enzyme Mix, homogenizando, una vez realizada la mezcla se realizaron una serie de incubaciones, primero a 25 °C 10 minutos, posteriormente a 50°C por 30 minutos y por último a 85°C por 5 minutos. Obteniendo un volumen total de 20 µl de cDNA. Para la detección de los genes de fase infectiva del patógeno se realizó un PCR empleando las instrucciones del fabricante de la GoTaq Polimerasa de la casa comercial PROMEGA., los primers empleados se presentan en la Tabla 2:

**Tabla 2.** Primers asociados a diferentes fases del ciclo infectivo de *P. capsici*.

Gen	Asociado a	Tamaño (Pb)
PcTubulina / Jupe <i>et al.</i> 2013	Detección de patógeno	
PcHmp1 / Jupe <i>et al.</i> 2013	Fase biotrófica	950
PcNPP1 / Jupe <i>et al.</i> 2013	Interfase	350
PcCDC14 / Jupe <i>et al.</i> 2013	Fase necrotrófica	490

## 6.3 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 2

### 6.3.1 Tratamiento químico con inductores

Las moléculas inductoras ácidos salicílico (SA), etileno (ET), jasmonato de metilo (MeJA) y el inductor de la memoria celular BABA se adquirieron de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.). Las concentraciones que se utilizaron para las moléculas inductoras se eligieron de acuerdo con las concentraciones reportadas en diversas literaturas (Park *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Ghoohestani *et al.*, 2012; Mandal *et al.*, 2013; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2015; Wiesel *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Venegas-Molina *et al.*, 2020).

Plántulas de *Capsicum* con 4 semanas de desarrollo fueron tratadas por aspersión en la superficie de las hojas con 2 mililitros de la solución de la molécula inductora. Para el análisis se manejaron dos grupos por cada tratamiento, un grupo control el cual consistió en plantas asperjadas con la solución disolvente de la molécula inductora; el segundo grupo consistió en plántulas asperjadas con la solución de la molécula inductora a la concentración de análisis (salicilato de sodio (SA) a 1, 2.5 y 5 mM, Etefón a una concentración de 0.1, 1 y 2.5 mM, metil jasmonato (MeJA) a 150  $\mu$ M, y BABA a 2 concentraciones, 2.5 y 5 mM). Cada grupo fue representado por 10 plantas. Después de la inducción las cajas magentas se taparon de forma hermética por 24 horas. Se realizó la colecta de tejido vegetal a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento para la extracción de los ácidos nucleicos.

### 6.3.2 Extracción de ARN total de tejido vegetal

Como primera estrategia para la extracción de ARN total se empleó el PureZOL de la casa comercial BIO-RAD. Se maceró 500 mg de tejido vegetal con ayuda de nitrógeno líquido, se le adicionó 1 ml de PureZOL y se incubó por 5 minutos a temperatura del cuarto. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a colocar 0.3 ml de cloroformo, se incubó por 5 minutos y se centrifugó a 12,000 g X 15 minutos a 4° C. En un tubo de 1.5 ml se recuperó la fase líquida y se le adicionó 375  $\mu$ l de isopropanol y 375 de una mezcla de sales (citrato de sodio/cloruro de sodio), se incubó toda la noche a -20° C. Posterior a la incubación se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos se decanta la fase líquida y la pastilla resultante se lavó por dos ocasiones con etanol al 70 %. La pastilla se re suspendió con 20  $\mu$ l de agua grado biología molecular. Para visualizar la

integridad se visualizaron en gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio el cual corrió por ~25 minutos a 95 V.

Modificaciones en el método extracción de ARN total consistieron principalmente en que obtenida la fase líquida posterior a la adición de 0.3 ml de cloroformo, se procedió continuar la extracción como indica el protocolo de extracción del kit Zymo Research (R2072) usando la fase líquida como muestra.

### 6.3.3 Cuantificación de marcadores de defensa por RT-qPCR

La síntesis de primera cadena se llevó a cabo con el kit de Maxima First Strand cDNA Synthesis de la casa comercial Thermo Scientific, para ello se empleó como templado 5 µg de ARN, al cual fue tratado con dsDNAsas y posteriormente se realizó la síntesis siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo con el kit Universal SYBR Green Supermix de la casa comercial BIO-RAD, para ello se empleó como templado 100 ng de ADNc, para la mezcla de reacción se emplearon las instrucciones del fabricante. Los primers empleados como marcadores de los mecanismos de defensa en planta se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Primers marcadores de defensa en planta para RT-qPCR.

Gen de interés/autor	Nombre del Oligo	Tamaño de producto
CaNPR1/ Núñez-Pastrana <i>et al.</i> 2011	CaNPR1-F	260
	CaNPR1-R	
CaLox2/ Nieto-Garibay <i>et al.</i> 2022	CaLox2-F	137
	CaLox2-R	
CaETR1/ Nieto-Garibay <i>et al.</i> 2022	CaETR1-F	127
	CaETR1-R	
PR1A / Liu <i>et al.</i> 2017	CaPR1A-F	108
	CaPR1A-R	
PR1B/ Hong <i>et al.</i> 2005	CaJAR1-F	100
	CaJAR1-R	

PDF1.2B / Hong <i>et al.</i> , 2005	PDF1.2B-F	100
	PDF1.2B-R	
CaAP2/ERF064 / Jin <i>et al.</i> , 2005	CaAP2/ERF064-F	300
	CaAP2/ERF064-R	
CaSAR82 / Zhang <i>et al.</i> , 2005	CaSAR82-F	980
	CaSAR82-R	
CaPR1/ Núñez-Pastrana <i>et al.</i> 2011	A-PR1-F (básica)	108
	A-PR1-R	
	B-PR1-F (básica)	459
	B-PR1-R	
	PR1-F	
	PR1-R	
CaPDF1/ Jin <i>et al.</i> 2016	A-PDF1.2-F	261
	A-PDF1.2-R	
	B-PDF1.2-F	100
	B-PDF1.2-R	
	PDF1.2-F	
	PDF1.2-R	
PR4/ Kang <i>et al.</i> , 2017	PR4-F	100
	PR4-R	
CaMYB72/ Nieto-Garibay <i>et al.</i> 2022	CaUBI-3-F	204
	CaUBI-3-R	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-GapCp (GAPDH) / Wan <i>et al.</i> , 2011	CaGAPDH-F	276
	CaGAPDH-R	

## 6.4 Material y métodos para cubrir el objetivo particular 3

### 6.4.1 Infección de las plantas de Chile previamente tratadas con inductores químicos para análisis macroscópico y molecular

Para el análisis del efecto en el ciclo de infección de cada molécula inductora se diseñó la estrategia experimental basada en información de reportes previos (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2016, Meyer *et al.*, 2018). La metodología de tratamiento con las moléculas inductoras fue realizada como se planteó en el objetivo II; el análisis de los síntomas que se presentaron durante el ciclo infectivo fue realizado como se planteó en materiales y métodos del Objetivo 1. Para el análisis del efecto de la molécula inductora en el ciclo infectivo de *P. capsici* en *Capsicum spp.* se desarrollaron 2 estrategias.

Para cada estrategia se manejó dos grupos de análisis llevadas en paralelos; a) grupo de plantas para el análisis macroscópico b) grupo de plantas para la colecta de tejido para del análisis de genes. Cada estrategia consistía en poblaciones de al menos 10 plantas por tratamiento.

En la primera estrategia, plantas de 4 semanas de desarrollo se trataron con 2 ml de una solución de concentración analizada de la correspondiente molécula inductora, la caja magenta se cerró herméticamente, 24 horas posterior al tratamiento se procedió a la inocular con *P. capsici* (grupo a y b en paralelo). Para el grupo a los síntomas de la enfermedad fueron registrados periódicamente a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 hpi, se realizó el registro de la severidad de la enfermedad en base al índice de la enfermedad. Se realizó una correlación de la presencia de síntomas entre plantas con la simple infección con el agente patógeno y las plantas con el tratamiento con moléculas inductoras para determinar el efecto en la tolerancia al agente patógeno por parte del tratamiento. Para el grupo b se verificó los síntomas y se prosiguió a colectar tejido vegetal en los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 hpi; para este grupo se contó con los correspondientes controles que consistió en: 1) plantas tratadas con el disolvente de la molécula inductora; 2) plantas tratadas con la molécula inductora; 3) plantas con la infección simple.

En la segunda estrategia plantas de 4 semanas de desarrollo se trataron con 2 ml de una solución de concentración analizada de la correspondiente molécula inductora, la caja magenta

se cerró herméticamente, 72 horas posterior al tratamiento se procedió a la inocular con *P. capsici* (grupo a y b en paralelo). La estrategia experimental que se siguió fue igual a la primera estrategia.

Para los inductores como Etefón y Salicílico solo se manejó la primera estrategia.

#### **6.4.2 Análisis a nivel macroscópico**

Los síntomas de la enfermedad fueron registrados periódicamente a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 hpi, se realizó el registro de la severidad de la enfermedad en base al índice de la enfermedad realizada en el objetivo I para determinar la tolerancia al agente patógeno.

#### **6.4.3 Análisis de marcadores de defensa y de fases infectivas por RT-PCR en plantas afectadas en su nivel de tolerancia a *P. capsici***

Se extrajo ARN total de plantas cuyo tratamiento con el inductor químico afecto su nivel de tolerancia ante el agente patógeno, se colecto el tejido infectado (Tejido local) a las 24, 48 y 72 hpi, por cada tiempo se colectaron 5 plantas para hacer un pool. 5 µg del ARN total fueron empleados para la síntesis de ADNc, empleando el Kit de "Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit For RT-qPCR with dsDNase" para el PCR tiempo real se emplearon 100 nanogramos de ADNc como templado, se empleó el kit "iTaQ Universal SYBR Green Supermix" de BIO-RAD.

Se realizó el análisis de los perfiles de expresión de los genes marcadores de fases infectivas y de genes que codifican efectores del patógeno durante el ciclo infectivo del grupo de plantas cuyo tratamiento con el inductor afecto su grado de tolerancia al agente patógeno. Se dividieron en, grupo 1) plantas asperjadas con la solución diluyente del inductor + *P. capsici*, grupo 2) plantas asperjadas con el inductor químico + *P. capsici*. Información sobre estos marcadores se encuentran en las Tabla 2 y Tabla 4.

**Tabla 4.** Primers de marcadores de efectores de infección por *P. capsici*.

<b>Gen</b>	<b>Asociado a</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
NLP 107869 / Chen <i>et al.</i> , 2018	Efectores apoplásticos	433
NLPS 121494 / Chen <i>et al.</i> , 2018	Efectores apoplásticos	3323
NLPS 11951 / Chen <i>et al.</i> , 2018	Efectores apoplásticos	217
NLPS122048 / Chen <i>et al.</i> , 2018	Efectores apoplásticos	296
RLX45 / Li <i>et al.</i> , 2019	Efectores citoplasmáticos	220
RXL25 / Liang <i>et al.</i> , 2021	Efectores citoplasmáticos	180
RXL3A / Fan <i>et al.</i> , 2018	Efectores citoplasmáticos	250

#### 6.4.4 Análisis estadístico

Una vez obtenidos los datos, estos se analizaron estadísticamente por medio del método Delta-Delta CT y por ANOVA simple en el programa Graphpad Prism (Version 8.0.1.).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Determinación del grado de virulencia de *P. capsici* sobre *Capsicum spp.*

Para este estudio usamos el término 'patogenicidad' a la capacidad del patógeno para causar enfermedad en un hospedero particular, el término "virulencia" como el grado de daño causado al hospedero, finalmente "tolerancia" al rasgo que no limitan o previenen la infección, sino reducir sus consecuencias para la salud del hospedero (Barrett *et al.*, 2009; Sacristán *et al.*, 2021). Obtuvimos datos cuantitativos de las interacciones entre 4 hospederos (4 variedades de *Capsicum spp.*) y 2 cepas del agente patógeno (aislados Oaxaca y Veracruz). Para el análisis de virulencia el punto de partida fue la estandarización del protocolo de inoculación, donde los procesos de inoculación por zoosporas y por discos de micelio mostraron diferencias importantes, principalmente en la capacidad de incidir la enfermedad en las variedades de chile evaluadas.

#### 7.1.1 Análisis de virulencia a nivel macroscópico con inóculo Zoosporas *P. capsici*

En el presente estudio se trabajó con semillas de *C. chinense* provenientes de un banco de germoplasma (Mayan Ba'alche) y otra obtenida de colectas realizadas por campesinos (Chiapas), se observó que ambas variedades presentaron una baja tasa de germinación, en cuanto al desarrollo las plantas de 4 semanas posteriores a la germinación, fenotipos diferentes entre los lotes de semillas germinadas se observó plántulas con una mayor talla y otras resultaron con tallos cortos y hojas pequeñas. Ante esto seleccionamos un grupo que representó el fenotipo de mayor desarrollo de plántulas y otro con las características de plantas de menor talla para el análisis de virulencia de ambas cepas del patógeno. En cuanto a la obtención del inóculo por el proceso de inundación y choque térmico se observó que con la cepa de *P. capsici* de Oaxaca la concentración fue de 122,500 – 165,000 zoosporas/ml; En el caso de la cepa de *P. capsici* aislada de Veracruz, un inóculo de una concentración de 165,000 zoosporas/ml fue obtenido.

Como punto de partida evaluamos si el fenotipo afecta la virulencia, para ello empleamos 10 µl de suspensión de zoosporas de *P. capsici* como inóculo, se infectó las variedades de *C. chinense*

de Chiapas y Mayan Ba'alche agrupadas como las del fenotipo de menor talla en la segunda hoja verdadera. Con el inoculo de zoosporas de la cepa aislada de Oaxaca, las plantas de la variedad de Chiapas presentaron los primeros síntomas en las primeras 24 hpi (aspecto acuoso en la hoja de la inoculación), los síntomas a las 48 hpi incluían una pérdida de turgencia en hoja, decoloración del área localizada de la infección, para las 72 hpi se presentó necrosis en hoja y el daño se presentó en hojas adyacentes. En la variedad de *C. chinense* de Mayan Ba'alche los síntomas iniciales se observaron similares en los tiempos tempranos, sin embargo, fue a las 96 hpi donde se observó la necrosis (coloración café oscuro intenso) en hoja adyacente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Progreso de síntomas a 24, 48, y 72 hpi. Infección con zoosporas de *P. capsici* Oaxaca en *C. chinense* variedad Chiapas y variedad Mayan Ba'alche, progreso de los síntomas en diferentes fenotipos.

<i>P. capsici</i>	0 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
<b>Oaxaca</b>				
<b>1.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P. capsici</i> (1)</b>				
<b>2.- <i>C. chinense</i> Mayan Ba'alche + <i>P. capsici</i></b>				
<b>3.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P. capsici</i> (2)</b>				
<b>4.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P. capsici</i> (3)</b>				

Ante estos resultados se determinó que la variedad Chiapas con fenotipo de menor talla presentó mayor susceptibilidad a la cepa de Oaxaca. En el análisis de virulencia de la cepa de Veracruz se tomó la variedad de Chiapas como hospedero, los síntomas se presentaron a partir de las 24 horas sin embargo afectó en menor medida a las plantas, la necrosis se observó con una leve coloración café (Tabla 6). Ante estos resultados se determinó que la cepa con mayor virulencia es el aislado de Oaxaca.

Para concluir este análisis se evaluó el efecto de la concentración de zoosporas de la cepa más virulenta con un fenotipo de mayor desarrollo de ambas variedades de hospedero. Se inocularon las plantas con 10  $\mu$ l de zoosporas a una concentración de 165,000 zoosporas/ml y se evaluó el desarrollo de síntomas. Se observó que pasadas las primeras 72 horas no hubo presencia de síntomas a nivel macroscópico en ninguna planta de las dos variedades. Ante estos resultados se realizó una reinoculación con la finalidad de evaluar los efectos de la cepa Oaxaca sobre la planta, esta se realizó 14 días después de la inoculación inicial.

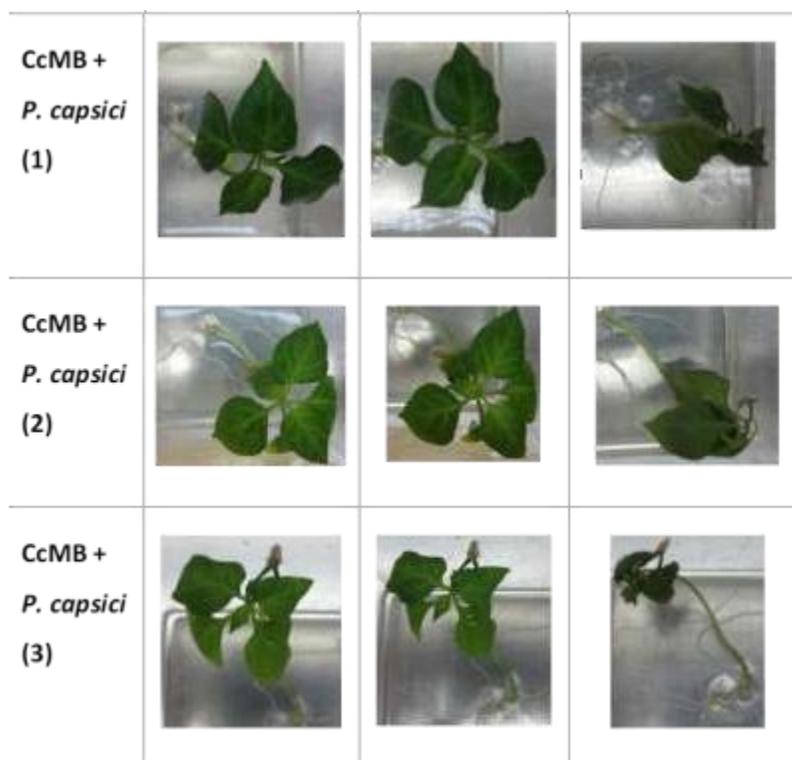
Para la reinoculación se aumentó la concentración del inóculo, empleando para ello un volumen entre 15 y 20  $\mu$ l de una suspensión de (565,000 zoosporas/ml), adicionalmente se inocularon dos diferentes hojas de cada planta. Se observó que a las 96 horas posteriores a la segunda infección en las plantas presentaron síntomas severos en todas las plantas inoculadas. Los síntomas presentes fueron necrosis en hoja y tallo, crecimiento de micelio en la superficie de las hojas y del medio de cultivo, pérdida de turgencia y en dos casos se presentó abscisión de hojas (Tabla 7).

**Tabla 6.** Progreso de síntomas a 24, 48, y 72 hpi. Infección con zoosporas de *P. capsici* Veracruz en *C. chinense* variedad Chiapas, progreso de síntomas en diferentes fenotipos.

<i>P. capsici</i> Veracruz	0 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi
1.- Control				
2.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P.</i> <i>capsici</i> (1)				
3.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P.</i> <i>capsici</i> (2)				
4.- <i>C. chinense</i> Chiapas + <i>P.</i> <i>capsici</i> (3)				

**Tabla 7.** Efecto de inoculación con zoosporas en plantas (10  $\mu$ l) 0 y 72 hpi sin síntomas. Efecto de la reinoculación con zoosporas a 96 hpi (15 y 20  $\mu$ l), para las variedades de Chiapas (CcC) y Mayan Ba'alche (CcMB).

	Inoculación 10 $\mu$ l		Reinoculación, 15 & 20 $\mu$ l
	0 hpi	72 hpi	96 hpi
<i>Capsicum</i> <i>spp.</i>			
Control (CcC)			
CcC + <i>P.</i> <i>capsici</i> (1)			
CcC + <i>P.</i> <i>capsici</i> (2)			
CcC + <i>P.</i> <i>capsici</i> (3)			
Control (CcMB)			



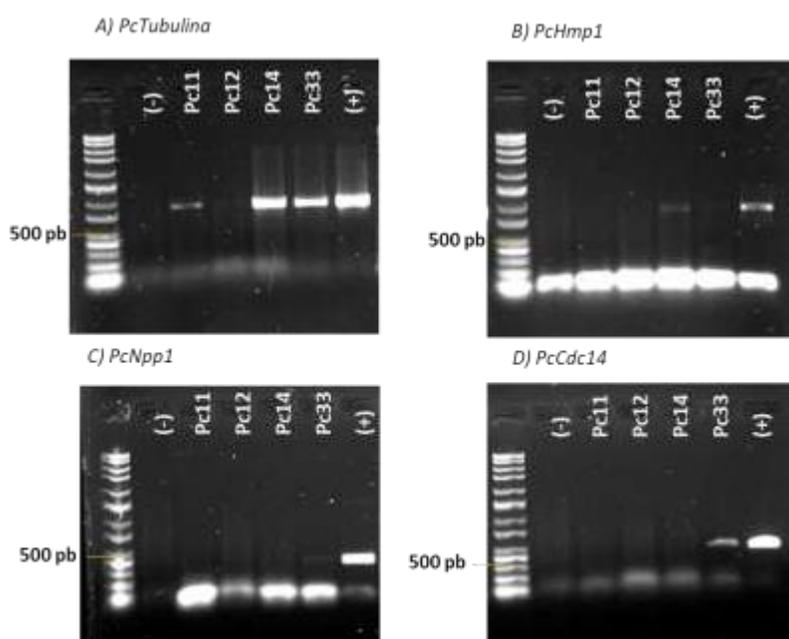
Cabe mencionar que los síntomas fueron más evidentes en la variedad de Chiapas, donde se presentaron dos casos de abscisión de hojas y una mayor cantidad de crecimiento de micelio en la superficie de tejidos, estos resultados fueron consistentes con las primeras inoculaciones realizadas con los fenotipos de menor talla en donde la variedad Chiapas resulto más susceptible. Se determinó que, para el caso de plantas de mayor desarrollo, es más adecuado utilizar volúmenes mayores de inoculo y cuidar los tiempos de desarrollo tanto de las cepas como de los cultivos.

En un nuevo evento de infección con zoosporas, se observó que entre el grupo de plantas de *C. chinense* variedad Chiapas inoculadas con *P. capsici* Oaxaca el fenotipo de la enfermedad fue variado a las 72 hpi. Se presentaron 3 diferentes grupos de plantas de acuerdo con el daño observado, desde el grupo control (0); un grupo inoculado, pero sin síntomas aparentes (1), un grupo con síntomas en la hoja localizada (2) y un grupo de plantas con síntomas severos en toda la planta (presencia de micelio en la planta, necrosis y oscurecimiento de tejidos) (3) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Síntomas a la 72 hpi en *Capsicum chinense* inoculado con *P. capsici* Oaxaca por método de inoculación con zoosporas (Grupo 0 =Control; Grupo 1 = Sin síntomas aparentes; Grupo 2 = síntomas en Hoja localizada; Grupo 3 = Síntomas Severos) de cada grupo se presentaron al menos 2 plantas con síntomas similares.

Muestra	0 hpi	72 hpi	Muestra	0 hpi	72 hpi
Pc (0) 1			Pc (2) 2		
Pc (0) 2			Pc (2) 3		
Pc (1) 1			Pc (3) 1		
Pc (1) 2			Pc (3) 2		
Pc (1) 3			Pc (3) 3		

Para corroborar que estos fenotipos de la enfermedad corresponden a diferente fase del ciclo infectivo de *P. capsici* se colectó tejido infectado y se realizó el análisis de los genes relacionados con las fases infectivas. Previo a este análisis los oligonucleótidos fueron validados para las cepas de este estudio (véase la sección de Anexos 11.2). Como resultados se observó que el gen *tubulina* de *P. capsici* no está presente en todos los tejidos inoculados con zoosporas. Adicionalmente se observó que la presencia del gen *PcHmp1* fue ausente en las plantas sin síntomas aparentes (1); en plántulas que presentaron síntomas en la hoja inoculada a las 72 hpi (2) fue posible detectar una banda que representa la presencia de este gen; por otro lado, en las plántulas que presentaron síntomas severos en los tejidos sistémicos (3), se observó una ausencia del gen *PcHmp1*, una débil presencia del gen *PcNPP1* y una marcada presencia del gen *PcCDC14* (Fig. 2).



**Figura 2.** Análisis de marcadores de fase infectiva 72hpi. 3 microlitros de producto de RT-PCR. A) Gen marcador constitutivo de tubulina (950 pb) de *P. capsici*. B) Gen marcador *PcHmp1*(950 pb). C) Gen marcador *PcNPP1*(350 pb). D) Gen marcador *PcCDC14* (490 pb). Carril 1.- Marcador de 1 Kb de la casa comercial sigma. Carril 2.- Control negativo, planta sin inocular, Carril 3-5.- Muestras sin síntomas aparentes (grupo 1, plantas 1, 2 y 4), Carril 6.- Muestra con síntomas severos (Grupo 3 planta 3), Carril 7.- Control positivo (extracto de ADN genómico de *P. capsici*).

Este análisis nos corrobora que la inoculación con zoosporas no está siendo reproducible en nuestras condiciones de laboratorio, ya que observamos síntomas de las diversas fases de la escala de severidad en un tiempo tardío de la infección (72hpi). El método de inoculación por zoosporas es afectado por varios factores, haciendo complicado analizar una población de *Capsicum spp.* para determinar su estado de tolerancia o susceptibilidad ante el agente patógeno.

Con estos resultados podemos observar una correlación entre la presencia de síntomas y la detección de los correspondientes genes de fase infectiva de *P. capsici*, sin embargo, no permiten marcar el tiempo en que estas fases se presentan en la población inoculada con zoosporas debido a que los síntomas se presentan de forma variable. Por lo cual se tomó la decisión de emplear otro método de inoculación que elimine los falsos positivos en el análisis. Basados en las referencias se decidió emplear para los análisis posteriores inoculación con micelio crecido en placa de PDA.

#### **7.1.2 Análisis de tolerancia de *Capsicum spp.* a *P. capsici* aislado Oaxaca con escala de severidad (Inoculo micelio)**

Previo a este análisis se determinó el porcentaje de germinación y desarrollo de las plantas de las variedades de *C. annuum* (Jalapeño y Ancho), como resultados se obtuvo que estas semillas presentaron un 75% de germinación, a las 4 semanas se observó un desarrollo homogéneo de las plantas con un fenotipo de gran talla característico de este género en un buen número para análisis de tolerancia.

Para el análisis macroscópico de los síntomas, se realizó la inoculación con un disco de micelio de *P. capsici* a plantas (habanero, Jalapeño y Ancho) de 4 semanas de desarrollo en la cuarta hoja verdadera. Se observó la presencia de síntomas a partir de las 24 horas posteriores a la inoculación en las poblaciones de las cuatro variedades de *Capsicum spp.*; en el transcurso del tiempo de la infección se presentaron los síntomas descritos para la enfermedad de la marchitez del chile como se ven en la Tabla 9. *C. chinense* Chiapas y *C. annuum* Jalapeño tuvieron un progreso de la enfermedad similar, presentando síntomas en igual severidad a tiempos similares, mientras que la variedad de chile Ancho presentó a las 72 horas un nivel de severidad de síntomas inferior comparado con las otras variedades, no obstante, a las 96 horas las tres

variedades presentaron síntomas característicos de la mayor severidad caracterizados por necrosis en tejido sistemático.

**Tabla 9.** Síntomas de enfermedad en *Capsicum chinense* Chiapas y *Capsicum annuum* variedades Jalapeño y Ancho. a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección con discos de micelio de *P. capsici* Oaxaca.

	0 hpi	24 hpi	48 hpi	72 hpi	96 hpi
<i>Capsicum chinense</i> Chiapas + <i>P. capsici</i>					
<i>Capsicum annuum</i> Jalapeño + <i>P. capsici</i>					
<i>Capsicum annuum</i> Ancho + <i>P. capsici</i>					

La valoración del análisis del progreso de la enfermedad evaluado cada 24 horas posterior a la infección con *P. capsici* Oaxaca de las poblaciones de *C. chinense* Chiapas, *C. annuum* Jalapeño y *C. annuum* Ancho se muestra en la Tabla 10, la integración de estos datos en el cálculo del porcentaje de severidad se presenta en la Figura 14 de la sección de Anexos. Para *C. chinense* Chiapas, el progreso de la enfermedad se observó desde la aparición de síntomas como daño en

hoja con una escala de 1 (40 % de la población analizada) y 2 (60% de la población) a las primeras 24 horas (Fig. 14A), pasando a ser daño y necrosis tanto en hoja como en tallo a las 48 horas (60% en nivel 4 de la escala) (Fig. 14B), y por último presentando necrosis en tejido sistemático y presencia de micelio a las 72 (100 %) horas posteriores a la infección, donde la mayoría de las plantas llegaron a este punto (Fig. 14C y D).

**Tabla 10.** Índice de enfermedad de *Capsicum chinense* Chiapas, *Capsicum annuum* variedades Jalapeño y Ancho (0 = Sin síntomas aparentes, 1 = Aspecto empapado en agua, 2 = Área en contacto con patógeno necrótico, 3 = hojas inoculadas necróticas, 4 = tallo necrotizado, 5 = hojas sistemáticas necrotizadas).

Índice de enfermedad	Tratamiento	Número total de plantas	Índice	Número de plantas con los síntomas					
				0	1	2	3	4	5
<b>24 hpi</b>									
	<i>C. chinense</i> + <i>P. capsici</i>	5	32.0		2	3			
	Jalapeño + <i>P. capsici</i>	7	28.6		4	3			
	Ancho + <i>P. capsici</i>	8	27.5		5	3			
<b>48 hpi</b>									
	<i>C. chinense</i> + <i>P. capsici</i>	5	72.0				2	3	
	Jalapeño + <i>P. capsici</i>	7	77.1				1	6	
	Ancho + <i>P. capsici</i>	8	60.0				8		
<b>72 hpi</b>									
	<i>C. chinense</i> + <i>P. capsici</i>	5	100.0						5
	Jalapeño + <i>P. capsici</i>	7	94.3					2	5
	Ancho + <i>P. capsici</i>	8	77.5				1	7	
<b>96 hpi</b>									
	<i>C. chinense</i> + <i>P. capsici</i>	5	100.0						5
	Jalapeño + <i>P. capsici</i>	7	100.0						7
	Ancho + <i>P. capsici</i>	8	100.0						8

En *Capsicum annuum* Jalapeño en las primeras 24 horas posteriores a la infección, el 57% de la población mostraban síntomas de etapas iniciales de la infección (Escala 1) y el 43 % restante mostro de daño en área de contacto (Nivel 2 de escala de severidad), a las 48 horas las plantas infectadas presentaban necrosis en hoja y en la mayoría de la población la necrosis había alcanzado el tallo (14% de la población con escala de severidad 3 y 86% con escala 4), para las 72 horas el daño en las plantas se encontraba en su mayoría a nivel sistemático (29% de la población con escala 4 y 71% con escala 5), para las 96 horas la población en su totalidad presentaba daño sistemático.

Para la variedad *Capsicum annuum* Ancho, a las 24 horas los síntomas eran evidentes en la hoja infectada, presentando un aspecto empapado y también daño en el área de contacto (62 % con escala de 1 y 38 % con escala 2), a las 48 horas prácticamente todas las plantas infectadas presentaban necrosis en las hojas inoculadas (100 % nivel 3 de la escala de severidad), para las 72 horas la necrosis se había esparcido al tallo, sin llegar a ser sistemático, en comparación con las otras variedades analizadas (88 % de la población con nivel 4 de la escala de severidad). No obstante, para las 96 horas posteriores a la infección, todas las plantas presentaban daño sistemático y presencia de micelio en la planta.

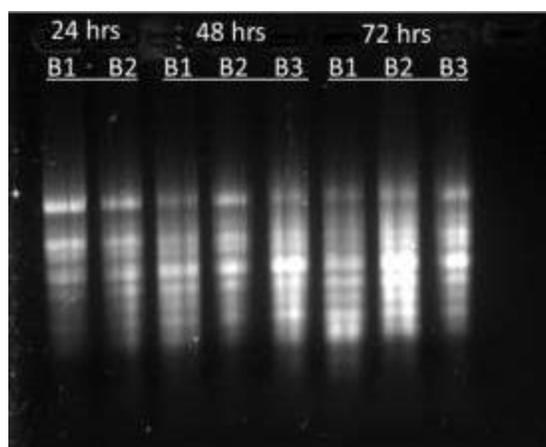
## **7.2 Análisis del efecto de elicitors sobre marcadores de defensa en planta**

### **7.2.1 Evaluación del efecto de la concentración de los elicitors moduladores de la señalización de defensa en *Capsicum annuum* variedad poblano**

Debido a la pérdida del porcentaje de germinación de las semillas de *Capsicum chinense* del banco de germoplasma del CICY; y de un fenotipo poco favorable de *Capsicum chinense* no comercial, se decidió emplear *Capsicum annuum* variedad poblano basados en los resultados de la sección previa. El fenotipo de la planta ha influido durante la estandarización de las concentraciones de los diferentes inductores ya analizadas en el modelo *Capsicum chinense*. En este modelo la concentración de MeJA (150 y 100  $\mu\text{M}$ ) y de BABA (0.5 mM y 5 mM) no afecta a nivel visible el estado fisiológico de las plantas de 4 semanas de desarrollo. Con el elicitor etefón se manejaron varias concentraciones debido a que afecta drásticamente con la pérdida de hojas, con 0.1, 1 y 2.5 mM no se observó efecto algún en el proceso fisiológico de caída de

hojas. Se evaluó 5, 2.5 y 1 mM de SA, se observó que la concentración de 5 mM de SA tiene efecto fisiológico visible, se observó daño en la hoja parecida a una respuesta hipersensible; mientras que la concentración de 2.5 y 1 mM no presentaron dicho efecto. De este análisis se concluyó que es necesario estandarizar la concentración de los inductores por cada modelo vegetal de estudio aun siendo del mismo género (Véase Anexos 11.3 para revisar el efecto de las concentraciones en cada tratamiento a nivel macroscópico).

Ante los resultados de este primer análisis se prosiguió a determinar si los inductores a las concentraciones empleadas activan los mecanismos de defensa en *Capsicum annuum* variedad poblano. Para ello se prosiguió a la extracción de ARN total, durante la aplicación del protocolo sugerido en el manual del PUREZOL de BIO-RAD con modificaciones establecidas en el grupo de trabajo se obtuvo muestras de buena integridad y calidad, sin embargo, no fue posible obtener todas las muestras de una matriz de análisis, aunado a esto pesos por debajo de 0.300 g no eran posibles de obtener con este protocolo, estos resultados fueron similares a los obtenidos con tejido infectado con *P. capsici*, (Fig. 17 de la sección de Anexos). Ante estos resultados se cambió de estrategia y se empleó el kit de extracción de ARN de Zymo Research (R2072) con ligeras modificaciones. Como resultados obtuvimos muestras de ARN total de buena calidad e integridad (Fig. 3).



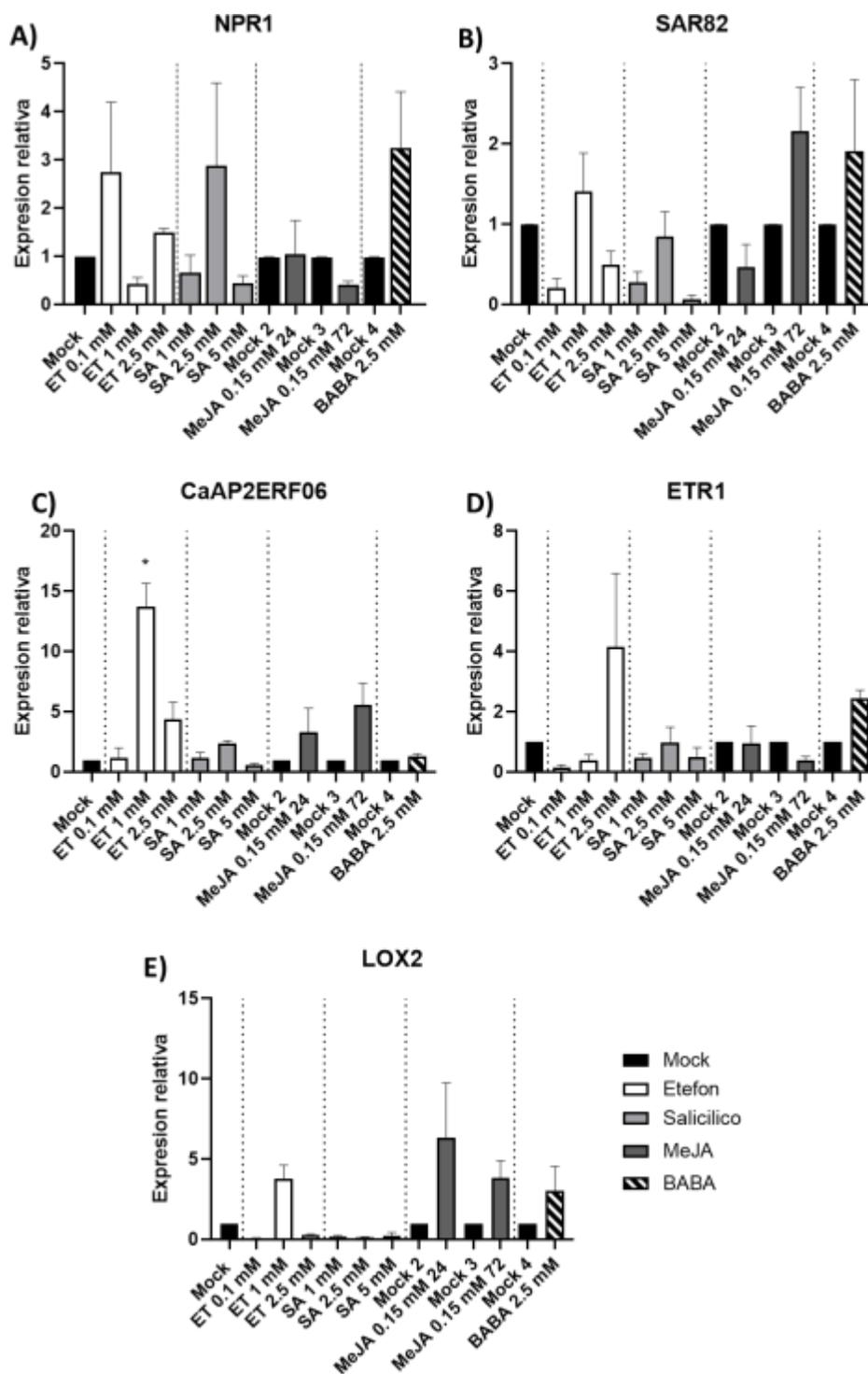
**Figura 3.** Electroforesis extracción ARN muestras de tratamiento con BABA. Extracción por medio de Kit de extracción de ARN (B1 = Control; B2 = BABA 2.5 mM; B3 = BABA 5 mM).

El análisis de expresión de genes fue realizado para diversos marcadores asociados a niveles respuesta de defensa de la planta y a los elicitores, para cada tratamiento obtuvimos diferentes perfiles de expresión, con ciertas tendencias marcadas. En plantas tratadas con ET se destaca principalmente la concentración 1 mM, que vio un aumento en la expresión y en mayor magnitud que el resto de las concentraciones en los genes AP2, LOX2, PR1A, PR1B Y PDF1.2B, y una represión para los genes NPR1 y ETR1, en SAR82 no presento cambios; para el tratamiento con SA destaca el tratamiento 2.5 mM donde se presentó aumento en la expresión en algunos genes como NPR1, AP2 y PDF1.2B, y menor represión de otros, comparando con las demás concentraciones, los genes ETR1 y SAR82 no fueron afectados en su expresión ante el tratamiento; En el caso de MeJA tanto para el tratamiento con tiempo de aclimatación de 24 horas como el de 72 horas presentaron un perfil similar de expresión, con diferencia en las magnitudes. En el caso de BABA, que se evaluó solamente la concentración de 2.5 mM, esta presento aumento en la expresión en todos los genes evaluados (Fig. 4 y Fig. 5).

Para cada gen, en el caso de NPR 1 para ET se presentó un aumento de expresión de 2.75 y 1.49 para las concentraciones de 0.1 mM y 2.5 mM respectivamente, mientras que la concentración 1 mM se reprimió la expresión del gen -2.35 veces; en el caso de SA se vio un aumento de 2.8 en la expresión para la concentración 2.5 mM, mientras que para 1 mM y 5 mM se presentó una represión de -1.53 y -2.25 veces, respectivamente; con MeJA 0.15 mM no hubo cambios en la expresión para el pretratamiento con tiempo de aclimatación de 24 hrs "MeJA (24)", mientras que para el tiempo de aclimatación de 72 horas se reprimió -2.4 veces; en el caso de BABA se dio un aumento en la expresión de 3.24 veces (Fig. 4A). Para SAR82 se reprimió la expresión para las concentraciones de ET de 0.1 y 2.5 mM, mientras que para 1 mM no se presentaron cambios; Para SA Se reprimió la expresión del gen -3.6,-1.85 y -15.2 veces para 1, 2.5 y 5 mM respectivamente; en MeJA hubo un aumento de 2.16 veces para MeJA (72) y una represión de -2.1 en MeJA (24); BABA vio un aumento de 1.9 en la expresión. (Fig. 4B).

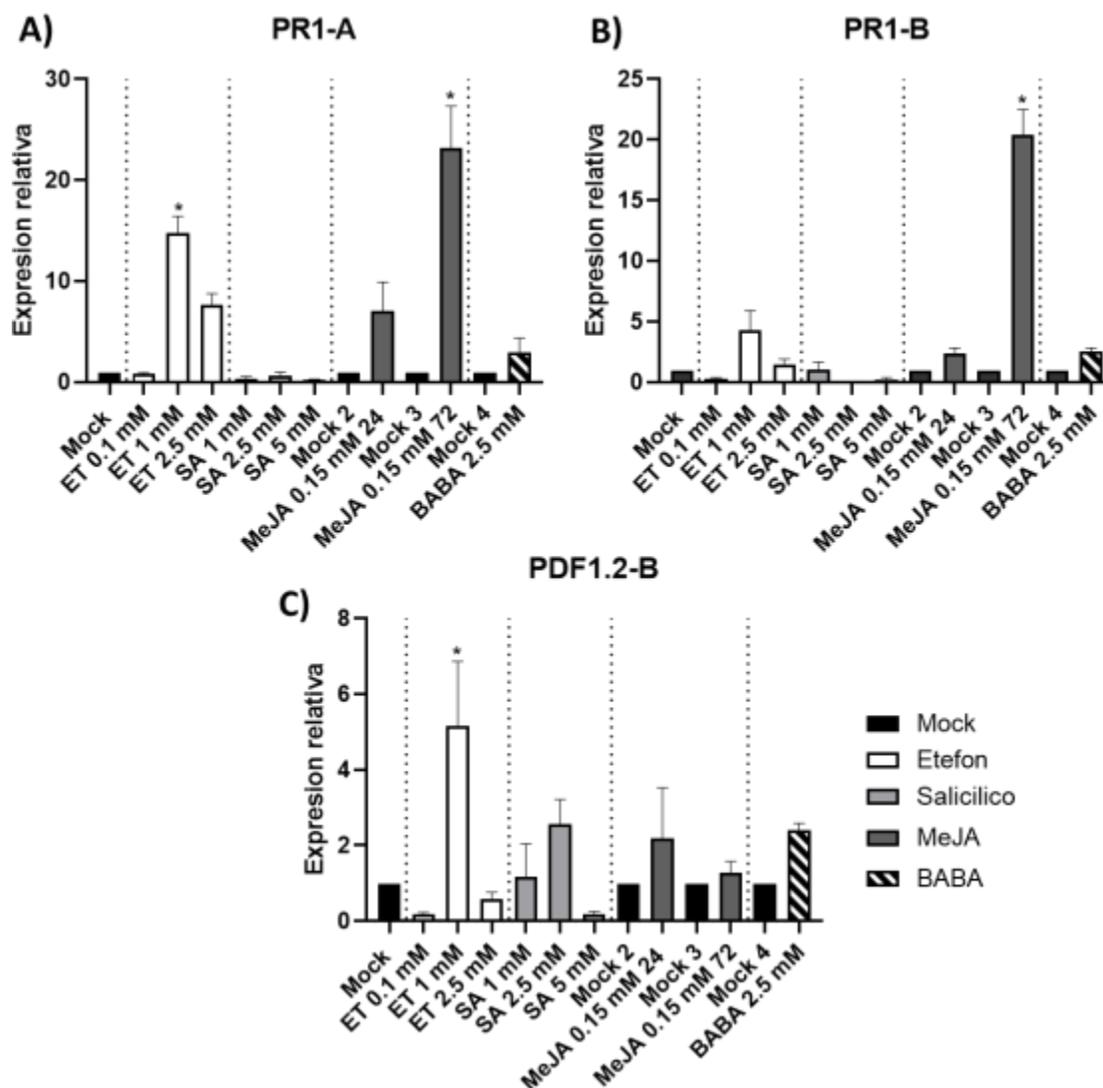
En AP2 ET presentó un aumento en la expresión de 10.37 y 4.38 a 1 y 2.5 mM, para 0.1 mM no hubo cambios. En SA se vio un aumento en la expresión de 2.372 para 2.5 mM, sin cambios para 1 mM y con represión para 5mM; MeJA (24) vio un aumento en la expresión de 3.3 y 5.57 para MeJA (72); para BABA se vio un ligero aumento de expresión de 1.3.( Fig. 4C). En cuanto a

ETR1, se vio un aumento en la expresión de 4.16 veces para ET 2.5 mM, mientras que el resto presentó una represión del gen; con SA no se presentaron cambios en 2.5 mM, y para 1 y 5 mM se reprimió -2.86 y -2 veces la expresión; con MeJA, se reprimió la expresión del gen -2.6 veces para MeJA (72), MeJA (24) no presentó cambios; BABA presentó un aumento de 2.45 veces. (Fig. 4D). Para LOX2, hubo un aumento de 3.78 en la expresión para ET 1 mM, el resto de las concentraciones la expresión se reprimió; para SA los tratamientos presentaron represión del gen de -5.06, -9.7 para 1 y 2.5 mM, para 5 mM fue de -55.245 veces; En MEJA se observó un aumento en la expresión en ambos tratamientos, siendo de 10.83 veces para MeJA (24) y de 3.81 veces para MeJA (72) (Fig. 4E).



**Figura 4.** Expresión relativa de genes en *Capsicum annuum* Ancho en respuesta a tratamientos y concentraciones múltiples de elicitors. Análisis por RT-qPCR de respuesta de *Capsicum annuum* Ancho a tratamientos con Etefon, Ácido salicílico, MeJA y BABA a diferentes concentraciones (Como Mock se usó el diluyente de cada fitohormona). Se evaluaron los genes A) NPR1, B) SAR82, C) AP2 D) ETR1 y E) LOX2.

Para PR1A se presentó un aumento en la expresión de 14.74 y 7.64 en Etileno 1 mM y 2.5 mM respectivamente, sin cambios significativos en ET 0.1 mM. En SA las 3 concentraciones presentaron represión del gen, en magnitud de -2.89,-1.48 y -3.7 para las concentraciones de 1, 2.5 y 5 mM respectivamente. En MeJA hubo un aumento de 7.1 y 23.22 para los tratamientos MeJA (24) y MeJA (72) respectivamente; y en BABA el aumento en la expresión fue de 2.28 veces (Fig. 5A). En el marcador PR1-B se vio un aumento en la expresión en ET 1 y 2.5 mM de 6.79 y 1.43 respectivamente, en ET 0.1 mM se redujo -3.52 veces; con SA en todas las concentraciones se reprimió el gen, siendo mayor en 2.5 mM donde se vio reprimida -17.7 veces; con MeJA hubo un aumento de 2.41 y 20.4 para MeJA (24) y MeJA (72) respectivamente; y en BABA aumentó la expresión 2.58 veces (Fig. 5B). Por último, para el marcador dePDF1.2B en ET se dio un aumento de la expresión de 5.16 para la concentración de 1 mM, el resto de las concentraciones se vio reprimido, Con SA se vio un aumento de 2.57 en 2.5 mM, mientras que para 1 mM no hubo cambios y para 5 mM se reprimió el gen -5.33 veces, Sen MeJA la expresión aumento para MeJA (24), MeJA (72) no presentó cambios, por último, BABA presentó un aumento de 2.4 veces. (Fig. 5C).



**Figura 5.** Expresión relativa de genes PR1-a, PR1-B y PDF1.2-B en *Capsicum annuum* Ancho en respuesta a tratamientos y concentraciones múltiples de elicitors. Análisis por RT-qPCR de respuesta de *Capsicum annuum* Ancho a tratamientos con Etefón, Ácido salicílico, MeJA y BABA a diferentes concentraciones (como Mock se usó el diluyente de cada fitohormona). Genes evaluados: A) PR1-A, B) PR1-B y C) PDF1.2-B.

Estos resultados nos indican que concentraciones de 2.5 mM de SA, 1 mM de ET, 0.15 mM de MeJA y 2.5 mM de BABA activan los mecanismos relacionados con la defensa en *Capsicum annuum* variedad Ancho.

### **7.3 Análisis del efecto de elicitors sobre las fases de infección a nivel macroscópico y molecular**

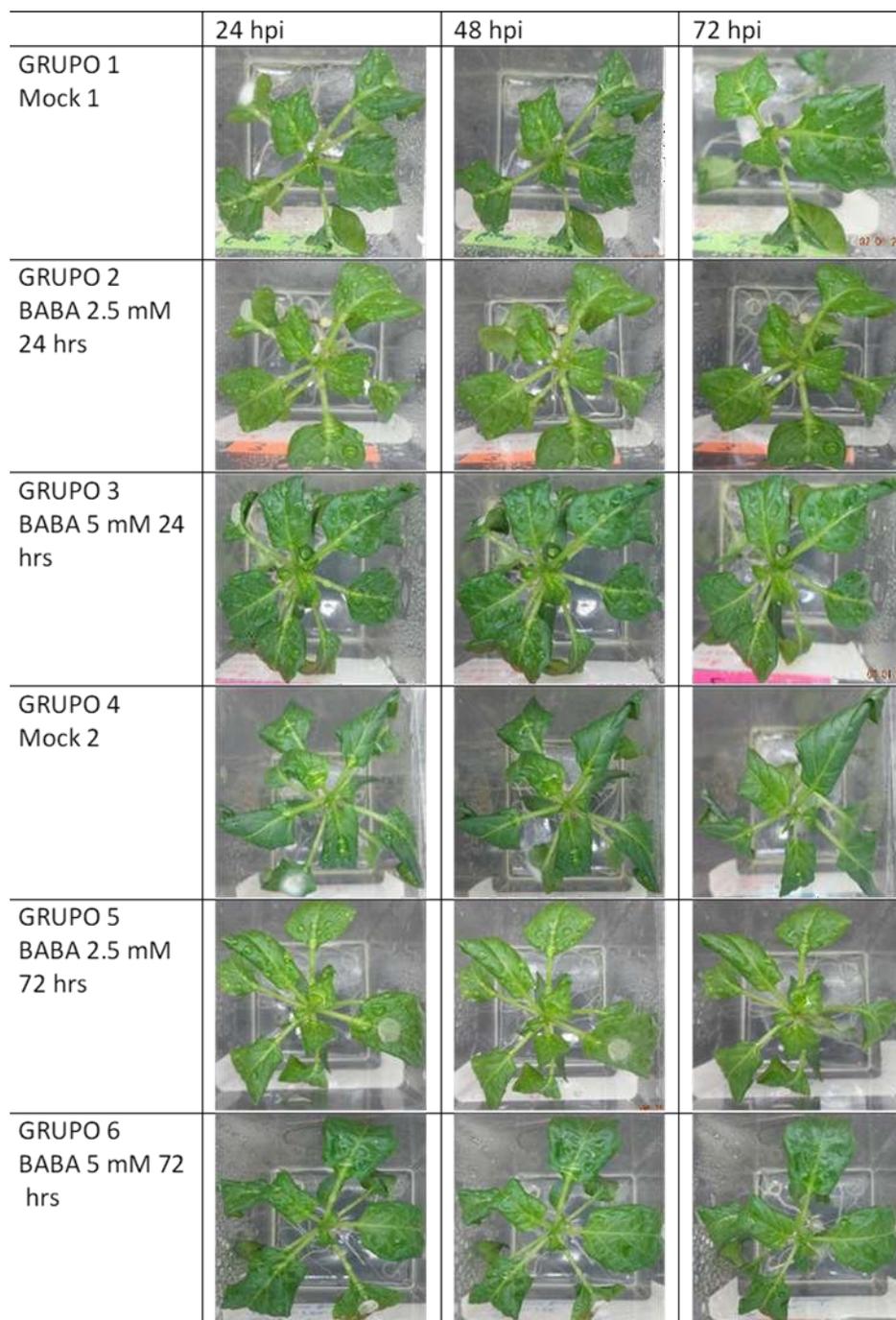
Se evaluó el efecto de los diferentes elicitors SA, ET, BABA y MeJA a diversas concentraciones, tanto a nivel fisiológico como de expresión de genes marcadores, evaluando la respuesta de las plantas ante estos tratamientos y frente a una interacción compatible con *P. capsici*.

#### **7.3.1 Efecto del tratamiento con SA, ET y BABA en la tolerancia a *P. capsici* basado en escala de severidad**

Se evaluó el efecto de los diversos tratamientos frente a la infección con *P. capsici*. Para el ácido-beta aminobutírico (BABA) los tratamientos se dividen en 6 grupos, caracterizados por un control, un tratamiento con BABA a 2.5 mM y uno con BABA 5 mM, con tiempos de aclimatación diferentes, para los grupos 1-3 el tiempo fue de 24 horas, y para los grupos 4-6 el tiempo fue de 72 horas, pasadas las cuales se infectó con discos de micelio de *P. capsici*.

En los diferentes tratamientos evaluados el progreso de la enfermedad a nivel macroscópico (Tabla 11) a lo largo de 72 horas no se presentó diferencias entre tratamientos, el progreso de la enfermedad se llevó a cabo con un perfil muy similar de avance de síntomas en escala de severidad entre los 6 grupos, con un ligero retraso en la presencia de los síntomas iniciales de la infección para los grupos con tiempo de aclimatación post tratamiento de 72 horas.

**Tabla 11.** Síntomas de *C. annuum* Ancho pretratado con BABA e infectado con *P. capsici*, tiempos de inoculación postratamiento de 24 y 72 horas.



De acuerdo con el porcentaje de severidad el progreso de la enfermedad fue más evidente para los tratamientos con tiempo de aclimatación de 24 horas, presentándose a las primeras 24 hpi índices mayores comparados con los grupos 4-6. De igual manera esto ocurre para las 48 y 72 hpi, donde los porcentajes de severidad son ligeramente mayores para los grupos de

aclimatación de 24 horas, comparados con los de tiempo de aclimatación de 72 horas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Índice de Severidad *Capsicum annuum* Ancho con tratamientos con BABA a 24, 48 y 72 horas post infección con *P. capsici* (Grupo 1 = Control 24 horas; Grupo 2 = BABA 2.5 mM 24 hrs; Grupo 3 = BABA 5 mM 24 hrs; Grupo 4 = Control 72 hrs; Grupo 5 = BABA 2.5 mM 72 hrs; Grupo 6 = BABA 5 mM 72 hrs).

Índice de Severidad	Número total de plantas	Índice	Número de plantas con síntomas					
			0	1	2	3	4	5
<b>24 hpi</b>								
Control (24) + <i>P. capsici</i>	6	2.86	5	1				
BABA 2.5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	7	5.71	5	2				
BABA 5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	5	8.57	2	3				
Control (72) + <i>P. capsici</i>	4	0.00	4					
BABA 2.5 mM (72) + <i>P. capsici</i>	5	0.00	5					
BABA 5 mM (72) + <i>P. capsici</i>	5	0.00	5					
<b>48 hpi</b>								
Control (24) + <i>P. capsici</i>	6	54.29				5	1	
BABA 2.5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	7	45.71			5	2		
BABA 5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	5	42.86				5		
Control (72) + <i>P. capsici</i>	4	22.86	4					
BABA 2.5 mM (72) + <i>P. capsici</i>	5	25.71		1	4			
BABA 5 mM (72) + <i>P. capsici</i>	5	34.29			3	2		
<b>72 hpi</b>								
Control (24) + <i>P. capsici</i>	6	68.57					6	
BABA 2.5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	7	77.14				1	6	
BABA 5 mM (24) + <i>P. capsici</i>	5	57.14					5	
Control (72) + <i>P. capsici</i>	4	45.71					4	
BABA 2.5 mM (72) + <i>P. capsici</i>	5	54.29				1	4	

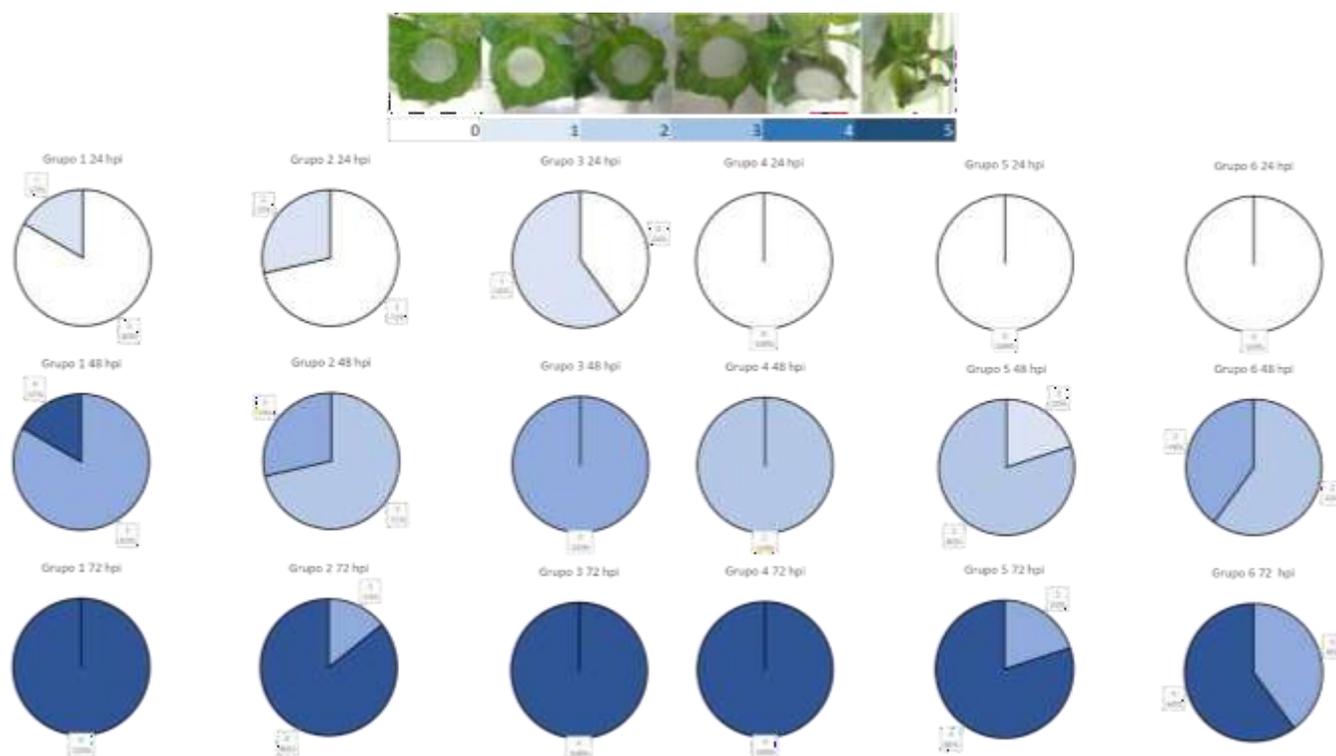
*capsici*BABA 5 mM (72) + *P.**capsici*

5 51.43

2

3

A las primeras 24 hpi el síntoma presente en parte de la población fue un aspecto de empapamiento en las hojas inoculadas, sin embargo, los síntomas en la mayoría de la población de los tratamientos no eran evidentes y se presentaron sin cambios. A las 48 hpi la progresión de los síntomas era evidente para todos los grupos, presentándose síntomas de mayor severidad en los grupos 1,2,3 y 6, donde se presentaba necrosis en las hojas inoculadas, e incluso en una planta del grupo 1 se presentó necrosis a nivel de tallo. Para las 72 hpi el síntoma más evidente para la mayoría de la población evaluada en los diversos tratamientos fue de necrosis en tallo, sin llegar a ser daño en hojas sistémicas. La población inicial de cada uno de los grupos era de 7 sin embargo debido a la caída de hoja inoculada a tiempos tempranos algunas plantas de la población total dejaron de ser estadísticamente relevantes, esto sucedió en gran parte para los grupos 4-6, que presentan las poblaciones finales más reducidas, mientras que por ejemplo el grupo 2 no presentó pérdida de hoja en ninguna planta de la población analizada (Fig. 6).



**Figura 6.** Índice de Severidad de la enfermedad para *Capsicum annuum* Ancho (CaA) tratadas con BABA a las 24, 48 y 72 horas post infección con *P. capsici*. (Grupo 1 = Control 24 horas; Grupo 2 = BABA 2.5 mM 24 hrs; Grupo 3 = BABA 5 mM 24 hrs; Grupo 4 = Control 72 hrs; Grupo 5 = BABA 2.5 mM 72 hrs; Grupo 6 = BABA 5 mM 72 hrs).

Para el caso de Etileno y Ácido Salicílico, se evaluó el efecto de los tratamientos a las concentraciones que presentaron la activación de los mecanismos relacionados a la defensa (1 mM y 2.5 mM, respectivamente). Los grupos de plantas evaluados a las 24 horas posteriores a la infección no mostraron cambios evidentes, ni síntomas aparentes, para las 48 horas la mayoría de las plantas de las poblaciones en ambos tratamientos habían dejado caer la hoja localizada, las plantas que mantenían su hoja presentaban síntomas de la infección, similares entre ambos tratamientos y las plantas control, con presencia de micelio y necrosis en el área localizada para el tratamiento de Etileno, mientras que para salicílico se observaron síntomas de pérdida de turgencia, necrosis en área localizada y presencia de micelio.

### **7.3.2 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a *P. capsici* basado en escala de severidad**

Se evaluó el efecto del tratamiento de MeJA en la tolerancia a *P. capsici* para ello se manejó cuatro grupos de plantas. El Grupo 1 consistió en las plantas con aspersión de una solución de 150  $\mu$ M de MeJA y un tiempo de aclimatación de 24 hrs previo a la inoculación con *P. capsici*; Grupo 2 fueron plantas asperjadas con Tritón x-100 al 1%, con un tiempo de aclimatación de 24 hrs, posterior al cual se infectó a la planta con el patógeno; el Grupo 3 fueron plantas asperjadas con Tritón x-100 al 1%, con un tiempo de aclimatación de 72 hrs, posterior al cual se infectó: por último el grupo 4 son las plantas con tratamiento con MeJA 150  $\mu$ M con aclimatación de 72 hrs más un posterior inoculo (Tabla 13).

La progresión de los síntomas a lo largo del tiempo fue variada para los diversos grupos, siendo los grupos 1 y 2 más similares entre sí, comparado con los grupos 3 y 4. En los grupos 1 y 2 el progreso de la enfermedad a nivel macroscópico a las 72 hpi alcanzó una escala de severidad de nivel 4, mientras que para los grupos 3 y 4 se alcanzó la escala de severidad 5 en parte de la población para el grupo 3 y en su totalidad para el grupo 4 a las 72 horas. El progreso de la enfermedad fue más drástico en este último grupo en el cual a las primeras 24 hpi ya se podía apreciar síntomas severos en la mayoría de la población (Tabla 14).

**Tabla 13.** Síntomas de enfermedad en *Capsicum annum* variedad Ancho, tratamiento con MeJA. a las 24, 48, Y 72 post infección con discos de micelio de *P. capsici* Oaxaca (Grupo 1 = MeJA 150  $\mu$ M 24 hrs, Grupo 2 = Tritón X-100 1% 24 hrs, Grupo 3 = Tritón X-100 1% 72 hrs, Grupo 4 = MeJA 150  $\mu$ M 72 hrs).

<i>Capsicum annuum</i> Ancho	24 hpi	48 hpi	72 hpi
Grupo 1			
Grupo 2			
Grupo 3			
Grupo 4			

**Tabla 14.** Índice de Severidad tratamientos con Jasmonato de Metilo (MeJA) en *Capsicum annuum* variedad Ancho, infectados con *P. capsici* Oaxaca. (Grupo 1 = MeJA 150  $\mu$ M 24 hrs, Grupo 2 = Tritón X-100 1% 24 hrs, Grupo 3 = Tritón X-100 1% 72 hrs, Grupo 4 = MeJA 150  $\mu$ M 72 hrs).

Índice de Severidad	Número de plantas con los síntomas					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento	Número total de plantas		Índice			
<b>24 hpi</b>						
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	3	0.0	3			
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	3	6.7	2	1		
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	4	40.0		4		
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	5	84.0		1	1	3
<b>48 hpi</b>						
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	3	33.3		1	2	
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	3	26.7		2	1	
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	4	65.0		1	1	2
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	5	96.0			1	5
<b>72 hpi</b>						
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	3	80.0			3	
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	3	80.0			3	
1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	4	85.0			3	1
150 $\mu$ M MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	5	100.0				5

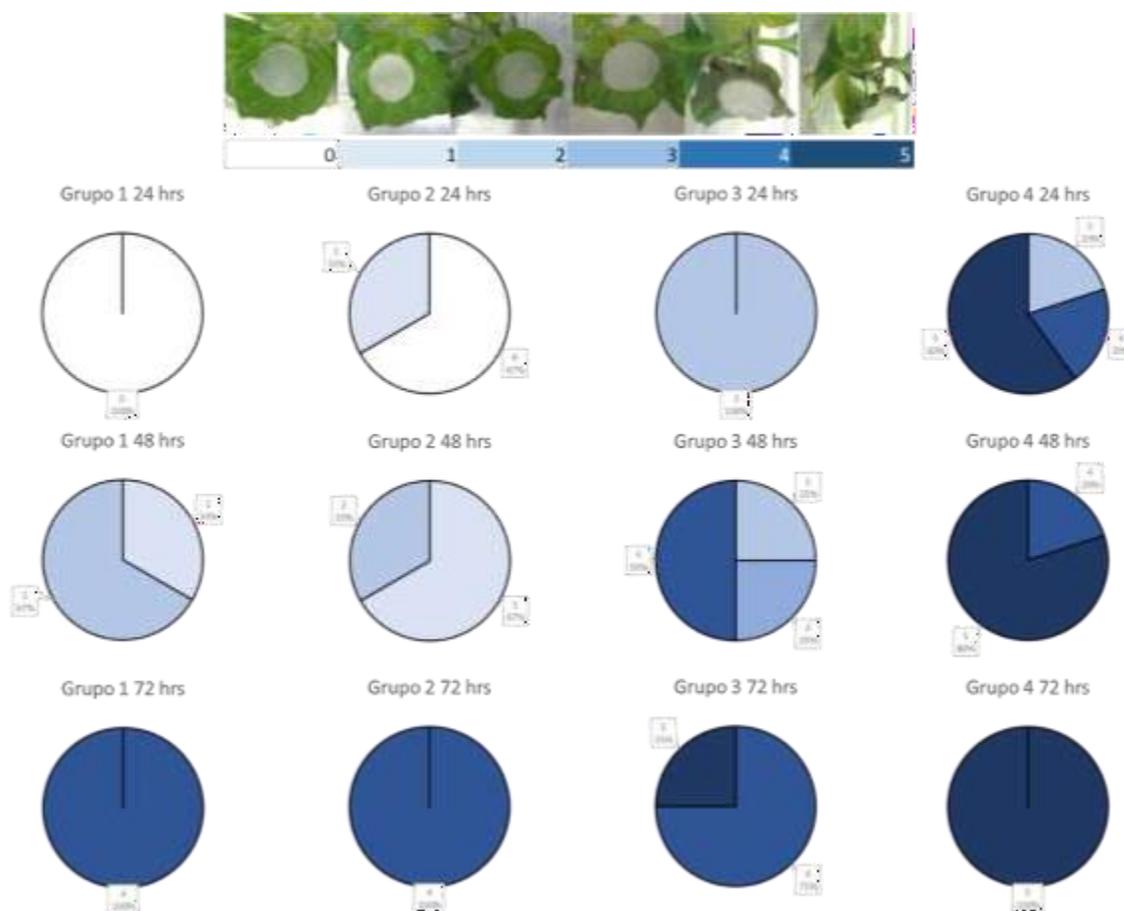
Para el grupo 1 a las primeras 24 horas no se presentaban síntomas evidentes en la población, a las 48 horas el 33% de la población presentaba síntomas de nivel de severidad 1, y el 67 %

restante presento daño en área localizada (Escala 2), a las 72 horas un 100% de la población presentó daño y necrosis en el peciolo (Escala 4).

Para el grupo 2 a las 24 horas los síntomas presentes en un 33% de la población correspondían al aspecto empapado en agua (Escala 1), a las 48 hpi el 67% de la población presentó este aspecto empapado (Escala 1) y el 33% restante tenía daño en área localizada (Escala 2). Pasadas las 72 hpi el 100% presentaba necrosis en peciolo con una intensidad de café oscuro (Escala 4).

En el grupo 3 en las primeras 24 horas se observaron síntomas más severos que en los grupos anteriores, el 100% de la población presentó daño en área localizada (Escala 2), para las 48 hpi el 25% de la población presentó daño en área localizada (Escala 2), 25% necrosis en hoja (Escala 3) y el 50% presentaba necrosis en peciolo (Escala 4), para las 72 horas ya había síntomas de etapas avanzadas de la infección en el 75% de la población (Escala 4) y un 15% presentó necrosis a nivel sistémico (Escala 5). El grupo 4 fue el que aparentemente resulto más afectado por la infección, presentando síntomas severos de la enfermedad a las 24 hpi, donde el 60% de la población presentaba daño a nivel sistémico (Escala 5), un 20% presento daño en el área localizada (Escala 2) y otro 20% daño en tallo (Escala 4). A las 48 horas el 20% de la población tenía daño próximo al tallo (Escala 4) y el 80% restante presentaba daño a nivel sistemático (Escala 5), para las 72 hpi el total de la población presentaba daño a nivel sistemático, y presencia de micelio en el tejido (Fig. 7).

Con esta información se determinó que el tratamiento con tiempo de aclimatación de 72 horas tiene un impacto negativo en las plantas analizadas en contra de la infección comparándolos con el tratamiento de una aspersión de MeJA con aclimatación de 24 hrs.



**Figura 7.** Índice de Severidad de la enfermedad para *Capsicum annuum* Ancho (CaA). Plantas pretratadas con Jasmonato de Metilo y Tritón x-100 1% (Grupo 1 = MeJA 150  $\mu$ M 24 hrs, Grupo 2 = Tritón X-100 1% 24 hrs, Grupo 3 = Tritón X-100 1% 72 hrs, Grupo 4 = MeJA 150  $\mu$ M 72 hrs). Infectadas con *P. capsici*, evaluadas a las 24, 48 y 72 hpi.

Durante este análisis se observó que si bien el tratamiento con 1% de tritón o 150  $\mu$ M MeJA no afectan con la pérdida de hojas, la inoculación del agente patógeno sí. Se inició el estudio con 20 plantas pertenecientes a cada grupo y se logró concluir con 5 plantas con ciclo completo de infección (Tabla 14). Ante esto nos planteamos coleccionar la hoja inoculada transcurridos las 72 para el Grupo 1 y 2; se observó que en el caso del Grupo 1 con pretratado con MeJA la infección sistémica se presentó con síntomas menos agresivos a las 48 horas posteriores a la disección de la hoja inoculada en comparación con el grupo 2 en donde se observó pérdida de turgencia del tallo y necrosis de hojas (Fig. 8).



**Figura 8.** Comparativa entre los síntomas de *Capsicum annuum* Ancho 72 horas posterior a la remoción de la hoja inoculada con *P. capsici*. A) Grupo tratamiento con Tritón X-100 1%. B) Grupo tratamiento con MeJA 150  $\mu$ M.

En una segunda repetición del análisis fue necesario cambiar el % del diluyente del inductor MeJA (0.1% de tritón); para esta repetición se incluyó la colecta de tejido infectado para el análisis de los marcadores de fases infectivas. Se colectó el tejido infectado cada 24 horas en 5 plantas representativas por tiempo y el resto continuo con el inoculo para verificar los resultados observados en el primer experimento.

Cabe mencionar que por logística se nombró en esta repetición como grupos a los siguientes: Grupo 1 fueron plantas asperjadas con 0.1 % de Tritón x-100, con un tiempo de aclimatación de 24 hrs, posterior al cual se infectó a la planta con el patógeno; Grupo 2 consistió en las plantas con aspersión de una solución de 150  $\mu$ M de MeJA y un tiempo de aclimatación de 24 hrs previo a la inoculación con *P. capsici*; Grupo 3 fueron plantas asperjadas con 0.1% de Tritón, con un tiempo de aclimatación de 72 hrs, posterior al cual se infectó; por último el grupo 4 son las plantas con tratamiento con MeJA 150  $\mu$ M con aclimatación de 72 hrs más una posterior inoculación.



**Figura 9.** Síntomas iniciales de infección de *C. annuum* Ancho + *P. capsici*, presentes a las 48 horas post infección.

A nivel macroscópico el tejido inoculado no presentó síntomas visibles a las 24 horas posteriores a la inoculación en los cuatro grupos. A las 48 hpi se observó en el grupo 1 que el peciolo presentó aspecto de agua y en el sitio en contacto con el inoculo presentaba necrosis leve (un café tenue); el grupo 2 no presentó síntomas en el tejido vegetal, solo se vio crecimiento de micelio en el inoculo; en el grupo 3 y 4 se presentó la necrosis leve en la zona del inoculo (Fig.9). Estos síntomas son los presentados en la mayoría de la población analizada ya que hay una minoría que ya presentaban síntomas agresivos (Tabla 15).

A las 72 horas post inoculación todos los grupos presentaban necrosis severa en el sitio de la inoculación, en la mayoría de la población que representaba cada grupo se observó el aspecto marchito en la hoja en áreas que no se encontraban en contacto con el inoculo inicial, el peciolo ya presentaba daño en la mayoría. Alguna minoría de plantas presentaron un fenotipo de la enfermedad como de 48 hpi como se presenta en la imagen del grupo 1 (Tabla 15).

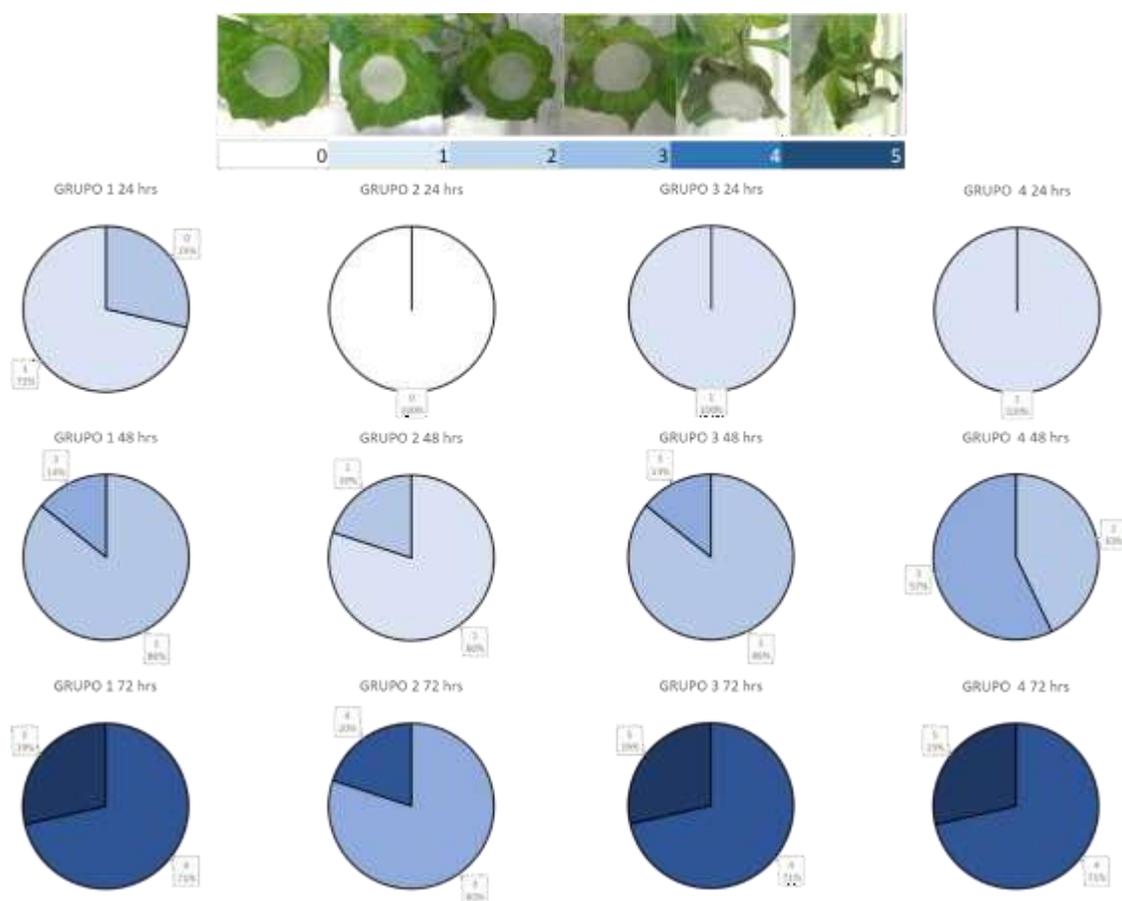
**Tabla 15.** Progreso de síntomas en *C. annuum* Ancho, infección con *P. capsici* Oaxaca, a las 48 y 72 hpi. 4 grupos de análisis (Grupo 1= Mock 1; Grupo 2= MeJA 0.15 mM 24 hpt; Grupo 3 = Mock 2; Grupo 4 = MeJA 0.15 mM 72 hpt).

<i>P. capsici</i> Oaxaca	48 hpi	72 hpi
Mock 24 hpt + <i>P. capsici</i> Oaxaca		
MeJA 0.15 mM 24 hpt + <i>P. capsici</i> Oaxaca		
Mock 72 hpt + <i>P. capsici</i> Oaxaca		
MeJA 0.15 mM 72 hpt + <i>P. capsici</i> Oaxaca		

**Tabla 16.** Índice de Severidad tratamientos con Jasmonato de Metilo (MeJA) en *Capsicum annuum* variedad Ancho, infectados con *P. capsici* Oaxaca. (Grupo 1 = Tritón X-100 0.1% 24 hrs, Grupo 2 = MeJA 0.15 mM 24 hrs, Grupo 3 = Tritón X-100 0.1% 72 hrs, Grupo 4 = MeJA 0.15 mM 72 hrs).

Índice de enfermedad	Número de plantas con los síntomas					
	0	1	2	3	4	5
Tratamiento	Número total de plantas	Índice				
<b>24 hpi</b>						
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	7	14.28	2	5		
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	5	0	5			
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	7	20		7		
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	7	20		7		
<b>48 hpi</b>						
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	7	42		6	1	
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	5	24		4	1	
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	7	42		6	1	
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	7	77		3	4	
<b>72 hpi</b>						
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (24 hr)	7	85			5	2
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (24hr)	5	64		4	1	
0.1% Tritón X-100 + <i>P. capsici</i> (72 hr)	7	85			5	2
150 µM MeJA+ <i>P. capsici</i> (72hr)	7	85			5	2

En este segundo evento se observó fue que para el tratamiento con MeJA 0.15 mM (Grupo 2) inoculado 24 horas post tratamiento la presencia de los síntomas se vio ligeramente retrasada, siendo que para las primeras 24 hpi no se presentan síntomas evidentes comparado con los demás tratamientos que presentaban los primeros síntomas en el total de la población, esta misma tendencia estuvo presente a lo largo de las 72 horas post infección, donde los síntomas más severos en el Grupo 2 fueron de necrosis en hoja en el 80% de la población (Escala 3), para los grupos 1, 3 y 4 la mayoría de la población presentó síntomas de necrosis en tallo, indicando que la infección llegó a nivel sistémico (Fig. 10).



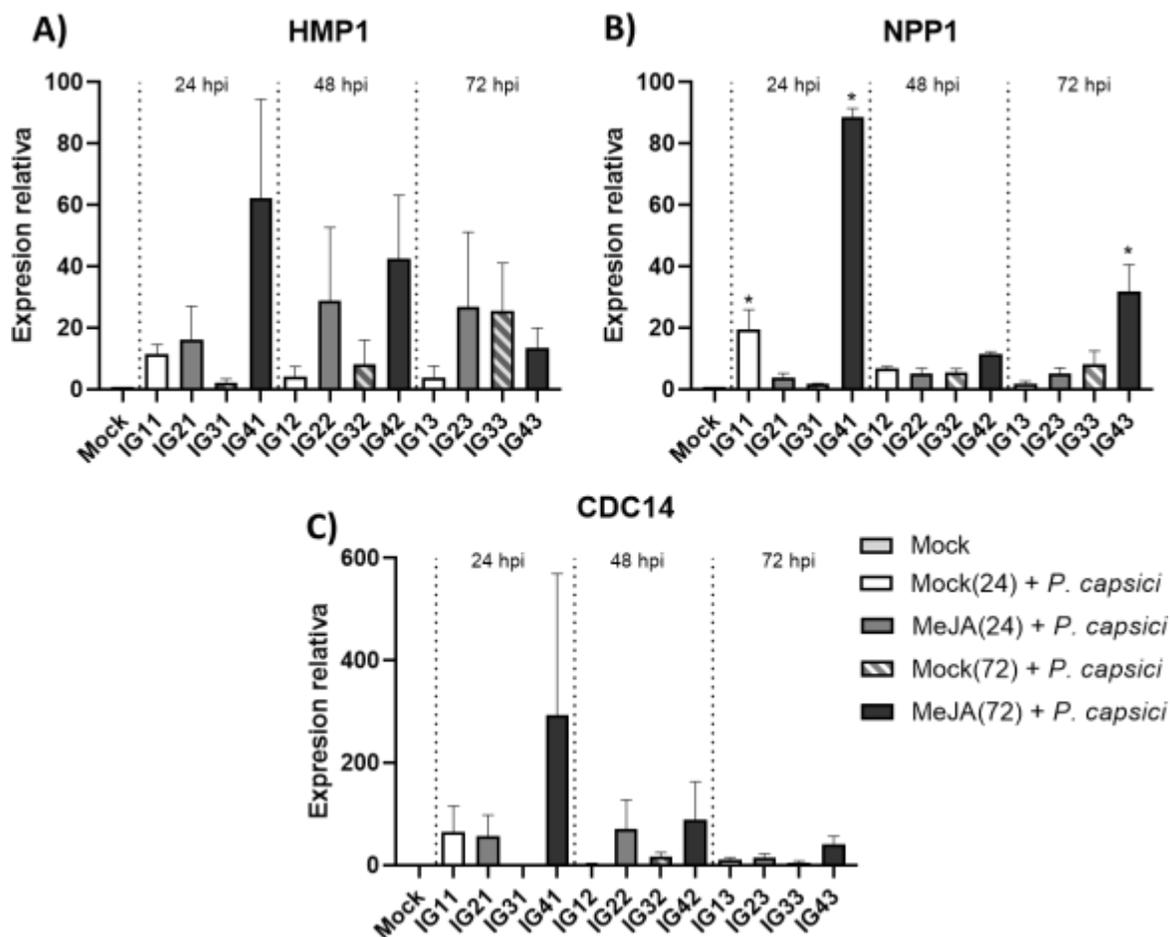
**Figura 10.** Índice de Severidad de la enfermedad para *Capsicum annuum* Ancho infectada con *P. capsici* Oaxaca. Plantas pretratadas con Jasmonato de Metilo y Tritón x-100 0.1% (Grupo 1 = Tritón X-100 0.1% 24 hrs, Grupo 2 = MeJA 0.15 mM 24 hrs, Grupo 3 = Tritón X-100 0.1% 72 hrs, Grupo 4 = MeJA 0.15 mM 72 hrs) evaluadas a las 24, 48 y 72 hpi.

Estos resultados nos indicaron que el tratamiento de MeJA 0.15 mM con 24 horas de aclimatación previo a la infección, tiene un impacto positivo en la aparición de síntomas de tiempos tempranos, comparando con el tratamiento de 72 horas de aclimatación donde de los dos eventos evaluados el primero presento un efecto negativo y el segundo no presento cambios respecto al control evaluado.

### **7.3.3 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a *P. capsici* basado en la expresión de genes de *P. capsici***

Para verificar si el tratamiento con MeJA realmente está afectando la tolerancia de *C. annuum* se decidió analizar a nivel molecular la expresión de genes relacionados con las fases del ciclo infectivo, así como la de genes relacionados con la patogénesis como con el caso de los efectores NLPs y RXLRs. Se evaluó la expresión de los genes HMP1, NPP1 y CDC14 cada uno asociado a un gen específico en las diversas etapas del ciclo infectivo del patógeno, para dos tratamientos con MeJA con infección a las 24 horas post tratamiento (IG1 y IG2), y a las 72 horas post tratamiento (IG3 y IG4) y su respectivo control a 24(1), 48(2) y 72(3) horas post infección con *P. capsici*. Los resultados obtenidos nos indican para el marcador HMP1 a las 24 hpi, el tratamiento con mayor expresión relativa del gen fue en MeJA-72 (IG41) con una expresión relativa de 62.37 veces, seguido por MeJA-24 (IG21) con 16.34 veces; los respectivos controles de infección presentaron una menor expresión del gen con respecto al correspondiente tratamiento. A las 48 horas se vio un aumento en la expresión de este gen para el tratamiento MeJA-24 (IG22) llegando a tener un aumento en la expresión de 28.85 veces, el tratamiento MeJA-72 (IG42) tuvo un aumento de 42.54 veces. Para las 72 hpi se presentó un aumento de 26.97 y 13.66 veces para MeJA -24 (IG23) y MeJA-72 (IG43) respectivamente, hubo también un aumento de 25.56 veces en la expresión para el tratamiento control de 72 horas de tratamiento previo a la infección (Fig. 11A). La tendencia notoria dirigida a la expresión en mayor magnitud en el tratamiento de MeJA 72(IG4) se conservó para la expresión del gen NPP1, donde a las 24 hpi, se presentó un aumento en la expresión del gen de 88.51 veces, con diferencias significativas respecto a los demás tratamientos, seguida del tratamiento control (24) con un aumento en la expresión de 19.56 veces (IG31). A las 48 horas los niveles de expresión entre los 4 tratamientos presentaron valores similares, y a las 72 hpi se presentó nuevamente un

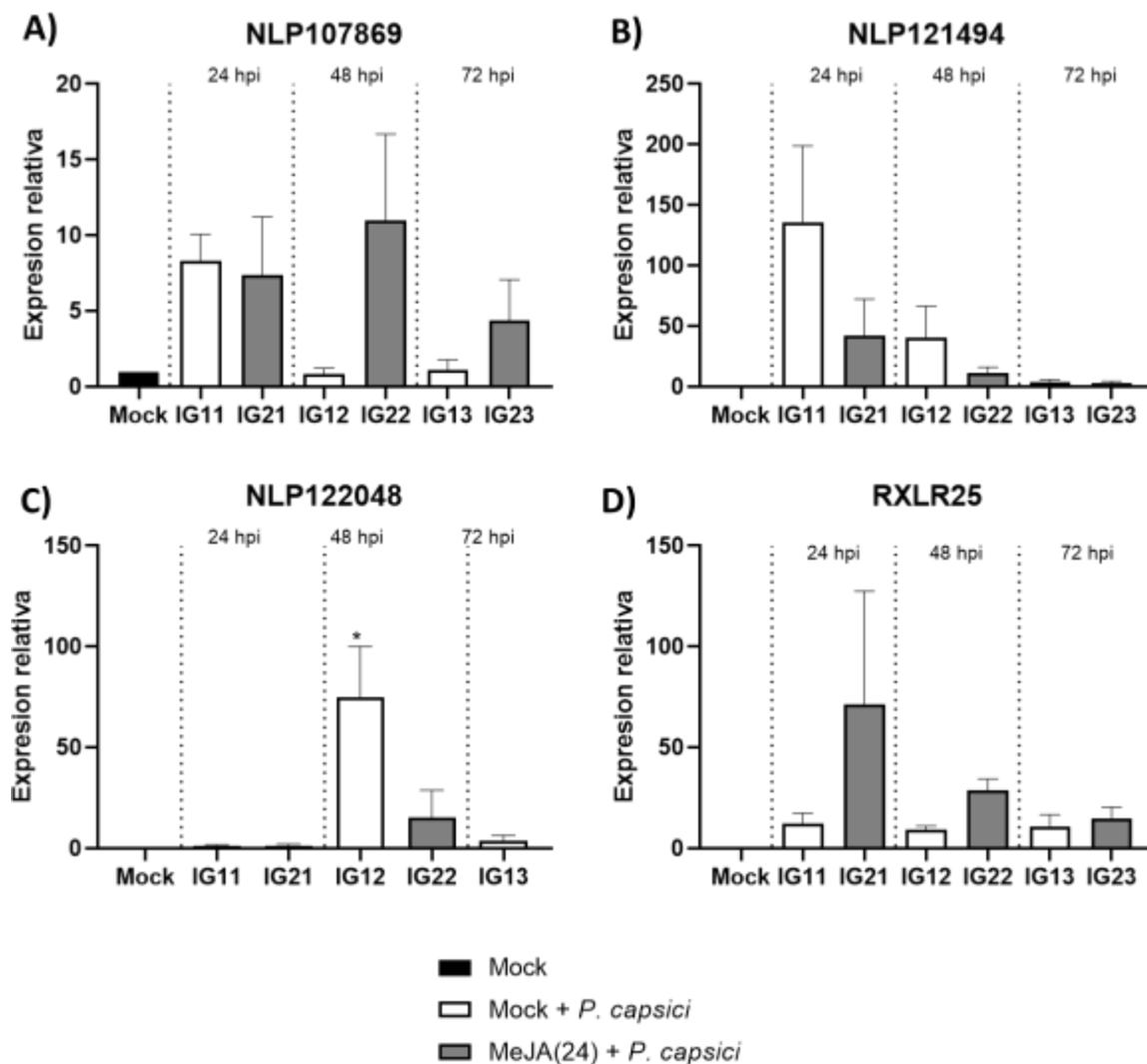
aumento marcado en la expresión del gen para MeJA 72 (IG43) (Fig. 11B). En cuanto al gen CDC14 los resultados se mostraron inconsistentes, observándose la expresión del gen a lo largo de las 72 horas con una tendencia variada para cada tratamiento., a las 24 horas la expresión del gen es marcada para los tratamientos MeJA (24) y su control, así como para el tratamiento MeJA (72) que se presenta en mayor magnitud, disminuyendo la expresión a lo largo de las siguientes horas evaluadas (Fig. 11C).



**Figura 11.** Expresión relativa de genes de fases infectivas en tejido de *Capsicum annuum* Ancho pretratado con MeJA, e infectado con *P. capsici*. Análisis por RT-qPCR de genes de fases infectivas en tejido infectado, se evaluaron los genes A) HMP1, B) NPP1 y C) CDC14 para los tratamientos MeJA con infección 24 y 72 horas post tratamiento y la infección simple.

Los resultados obtenidos en los perfiles de expresión de los genes HMP1 y NPP1 en el tratamiento con MeJA -24, indicaron un mayor tiempo de la fase biotrófica y un retraso en la

aparición de la fase necrotrófica la cual drásticamente aparece a las 72 hpi con mayor magnitud que la simple infección, confirmaron los resultados obtenidos a nivel macroscópico. Para corroborar y complementar lo visualizado con los marcadores de fases infectivas, se evaluó en el tratamiento de MeJA-24 (IG2) y su control- 24 (IG1) a las 24, 48 y 72 hpi los perfiles de expresión de genes que codifican efectores citoplasmáticos (NLPs) y un efector apoplástico (RXLR25). Para el efector citoplasmático NLP 107869 a las 24 hpi se presentó una expresión relativa similar del gen para el tratamiento y la infección simple (7.4 y 8.33 respectivamente), para tiempos de 48 y 72 hpi se mantuvo la expresión para MeJA-24 (IG2), contrario a lo que se presentó en la infección simple (IG1). Para NLP 121494 la tendencia en la expresión del gen fue similar entre los tratamientos, sin embargo, la infección simple (IG1) presentó una mayor magnitud de expresión a las 24, 48 y 72 hpi (Fig. 12A y B). La expresión del gen NLP 122048 se vio en aumento para los dos tratamientos a tiempos de 48 hpi, donde la infección simple presentó una mayor magnitud con diferencias significativas respecto al tratamiento MeJA (IG2) (Fig. 12C). Por último, para el efector apoplástico RLXR 25 la expresión relativa marco una tendencia a ser mayor para el tratamiento con MeJA, llegando a su punto más alto a las 24 hpi, y disminuyendo en tiempos posteriores, para la infección simple la expresión del gen se mantuvo en un nivel constante a lo largo de la infección (Fig. 12D).



**Figura 12.** Expresión relativa de genes de efectores citoplasmáticos y apoplásticos en tejido de *Capsicum annuum* Ancho pretratado con MeJA, e infectado con *P. capsici*. Análisis por RT-qPCR de genes de efectores en tejido infectado, se evaluaron los genes A) NLP107869, B) NLP121494 C) NLP122048 y D) RXLR25 para los tratamientos MeJA con infección 24 horas post tratamiento y la infección simple.

Estos resultados nos indican que, dadas las diferencias en la expresión relativa de genes entre los tratamientos y la infección simple, existe un efecto del tratamiento sobre los marcadores de infección del patógeno siendo en algunos casos mayor la expresión en las plantas tratadas con MeJA que previamente mostraron activar los mecanismos de defensa de la planta.

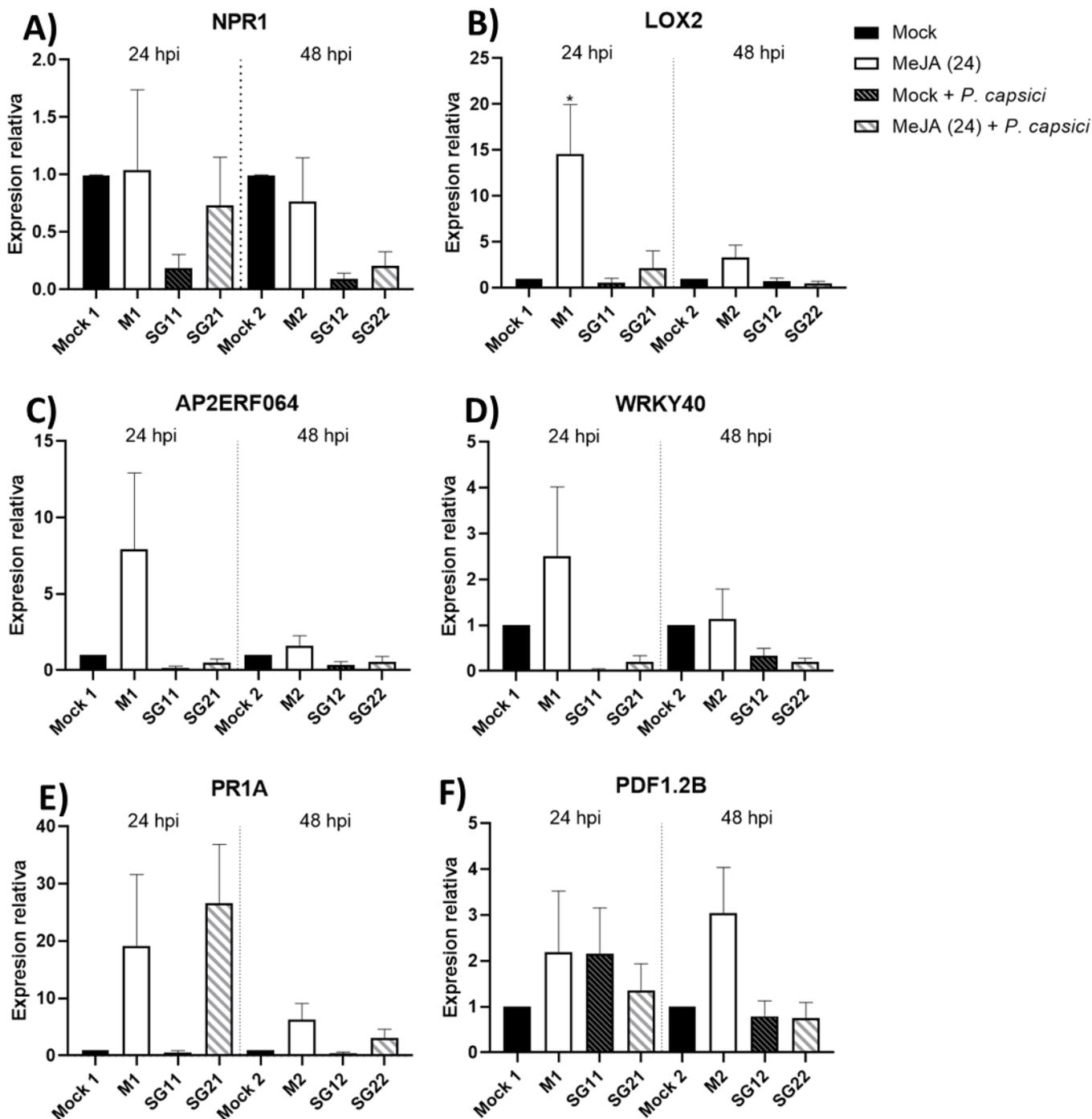
#### **7.3.4 Efecto del tratamiento con Jasmonato de Metilo (MeJA) en la tolerancia a *P. capsici* basado en la expresión de genes de defensa de *C. annuum* Ancho**

Para complementar el análisis de fases infectivas del patógeno, se realizó el análisis de los marcadores de defensa de la planta previamente tratadas con MeJA frente a la infección, comparándolos con los tratamientos sin infección. Para este punto se evaluó la expresión de los genes NPR1, LOX2, AP2, WRKY40, PR1A Y PDF1.2B (Fig. 13).

La tendencia de expresión mostrada en este análisis fue que, para tiempos tempranos de ciclo infectivo, los marcadores de defensa de la planta en la mayoría de los casos tienen niveles de expresión menores para los tratamientos con infección, ya sea la infección simple (SG11 o el pretratamiento con la fitohormona (SG21), comparado con los tratamientos sin infección (M1), esto fue más notorio a etapas tempranas (24 HPI). Para el gen NPR1 el tratamiento de infección simple (SG11) presenta marcadamente reducida en la expresión relativa del gen comparada con el tratamiento control siendo reprimida -5.46 veces, de manera similar el tratamiento MeJA con infección (SG21) muestra una represión de la expresión de -1.3 veces; a las 48 hpi esta diferencia es más marcada ya que los niveles de expresión para los tratamientos con infección fueron de -10.8 y -4.84 veces para la infección simple (SG12 ) y MeJA (SG22), respectivamente (Fig. 13A). La expresión del Gen LOX2 a las 24 hpi vio un aumento de 14.6 veces para el tratamiento MeJA sin infección (M1), mientras que para el tratamiento con infección (SG21) se vio un aumento de 2.15 veces, para la infección simple (SG11) se vio una represión de -1.67; a las 48 hpi los niveles de expresión se habían reducido llegando a ser de 3.3 veces mayor para el tratamiento sin infección (M2), y se vio una represión de -1.33 y -1.98 veces para la infección simple (SG12) y MeJA(SG22) con infección, respectivamente (Fig. 13B).

La tendencia vista en el gen LOX 2 se mantiene para el gen AP2 y WRKY40, observándose la mayor expresión de ambos genes a 24 hpi en el tratamiento de MeJA (M1), mientras que los tratamientos de infección simple (SG1) y MeJA (SG2) con infección se vio una represión de la expresión del gen ( Fig. 13C y D). Continuando río abajo con los marcadores de los niveles de defensa más tardíos como los genes PR1a y PDF1.2B, se observó para PR1a a las 24 hpi que el tratamiento MeJA con y sin infección presentó un aumento en la expresión relativa del gen, siendo de 19.2 y de 26.6 veces para cada tratamiento, mientras que la infección simple presentó

una represión de -1.86 veces, esta tendencia a las 48 hpi se mantuvo, pero en menor magnitud, reduciéndose los niveles de expresión relativa de los tratamientos a niveles más cercanos al control (Fig. 13E) En el caso de PDF1.2B los niveles de expresión entre los tratamientos se presentaron muy similares, con una ligera tendencia a ser mayor en MeJA sin infección, más marcada a las 48 hpi, pero sin diferencias significativas (Fig. 13F).



**Figura 13.** Expresión relativa de genes marcadores de defensa de *Capsicum annuum* Ancho tratado con MeJA, infectado con *P. capsici*. Análisis por RT-qPCR de genes de defensa en tejido infectado, se evaluaron los genes A) NPR1, B) LOX2, C) AP2, D) WRKY40, E) PR1A Y F) PDF1.2B para los tratamientos de MeJA con y sin infección, y el respectivo Mock por tratamiento, a las 24 y 48 hpi.

Estos resultados nos indican que existe un efecto de la infección sobre los marcadores de defensa de la planta, que genera la represión de la expresión de estos genes, y que el tratamiento previo con un promotor de la defensa como lo es MeJA amortigua a tiempos tempranos los efectos de esa represión causada por la infección, indicado por la tendencia a ser más reprimida para el tratamiento de infección simple, pero sin llegar a expresar estos genes de defensa a niveles de lo que sería el tratamiento sin infección. Este efecto ocasionado por el tratamiento se ve apaciguado al pasar el tiempo, dado que a las 48 horas posteriores a la infección las diferencias entre la infección simple y la infección con MeJA no eran tan marcadas.

## 8. DISCUSIÓN

Se ha reportado que en la interacción *P. capsici* – *Capsicum spp.*, la respuesta de resistencia del huésped puede diferir desde la sintomatología entre las diferentes variedades hasta el grado de tolerancia que estas pueden presentar ante una cepa de *P. capsici*. Hasta la fecha, poco se sabe sobre las respuestas de defensa de *Capsicum* el cual es hospedante de diferentes aislados de *P. capsici*. El número de reportes de los efectos positivos de las fitohormonas en la tolerancia ante patógenos hemibiotróficos proporcionan una herramienta para la comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen durante este tipo de interacciones. En el trabajo actual, analizamos el grado de tolerancia de variedades de *Capsicum spp.* y el grado de patogenicidad de 2 cepas de *P. capsici*. Investigamos el efecto de las fitohormonas en la restricción de la infección del patógeno hemibiotrófico *P. capsici* en plántulas de *Capsicum annum*.

### 8.1 Discusión sobre el objetivo particular 1

En primera instancia fue importante determinar el método de inoculación para poder evaluar el progreso de la enfermedad provocada por *P. capsici*, teniendo dos opciones, el método de infección con zoosporas y el método de inoculación con micelio, de los cuales pudimos determinar ciertas diferencias y ventajas y desventajas. Para zoosporas nos fue importante poder determinar la concentración de patógeno que estaba siendo capaz de infectar a la planta, así como el progreso y severidad de su sintomatología, con el defecto de que era un método inconsistente para llevar a cabo la infección bajo las condiciones de nuestro estudio, dado que, de una población evaluada, menos del 50% resultaban infectadas, lo cual se apreció por la progresión de síntomas de forma heterogenea entre una población infectada, y en diversos eventos (Fig. 2). Estos resultados han sido reportados por Kang y colaboradores (2020) en donde observaron que la resistencia a *P. capsici* difiere según el aislado del patógeno, el sitio de inoculación en la hoja, dentro de la misma variedad de pimiento. Adicionalmente Gevens y colaboradores (2006) hacen la misma observación sobre el método de inoculación con zoosporas afirmando que el uso de micelio como inoculo es más consistente (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Gevens *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2022).

En cuanto al método por micelio, al evaluarlo, nos permitió llevar a cabo una infección consistente, cuyos síntomas se mostraron homogéneos en una población determinada en diferentes eventos biológicos, donde se presentó una sintomatología más acorde a lo reportado en diversas literaturas respecto a la marchitez de Chile (Lamour *et al.*, 2012b) (Tabla 9). Se observó el fenotipo característico en interacciones hemibiotróficas, donde el patógeno cambia su estrategia de infección (biotrófica a necrotrófica) que ha sido reportado por diversos autores (Lamour *et al.*, 2012a; Jupe *et al.*, 2013; Coles *et al.*, 2022) En la interacción de *P. capsici* – *Capsicum spp.* se observó la presencia del síntoma de empapado de agua a las 24 hpi, seguida del inicio de la necrosis a las 48 hpi, y los síntomas más severos como necrosis a nivel sistémico y presencia de micelio a las 72 hpi, siendo a las 96 horas un daño total en la población infectada.

Al realizar el análisis de tolerancia en las 4 variedades de *Capsicum* estas presentaron ligera diferencia en el grado de tolerancia (Tabla 10), estos resultados coinciden con lo observado por Kang y colaboradores (2020). El método de inoculación de micelio ha sido reportado como un método agresivo de infección de patógenos de tipo hemibiotrófico, siendo confiable para evitar falsos positivos en el grado de tolerancia al patógeno en análisis (Kondratev *et al.*, 2020).

## **8.2 Discusión sobre el objetivo particular 2**

Las fitohormonas como el SA, MeJA y ET son señales cruciales para modular diversos procesos fisiológicos como la senescencia de la hoja o los mecanismos de defensa de las plantas. En diversas plantas MeJA o sus derivados bioactivos metil jasmonato (MeJA) al ser aplicado exógenamente estimulan senescencia de hojas, por sobre regular la inducción de algunos genes asociados a la senescencia (SAG) (Tan *et al.*, 2018). Por otro lado, ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA) juegan un papel importante en la transducción de la activación de las defensas de las plantas. SA por lo general induce mecanismos de resistencia que son activos contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, mientras que JA induce resistencia contra patógenos necrotróficos (Tamaoki *et al.*, 2013). Emplear las concentraciones adecuadas de cada fitohormona para activar los mecanismos de defensa sin que se activen mecanismos fisiológicos como la senescencia son un punto importante. En este punto del estudio, nos enfocamos en

proporcionar datos sobre la expresión de genes marcadores de las vías de señalización después del tratamiento con fitohormonas. Antes de analizar el efecto de estas moléculas sobre la tolerancia ante la infección analizamos si las plantas estaban activando los mecanismos modulados por cada una de estas fitohormonas, a diferentes concentraciones.

La revisión bibliográfica de experimentos similares realizados por diversos autores nos permitió diseñar el experimento para determinar el efecto de las concentraciones de los elicitores BABA y MeJA, tomando en cuenta la importancia de definir tanto la concentración como el tiempo de aclimatación de la planta al tratamiento. La evaluación de los diversos tratamientos se realizó a un nivel macroscópico por efecto del tratamiento sobre la planta a nivel fisiológico; y a nivel de genes, por medio de la expresión relativa de diversos genes asociados a las vías de señalización asociadas a cada una de las fitohormonas evaluadas. A nivel fisiológico los diversos tratamientos evaluados no presentaron efectos notables en las plantas, para cada tratamiento y concentración, con la excepción del tratamiento con SA a 5 mM donde las plantas presentaron una respuesta tipo hipersensible a las 24 horas posteriores al tratamiento (Véase Anexos 11.3 Tabla 20) lo cual fue importante considerar para evitar un efecto fisiológico negativo por parte del tratamiento que afectara nuestras observaciones.

Se observó que concentraciones de 2.5 mM de SA, 1 mM de ET, 0.15 mM de MeJA y 2.5 mM de BABA activan los mecanismos relacionados con la defensa en *Capsicum annuum* variedad Ancho. Los transcritos de genes relacionados con la señalización modulada por estas fitohormonas fueron regulados. En el caso de ET genes como CaAP2ERF06, LOX2, SAR82, ETR1, PRIA y B, y PDF1.2 son inducidos en su expresión; SA induce la expresión de NPR1, SAR82, CaAP2ERF06; MeJA induce los genes CaAP2ERF06, LOX2, PR1A y B, y PDF1.2; por último, BABA induce la expresión de los genes de NPR1, SAR82, ETR1, LOX2, PR1A y B, PDF1 (Fig. 4 y 5). Estos resultados son consistentes con lo reportado por diversos autores en plantas del género *Capsicum* (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2017; Barraza *et al.*, 2022), indicando que se están activando los mecanismos de defensa modulados por cada una de las fitohormonas analizadas a dichas concentraciones, del resto de concentraciones evaluadas la respuesta en expresión de genes no fue tan consistente y marcada.

### 8.3 Discusión sobre el objetivo particular 3

La defensa de las plantas contra los patógenos está modulada por las vías de señalización de las fitohormonas tales como ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), auxina y ácido abscísico; dependiendo del estilo de vida del atacante es la respuesta que se activa. SA induce defensa contra patógenos biotróficos que se alimentan y reproducen en células huésped vivas, mientras que JA activa la defensa contra patógenos necrotróficos que matan las células huésped para la nutrición y la reproducción (Spoel *et al.*, 2007). Las vías de señalización específicas inducidas y reguladas durante las interacciones hemibiotrofo-planta aún están en debate, se ha reportado una modulación bifásica entre SA y MeJA (van den Berg *et al.*, 2018).

En este tercer objetivo, el enfoque fue evaluar el impacto del tratamiento con fitohormonas frente a la infección de *P. capsici*, por medio de comparar la expresión relativa de los marcadores de defensa de la planta que se evaluaron previamente, y de marcadores específicos de fases infectivas del patógeno, con enfoque en el tratamiento con Jasmonato de Metilo 0.15 mM que había presentado activación de los mecanismos de defensa. En el tratamiento con BABA, a nivel fisiológico no se apreciaron efectos negativos para ninguno de los grupos analizados, a las diferentes concentraciones evaluadas el desarrollo de la enfermedad se presentó muy similar tanto a 24 horas de aclimatación como a 72 horas la progresión de los síntomas y los porcentajes de severidad se presentan muy similares entre los 6 grupos evaluados (Fig. 6). En otros estudios se ha visto que BABA confiere tolerancia a agentes patógenos tipo hemibiotrofos, con 5 mM de BABA en tomate y 2.5 mM en *Capsicum annum*, sin embargo, el método de inoculación fue por zoosporas (Stamler *et al.*, 2015; Kuźnicki *et al.*, 2019). Se ha reportado que en plantas de *Camellia lutchuensis* cuando son inoculadas con ascosporas del patógeno hemibiotrófico *Ciborinia camelliae* resultan resistentes (Kondratev *et al.*, 2020), sin embargo, ante una inoculación con micelio resultan susceptibles. Ante estas evidencias el método de inoculación puede estar influyendo en nuestros resultados.

En un primer evento biológico el tratamiento con MeJA 0.15 mM fue evaluado en diferentes tiempos postratamiento, infectado con *P. capsici* a 24 o a 72 horas post tratamiento; a nivel fisiológico el tratamiento de MeJA con 24 horas se pudo apreciar como el desarrollo de la enfermedad progresa de manera similar tanto en el tratamiento como en el control, aunque

siendo ligeramente más severa para este último. Para el tratamiento de aspersion e infección 72 hpt, la progresión de los síntomas de infección fue rápida, más para el tratamiento MeJA que para el tratamiento control (Fig. 7).

A pesar del antagonismo entre las vías de defensa de SA y MeJA, se sabe también que ambas comparten e intervienen en diversos procesos asociados a infecciones de tipo ante diversos patógenos, tanto biotróficos como necrotrofos, lo cual se ha visto en plantas modelo como *Arabidopsis* y en variedades resistentes como el SCM-334 (Ueeda *et al.*, 2005; Tamaoki *et al.*, 2013). Esta asociación entre las vías de señalización pudo ser un factor determinante para que a las 72 horas después de retirar el inoculo, el grupo tratado con MeJA (24 hpt) presentará menor evolución en su sintomatología que el grupo control, el cual presentó daños a nivel sistemático.

Otro aspecto importante que se evaluó fue la colecta de hoja a las 72 hpi para los tratamientos de aclimatación de 24 horas, con este corte se logró determinar si la infección había llegado a nivel sistémico en la planta a las horas colectadas, lo cual se corroboró con el progreso de la enfermedad de manera normal, algo interesante fue que para el tratamiento con MeJA, pasadas 72 horas posterior a la colecta de tejido, las plantas no presentaban el daño a nivel sistemático, la progresión de los síntomas aparentemente estaba detenida, a diferencia del tratamiento control donde las plantas continuaron con la evolución de la enfermedad, lo cual nos indica que a las 72 horas posteriores a la infección el tratamiento con MeJA puede retardar la aparición de los síntomas más severos, evitando que a las 72 horas el daño en planta llegue a un nivel sistemático, el cual si se presenta en la infección de manera normal.

Fue importante evaluar si este evento biológico se presentaba en reiteradas ocasiones, por tanto, se realizó un segundo evento biológico, en el cual se presentó un efecto positivo del tratamiento con MeJA 0.15 a 24 hrs de aclimatación, mientras que el efecto negativo de los tratamientos con 72 horas de aclimatación no fue tan marcado (Fig. 10). Además del efecto fisiológico, otro aspecto importante para tomar en cuenta está asociado a las vías de señalización compartidas entre los elicitores, como reportan Tamaoki y colaboradores en 2013, estas vías de señalización comparten la expresión de genes en común, debido a lo cual fue importante evaluar a nivel de genes la expresión relativa de diversos marcadores, de igual

manera se consideró importante evaluar si la expresión de estos genes tiene un efecto en el patógeno al momento de la infección, para lo cual se evalúan también marcadores de infección.

Los patógenos secretan numerosos efectores en las células vegetales para modular el sistema inmunitario de las plantas. Se ha reportado que los genes efectores de *P. capsici* se expresan diferencialmente durante las etapas de infección; algunos de ellos altamente expresados en la etapa tardía de la infección, hipotetizando su papel en la modulación del metabolismo de la planta en la fase necrotrófica (Jupe *et al.*, 2013). Se observó para genes marcadores de fases infectivas *HMP1*, *NPP1* y *CDC14*, un aumento en la expresión relativa, marcado principalmente en tratamientos de MeJA con infección, la expresión de estos genes se vio a lo largo de diferentes tiempos, a pesar de ser específicos de fases diferentes, principalmente se cree que esto se debe a la dificultad existente de evaluar lesiones que comprenden diferentes zonas de la planta, como indican en su estudio Schoina y colaboradores en 2017, existen desventajas debido a la presencia de diferentes zonas afectadas que se encuentran en fases diferentes de infección del patógeno (Schoina *et al.*, 2017).

Se observó un incremento en la expresión del gen relacionado con la fase biotrófica (*HMP1*) en el grupo de plantas tratadas con MeJA e inoculadas desde las 24 hpi hasta las 72 hpi indicando un mayor tiempo en la fase biotrófica sin embargo a las 48 hpi se observa un incremento en la expresión del gen *CDC14* en comparación a la simple infección indicando una entrada al ciclo necrotrófico. Las evidencias del efecto en la expresión de genes relacionados con la patogénesis ante un efecto en su ciclo de infección por parte de un inductor son nulas, sin embargo, se ha reportado la comparación de la expresión de los genes marcadores del ciclo infectivo de *Phytophthoras* de diferente especie. En dicho estudio se analizó a *Phytophthora betacei* y *Phytophthora infestans* en su hospedero tomate, los autores observaron que el ciclo de infección de *P. betacei* difiere del *P. infestans* en que el ciclo de infección del primero se caracteriza por una etapa biotrófica más prolongada, mayores lesiones y mayor capacidad de esporulación en comparación con *P. infestans* cuando se evaluó en el mismo anfitrión (Guayazán Palacios *et al.*, 2017). La expresión de *CDC14* Se mantiene con mayor magnitud en *P. betacei* correlacionando con mayor lesión en ese tiempo de la infección, por su parte en *P. infestans* hay un incremento moderado de *CDC14* con lesiones moderadas características de la

fase necrotrófica. Para complementar esta información, al evaluar la expresión de diversos genes de patogenicidad que codifican proteínas efectoras citoplasmáticas o apoplásticas (NLPS y RLXR) en una infección simple y una con pretratamiento con MeJA 0.15 mM, se observó se ejerce un efecto sobre la expresión de los marcadores del patógeno, en el caso de los efectores citoplasmáticos, que se presentan en etapas tempranas de la infección, se observó que para el tratamiento con MeJA la expresión vario en comparación con la infección simple, se presentó más prolongada en un caso, y en otro presentó menor magnitud, mientras que para el marcador de gen apoplástico RXLR se observó un aumento en la expresión del gen en la infección de la planta pretratada (Fig. 12). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Chen y *colaboradores* en 2018, donde establecen que estos NLPs tienen roles importantes en el establecimiento de la infección del patógeno, considerando también que suelen causar necrosis y estimular las respuestas de defensa en plantas. La expresión del gen RXLR25 del patógeno indica que se está suprimiendo la respuesta de defensa de la planta, con lo cual al verse su expresión en mayor magnitud en la planta pretratada con MeJA podría indicar que está contrarrestando la activación de la defensa como resultado del pretratamiento, este efector es clave en la virulencia de *P. capsici* debido a su capacidad de potenciar la susceptibilidad de plantas a este patógeno (Schoina *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2021).

Por último, se evaluaron los genes de defensa de la planta frente a la infección, comparando la expresión de genes en una infección simple con una infección en plantas pretratadas con MeJA 0.15 mM. Se observaron diferencias que indican un efecto del tratamiento sobre los mecanismos de defensa, y un efecto debido a la presencia del patógeno en la planta. La expresión de los diferentes genes evaluados presenta en la mayoría de los casos su punto más alto para el tratamiento con MeJA a las 24 hpt, esto se vio para los genes *NPR1*, *LOX2*, *AP2* y *WRKY40*. Estos resultados nos indican que la aplicación exógena de MeJA afecta la expresión de genes de defensa y se presenta acorde a lo que describen diversos autores, en el caso de *AP2* que se ha reportado que ejerce una función en plantas de Chile la respuesta de defensa ante *P. capsici*, *NPR1* y *PR1* que se conocen como un regulador en conjunto de diversas vías de señalización y un regulador de respuesta asociado a SA, *LOX2* como precursor de la síntesis de Jasmonatos y *WRKY40* como un factor importante en la respuesta de defensa de la planta ante patógenos debido a que interviene en mecanismos mediados por diversas fitohormonas; por

cada gen se han presentado resultados similares al realizar pretratamientos con elicitores, donde se ve afectada la expresión relativa por tratamiento y ante una infección (Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Dang *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2019; Barraza *et al.*, 2022). En los tratamientos con infección se presenta la expresión de efectores NLPs de *P. capsici*, se considera que los mecanismos de defensa previamente activados se vieron afectados por efecto del patógeno debido a que estos efectores ejercen funciones importantes para fomentar la infección (Li *et al.*, 2019), al ser capaces de intervenir en el correcto funcionamiento de los mecanismos de defensa del hospedero, y generar necrosis, dependiendo del patosistema; en estos casos la expresión de genes de defensa para los tratamientos con infección se vio reducida, no obstante comparando la infección simple con la infección en plantas pretratadas, la expresión relativa resulto mayor en aquellas que tuvieron pretratamiento con MeJA, a las 24 hpi, pasado el tiempo esta diferencia se reduce entre los diferentes tratamientos (Chen *et al.*, 2018).

En conjunto se pudo apreciar que en la interacción el patógeno expresa en mayor cantidad genes asociados a la infección cuando se enfrenta a una planta con defensas activadas por el pretratamiento con MeJA 0.15 mM, se observó que el pretratamiento activa los mecanismos de defensa, posiblemente generando que el patógeno reaccione en consecuencia, activándose en mayor medida la expresión de los efectores del patógeno que suprimen la defensa de la planta, esto puede indicar que existe un efecto desencadenado por el pretratamiento con MeJA 0.15 mM que no mitiga la enfermedad, pero retrasa ligeramente los síntomas, principalmente en etapas tempranas de la infección.

## 9. CONCLUSIONES

### 9.1 Conclusión sobre el objetivo particular 1

El método de inoculación con micelio resultó ser el más efectivo. Las diferentes variedades de *Capsicum* evaluadas resultaron con diferente grado de tolerancia a la cepa de *P. capsici* más patogénica. Uno de los puntos importantes es que se logró evaluar determinar el progreso de la enfermedad en diferentes variedades de *Capsicum spp.* con base en una escala de severidad, determinando a su vez entre 2 cepas patogénicas aquella que presentó mayor virulencia.

Se lograron determinar y evaluar los marcadores de fases infectivas del patógeno, así como su correlación con la presencia de diversos síntomas característicos de las diversas etapas del ciclo infectivo a diferentes tiempos, en las diferentes variedades de *Capsicum spp.* evaluadas, llegando a establecer para el caso de estudio diferentes puntos importantes, el tipo de inoculación, la cepa de patógeno a evaluar y la variedad de Chile que sirvió más para este propósito.

### 9.2 Conclusión sobre el objetivo particular 2

Para este punto se logró determinar, de un grupo de elicitores, aquellas concentraciones que permitieran al asperjar la planta previamente, activar las vías de señalización de defensa, por medio de la expresión de genes específicos, y sin que esta concentración de elicitores llegara a ser dañino para la planta, sobre todo en aquellos que se reportan requieren concentraciones mínimas para evitar abscisión de hojas, como es el caso de Etileno y Jasmonato de Metilo. Evaluando los elicitores MeJA, SA, ET, y BABA a diferentes concentraciones, estos tratamientos afectaron la expresión relativa de genes asociados a las vías de señalización de defensa, donde las concentraciones de 2.5 mM de SA, 1 mM de ET, 0.15 mM de MeJA y 2.5 mM de BABA presentaron los mayores efectos, sin producir un efecto a nivel fisiológico.

### 9.3 Conclusión sobre el objetivo particular 3

Si bien en una infección de fase biotrófica se requiere una modulación bifásica entre SA y MeJA, se observó que en *C. annuum* variedad ancho MeJA tiene mayor contribución en conferir tolerancia que SA en los tiempos tempranos de la infección. *P. capsici* tiene un grado de patogenicidad que es capaz de contrarrestar los mecanismos de defensa previamente inducidos en *C. annuum* logrando continuar con su ciclo infectivo.

En cuanto a la evaluación del efecto de los pretratamientos sobre la infección por *P. capsici*, para el caso de MeJA se logró determinar que existe un efecto asociado al pretratamiento con esta fitohormona, que genera un retraso en la aparición de los síntomas iniciales de la infección, llegando a afectar la expresión de genes de fases infectivas del patógeno, y a modular la expresión de los genes de defensa, de manera que amortigüe el impacto inicial causado por esta interacción, que a tiempos más tardíos estos efectos iniciales terminan desapareciendo, derivando en el progreso de la infección hasta la etapa más severa, este primer acercamiento puede dar la pauta para evaluar diferentes combinaciones y concentraciones de elicitores.

Por último, en general se logró determinar que se genera un efecto sobre la expresión de genes de defensa en plantas de *Capsicum annuum* Ancho pretratadas con fitohormonas, donde en el tratamiento con MeJA a una concentración de 0.15 mM esta activación de la defensa tiene un impacto en la tolerancia a la infección por *Phytophthora capsici* Oaxaca en tiempos tempranos, retrasando ligeramente la aparición de los primeros síntomas, y teniendo un efecto en la expresión de genes de infección del patógeno.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aguilar-Melendez, A., Morrell, P.L., Roose, M.L. y Kim, S.C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from México. *American Journal of Botany*, 96(6): 1190-1202. doi: 10.3732/ajb.0800155.
- Andrés Ares, J.L., Rivera Martínez, A. y Fernández Paz, J. (2005). Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3(4): 429. doi: 10.5424/sjar/2005034-170.
- Arévalo-Marín, D.F., Briceño-Robles, D.M., Mosquera, T., Melgarejo, L.M. y Sarmiento, F. (2021). Jasmonic acid priming of potato uses hypersensitive response-dependent defense and delays necrotrophic phase change against *Phytophthora infestans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115: 101680. doi: 10.1016/j.pmpp.2021.101680.
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H. y Goldman, M.H.S. (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research*, 9(1): 484-505. doi: 10.4238/vol9-1gmr754.
- Babadoost, M., Pavon, C., Islam, S.Z. y Tian, D. (2015). *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*) of pepper and its management. *Acta Horticulturae*, 1105(1105): 61-66. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1105.9.
- Barchenger, D.W., Lamour, K.H. y Bosland, P.W. (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 9(628). doi: 10.3389/fpls.2018.00628.
- Bari, R. y Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*, 69(4): 473-488. doi: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- Barra-Bucarei, L. y Ortiz, J. (2020). Biological Control in *Capsicum* with Microbial Agents. En: *Capsicum IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.93509.
- Barraza, A., Núñez-Pastrana, R., Loera-Muro, A., Castellanos, T., Aguilar-Martínez, C.J., Sánchez-Sotelo, I.S. y Caamal-Chan, M.G. (2022). Elicitor induced JA-signaling genes are associated with partial tolerance to hemibiotrophic pathogen *Phytophthora capsici* in *Capsicum chinense*. *Agronomy*, 12(1637): 1-14. doi: 10.3390/agronomy12071637.
- Barrett, L.G., Kniskern, J.M., Bodenhausen, N., Zhang, W. y Bergelson, J. (2009). Continua of specificity and virulence in plant host-pathogen interactions: causes and consequences. *New Phytologist*, 183(3): 513-529. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02927.x.
- Baysal, O., Turgut, C. y Mao, G. (2005). Acibenzolar-S-methyl induced resistance to *Phytophthora capsici* in pepper leaves. *Biologia plantarum*, 49(4): 599-604. doi: 10.1007/s10535-005-0055-0.
- Bektas, Y. y Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Frontiers in Plant Science*, 5(804). doi: 10.3389/fpls.2014.00804.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Pöschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D. y Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19): 8067-8072. doi: 10.1073/pnas.0810206106.
- Borges Gómez, L., Cervantes Cárdenas, L., Ruiz Novelo, J., Soria Fregoso, M., Reyes Oregel, V. y Villanueva-Cohuo, E. (2010). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra latinoamericana*,

- 28(1): 35-41. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792010000100004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792010000100004).
- Camarena, G. y de la Torre, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Chapingo Serie ciencias forestales y del ambiente*, 13(2): 157-162. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-40182007000200157](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-40182007000200157).
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B. y Meyerowitz, E.M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262(5133): 539-544. doi: 10.1126/science.8211181.
- Chávez-Díaz, I.F. y Zavaleta-Mejía, E. (2019). Comunicación molecular en el patosistema *Capsicum* spp. -*Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2): 252-278. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1901-3.
- Chen, X.R., Huang, S.X., Zhang, Y., Sheng, G.L., Li, Y.P. y Zhu, F. (2018). Identification and functional analysis of the NLP-encoding genes from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora capsici*. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(4): 931-943. doi: 10.1007/s00438-018-1432-7.
- Chowdhury, S., Basu, A. y Kundu, S. (2017). Biotrophy-necrotrophy switch in pathogen evoke differential response in resistant and susceptible sesame involving multiple signaling pathways at different phases. *Scientific Reports*, 7(1): 17251. doi: 10.1038/s41598-017-17248-7.
- Cline, E.T., Farr, D.F. y Rossman, A.Y. (2008). A Synopsis of *Phytophthora* with accurate scientific names, host range, and geographic distribution. *Plant Health Progress*, 9(1). doi: 10.1094/PHP-2008-0318-01-RV.
- Coles, D.W., Bithell, S.L., Mikhael, M., Cuddy, W.S. y Plett, J.M. (2022). Chickpea roots undergoing colonisation by *Phytophthora medicaginis* exhibit opposing jasmonic acid and salicylic acid accumulation and signalling profiles to leaf hemibiotrophic models. *Microorganisms*, 10(2): 343. doi: 10.3390/microorganisms10020343.
- Dang, F.F., Wang, Y.N., Yu, L., Eulgem, T., Lai, Y., Liu, Z.Q., Wang, X., Qiu, A.L., Zhang, T.X., Lin, J., Chen, Y.S., Guan, D.Y., Cai, H.Y., Mou, S.L. y He, S.L. (2013). CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant, Cell & Environment*, 36(4): 757-774. doi: 10.1111/pce.12011.
- Díaz-Puentes, L.N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2): 257-267. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612012000200030](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200030).
- Fan, G., Yang, Y., Li, T., Lu, W., Du, Y., Qiang, X., Wen, Q. y Shan, W. (2018). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits a plant PPlase to suppress endoplasmic reticulum-mediated immunity. *Molecular Plant*, 11(8): 1067-1083. doi: 10.1016/j.molp.2018.05.009.
- Fawke, S., Doumane, M. y Schornack, S. (2015). Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3): 263-280. doi: 10.1128/MMBR.00010-15.

- Fernández Pavía, A., Patricia, S., Waugh, O. y Alvarado, R. (2004). Characterization of southern New México *Phytophthora capsici* Leonian isolates from pepper. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(1): 82-89. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222111>.
- Floryszak-Wieczorek, J., Arasimowicz-Jelonek, M. y Abramowski, D. (2015). BABA-primed defense responses to *Phytophthora infestans* in the next vegetative progeny of potato. *Frontiers in Plant Science*, 6(844). doi: 10.3389/fpls.2015.00844.
- Foster, J.M. y Hausbeck, M.K. (2010). Resistance of pepper to *Phytophthora* crown, root, and fruit rot is affected by isolate virulence. *Plant Disease*, 94(1): 24-30. doi: 10.1094/PDIS-94-1-0024.
- García, F. (1908). Chile culture. *New México College of Agriculture and Mechanic Arts, Bulletin No. 67*.
- Gevens, A.J., Ando, K., Lamour, K.H., Grumet, R. y Hausbeck, M.K. (2006). A detached cucumber fruit method to screen for resistance to *Phytophthora capsici* and effect of fruit age on susceptibility to infection. *Plant Disease*, 90(10): 1276-1282. doi: 10.1094/PD-90-1276.
- Gevens, A.J., Donahoo, R.S., Lamour, K.H. y Hausbeck, M.K. (2008). Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. *Plant Disease*, 92(2): 201-209. doi: 10.1094/PDIS-92-2-0201.
- Ghoohestani, A., Gheisary, H., Morteza, Z.S. y Dolatkahi, A. (2012). Effect of seed priming of tomato with salicylic acid, ascorbic acid and hydrogen peroxide on germination and plantlet growth in saline conditions. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, Vol. 3 (S): 700-704. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/286390558>.
- Granke, L.L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K. y Hausbeck, M.K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease*, 96(11): 1588-1600. doi: 10.1094/PDIS-02-12-0211-FE.
- Guayazán Palacios, N., Gogleva, A., Schornack, S. y Restrepo, S. (2017). Characterization of the infection cycle of *Phytophthora betacei* during disease development on tree tomato (*Solanum betaceum*). *Universidad de los Andes, Departamento de Ciencias Biológicas*. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1992/34212>.
- Halim, V.A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D. y Rosahl, S. (2007). Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(11): 1346-1352. doi: 10.1094/MPMI-20-11-1346.
- Halim, V.A., Vess, A., Scheel, D. y Rosahl, S. (2006). The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biology*, 8(3): 307-313. doi: 10.1055/s-2006-924025.
- Hammerschmidt, R. y Schultz, J.C. (1996). Multiple defenses and signals in plant defense against pathogens and herbivores. En: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Springer US, Boston, MA, pp 121-154. doi: 10.1007/978-1-4899-1754-6\_5.
- Hausbeck, M.K. y Lamour, K.H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease*, 88(12): 1292-1303. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.12.1292.

- Jafarbeigi, F., Samih, M.A., Alaei, H. y Shirani, H. (2020). Induced tomato resistance against *Bemisia tabaci* triggered by salicylic acid,  $\beta$ -aminobutyric acid, and *Trichoderma*. *Neotropical Entomology*, 49(3): 456-467. doi: 10.1007/s13744-020-00771-0.
- Jiang, R.H.Y. y Tyler, B.M. (2012). Mechanisms and Evolution of virulence in oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1): 295-318. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-172912.
- Jin, J.H., Zhang, H.X., Ali, M., Wei, A.M., Luo, D.X. y Gong, Z.H. (2019). The CaAP2/ERF064 regulates dual functions in pepper: plant cell death and resistance to *Phytophthora capsici*. *Genes*, 10(7): 541. doi: 10.3390/genes10070541.
- Judelson, H.S. y Ah-Fong, A.M.V. (2019). Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. *Plant Physiology*, 179(4): 1198-1211. doi: 10.1104/pp.18.00979.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A.J., Morris, J.A., Zhang, R., Hedley, P.E. y Huitema, E. (2013). *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*, 14(6): R63. doi: 10.1186/gb-2013-14-6-r63.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D.G., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J.D., Roy, S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B.M., Grünwald, N.J., Mukhtar, M.S., Tomé, D.F.A., Tör, M., Van Den Ackerveken, G., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W.E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H.J.G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P.R.J. y Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4): 413-434. doi: 10.1111/mpp.12190.
- Kang, W.H., Nam, J.Y., Kwon, J.S. y Yeom, S.I. (2022). Differential responses of *Capsicum* accessions to foliar blight and root rot by *Phytophthora capsici*. *Horticultural Science and Technology*, 40(1): 85-93. doi: 10.7235/HORT.20220009.
- Kenneth Madriz Ordeñana. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Manejo Integrado de Plagas*, 63: 22-32. Disponible en: <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/6562>.
- Kondratev, N., Denton-Giles, M., Bradshaw, R.E., Cox, M.P. y Dijkwel, P.P. (2020). *Camellia* plant resistance and susceptibility to petal blight disease are defined by the timing of defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 33(7): 982-995. doi: 10.1094/MPMI-10-19-0304-R.
- Ku, Y.S., Sintaha, M., Cheung, M.Y. y Lam, H.M. (2018). Plant hormone signaling crosstalks between biotic and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10): 3206. doi: 10.3390/ijms19103206.
- Kuźnicki, D., Meller, B., Arasimowicz-Jelonek, M., Braszewska-Zalewska, A., Drozda, A. y Floryszak-Wieczorek, J. (2019). BABA-induced DNA methylome adjustment to intergenerational defense priming in potato to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 10. doi: 10.3389/fpls.2019.00650.
- Lamb, C.J., Ryals, J.A., Ward, E.R. y Dixon, R.A. (1992). Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Nature Biotechnology*, 10(11): 1436-1445. doi: 10.1038/nbt1192-1436.
- Lamour, K.H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O.P., Schmutz, J., Kuo, A., Miller, N.A., Rice, B.J., Raffaele, S., Cano, L.M., Bharti, A.K., Donahoo, R.S., Finley, S., Huitema, E., Hulvey, J., Platt, D., Salamov, A., Savidor, A., Sharma, R., Stam, R., Storey, D., Thines,

- M., Win, J., Haas, B.J., Dinwiddie, D.L., Jenkins, J., Knight, J.R., Affourtit, J.P., Han, C.S., Chertkov, O., Lindquist, E.A., Detter, C., Grigoriev, I.V., Kamoun, S. y Kingsmore, S.F. (2012a). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*<sup>®</sup>, 25(10): 1350-1360. doi: 10.1094/MPMI-02-12-0028-R.
- Lamour, K.H., Stam, R., Jupe, J. y Huitema, E. (2012b). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4): 329-337. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P.J.G.M. y Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*, 11(10): 462-469. doi: 10.1016/j.tim.2003.08.002.
- Lee, S.J. y Rose, J.K.C. (2010). Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6): 769-772. doi: 10.4161/psb.5.6.11778.
- Leonian, L.H. (1922). Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, 12: 401-408.
- Li, C., Cao, S., Wang, K., Lei, C., Ji, N., Xu, F., Jiang, Y., Qiu, L. y Zheng, Y. (2021). Heat shock protein HSP24 is involved in the BABA-induced resistance to fungal pathogen in postharvest grapes underlying an NPR1-dependent manner. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi: 10.3389/fpls.2021.646147.
- Li, C., Xu, M., Cai, X., Han, Z., Si, J. y Chen, D. (2022). Jasmonate signaling pathway modulates plant defense, growth, and their trade-offs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7): 3945. doi: 10.3390/ijms23073945.
- Li, Q., Chen, Y., Wang, J., Zou, F., Jia, Y., Shen, D., Zhang, Q., Jing, M., Dou, D. y Zhang, M. (2019). A *Phytophthora capsici* virulence effector associates with NPR1 and suppresses plant immune responses. *Phytopathology Research*, 1(1): 6. doi: 10.1186/s42483-019-0013-y.
- Li, Y., Yu, T., Wu, T., Wang, R., Wang, H., Du, H., Xu, X., Xie, D. y Xu, X. (2020). The dynamic transcriptome of pepper (*Capsicum annuum*) whole roots reveals an important role for the phenylpropanoid biosynthesis pathway in root resistance to *Phytophthora capsici*. *Gene*, 728: 144288. doi: 10.1016/j.gene.2019.144288.
- Liang, X., Bao, Y., Zhang, M., Du, D., Rao, S., Li, Y., Wang, X., Xu, G., Zhou, Z., Shen, D., Chang, Q., Duan, W., Ai, G., Lu, J., Zhou, J. y Dou, D. (2021). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits the central immune kinases to suppress plant immunity. *New Phytologist*, 232(1): 264-278. doi: 10.1111/nph.17573.
- Macías Rodríguez, H., Muñoz Villalobos, J.A., Velásquez Valle, M.A., Potisek Talavera, M. del C. y Villa Castorena, M.M. (2013). Chile habanero: descripción de su cultivo en la península de Yucatán. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, XII (2): 37-43. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=455545057001>.
- Mandal, S., Kar, I., Mukherjee, A.K. y Acharya, P. (2013). Elicitor-induced defense responses in *Solanum lycopersicum* against *Ralstonia solanacearum*. *The Scientific World Journal*, 2013: 1-9. doi: 10.1155/2013/561056.
- Mishra, R., Nanda, S., Rout, E., Chand, S.K., Mohanty, J.N. y Joshi, R.K. (2017). Differential expression of defense-related genes in chilli pepper infected with anthracnose pathogen

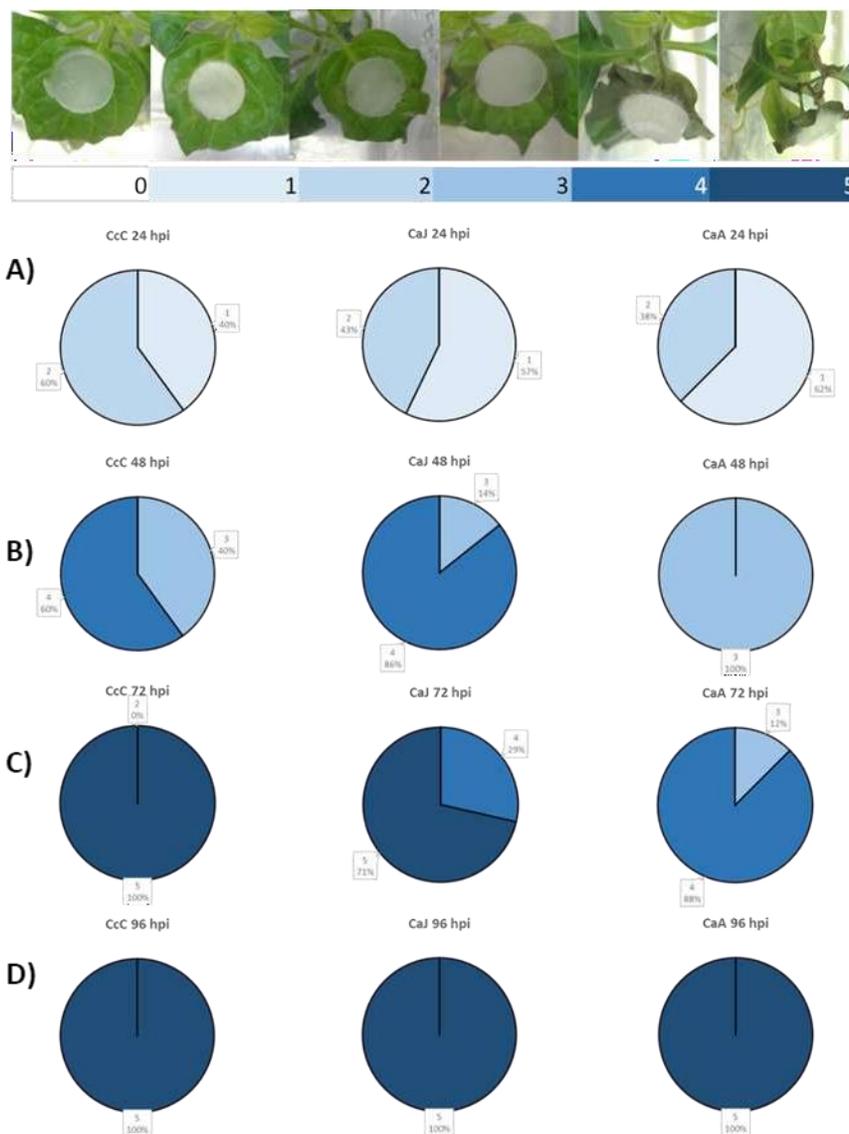
- Colletotrichum truncatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 97: 1-10. doi: 10.1016/j.pmpp.2016.11.001.
- Monroy-Barbosa, A. y Bosland, P.W. (2010). A rapid technique for multiple-race disease screening of *Phytophthora* foliar blight on single *Capsicum annuum* L. plants. *HortScience*, 45(10): 1563-1566. doi: 10.21273/HORTSCI.45.10.1563.
- Morán-Bañuelos, S.H., Aguilar-Rincón, V.H., Corona-Torres, T. y Zavaleta-Mejía, E. (2010). Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 33(SPE4): 21-26. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802010000500006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000500006).
- Nieto-Garibay, A., Barraza, A., Caamal-Chan, G., Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., Burgoa-Cruz, C.A., Jaramillo-Limón, J.N. y Loera-Muro, A. (2022). Habanero pepper (*Capsicum chinense*) adaptation to water-deficit stress in a protected agricultural system. *Functional Plant Biology*, 49(3): 295-306. doi: 10.1071/FP20394.
- Núñez-Pastrana, R., Arcos-Ortega, G.F., Souza-Perera, R.A., Sánchez-Borges, C.A., Nakazawa-Ueji, Y.E., García-Villalobos, F.J., Guzmán-Antonio, A.A. y Zúñiga-Aguilar, J.J. (2011). Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131(4): 669-683. doi: 10.1007/s10658-011-9841-z.
- Oelke, L.M., Bosland, P.W. y 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. doi: 10.21273/JASHS.128.2.0213.
- Parisi, M., Alioto, D. y Tripodi, P. (2020). Overview of biotic stresses in pepper (*Capsicum* spp.): sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7): 2587. doi: 10.3390/ijms21072587.
- Park, J.M., Park, C.J., Lee, S.B., Ham, B.K., Shin, R. y Paek, K.H. (2001). Overexpression of the Tobacco *Tsi1* Gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *The Plant Cell*, 13(5): 1035-1046. doi: 10.1105/tpc.13.5.1035.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J. y Memelink, J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*, 147(3): 1347-1357. doi: 10.1104/pp.108.117523.
- Reyes-Tena, A., Castro-Rocha, A., Rodríguez-Alvarado, G., Vázquez-Marrufo, G., Pedraza-Santos, M.E., Lamour, K., Larsen, J. y Fernández-Pavía, S.P. (2019). Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, México. *HortScience*, 54(9): 1526-1531. doi: 10.21273/HORTSCI13964-19.
- Ruan, J., Zhou, Y., Zhou, M., Yan, J., Khurshid, M., Weng, W., Cheng, J. y Zhang, K. (2019). Jasmonic acid signaling pathway in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). doi: 10.3390/ijms20102479.
- Ruiz Lau, N., Medina Lara, F. y Martínez Estévez, M. (2011). El chile habanero su origen y usos. *Ciencia Academia Mexicana de Ciencias*, 62(3): 70-78. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-academia-mexicana-de-ciencias/articulo/el-chile-habanero-su-origen-y-usos>.

- Sacristán, S., Goss, E.M. y Eves-Van den Akker, S. (2021). How do pathogens evolve novel virulence activities? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(6): 576-586. doi: 10.1094/MPMI-09-20-0258-IA.
- Saltos, L.A., Corozo-Quiñones, L., Pacheco-Coello, R., Santos-Ordóñez, E., Monteros-Altamirano, Á. y Garcés-Fiallos, F.R. (2021). Tissue specific colonization of *Phytophthora capsici* in *Capsicum* spp.: molecular insights over plant-pathogen interaction. *Phytoparasitica*, 49(1): 113-122. doi: 10.1007/s12600-020-00864-x.
- Samaniego-Gámez, B.Y., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O.A. y Tun-Suárez, J.M. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus* spp. *Revista de Protección Vegetal*, 32(1): 10-22. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522017000100002&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522017000100002&script=sci_arttext&tlng=pt).
- Sánchez-Gurrola, C., Gómez-Dorantes, N., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S.P. y Ávila-Quezada, G. (2019). Variabilidad morfológica y sensibilidad de *Phytophthora capsici* causando marchitez en chile pimiento morrón en Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1). doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-4.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Andreu, L.G., del C. Montalvo-Peniche, M., López-Puc, G. y Barahona-Pérez, F. (2006). Improvement of in vitro culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2): 405-409. doi: 10.21273/HORTSCI.41.2.405.
- Schoina, C., Bouwmeester, K. y Govers, F. (2017). Infection of a tomato cell culture by *Phytophthora infestans*; a versatile tool to study *Phytophthora*-host interactions. *Plant Methods*, 13(1): 88. doi: 10.1186/s13007-017-0240-0.
- Silvar, C., Díaz, J. y Merino, F. (2005a). Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology*®, 95(12): 1423-1429. doi: 10.1094/PHYTO-95-1423.
- Silvar, C., Duncan, J.M., Cooke, D.E.L., Williams, N.A., Díaz, J. y Merino, F. (2005b). Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology*, 112(1): 43-52. doi: 10.1007/s10658-004-8232-0.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S. y Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47): 18842-18847. doi: 10.1073/pnas.0708139104.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. y Pieterse, C.M.J. (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. doi: 10.1105/tpc.009159.
- Stamler, R.A., Holguin, O., Dungan, B., Schaub, T., Sanogo, S., Goldberg, N. y Randall, J.J. (2015). BABA and *Phytophthora nicotianae* induce resistance to *Phytophthora capsici* in chile pepper (*Capsicum annuum*). *Plos one*, 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0128327.
- Tamaoki, D., Seo, S., Yamada, S., Kano, A., Miyamoto, A., Shishido, H., Miyoshi, S., Taniguchi, S., Akimitsu, K. y Gomi, K. (2013). Jasmonic acid and salicylic acid activate a

- common defense system in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6): e24260. doi: 10.4161/psb.24260.
- Tan, X., Fan, Z., Shan, W., Yin, X., Kuang, J., Lu, W. y Chen, J. (2018). Association of BrERF72 with methyl jasmonate-induced leaf senescence of Chinese flowering cabbage through activating JA biosynthesis-related genes. *Horticulture Research*, 5(1): 22. doi: 10.1038/s41438-018-0028-z.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. y Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, 15(2): 317-330. doi: 10.1105/tpc.007591.
- Thaler, J.S., Owen, B. y Higgins, V.J. (2004). The role of the jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiology*, 135(1): 530-538. doi: 10.1104/pp.104.041566.
- Tian, D. y Babadoost, M. (2004). Host range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant Disease*, 88(5): 485-489. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.5.485.
- Trujillo-Viramontes, E., Zavaleta-Mejía, E., Lara Reyna, J. y Lara, J. (2005). Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en chile (*Capsicum annum*). *Nematropica*, 35 No. 1: 37-44. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/262936382>.
- Ueeda, M., Kubota, M. y Nishi, K. (2005). Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5): 149-154. doi: 10.1016/j.pmpp.2005.12.002.
- Urquía-Fernández Robles, N. (2013). La seguridad alimentaria en México. *Salud Pública de México*, 56(SUPPL.1): 92. doi: 10.21149/spm.v56s1.5171.
- Van den Berg, N., Mahomed, W., Olivier, N.A., Swart, V. y Crampton, B.G. (2018). Transcriptome analysis of an incompatible *Persea americana-Phytophthora cinnamomi* interaction reveals the involvement of SA- and JA-pathways in a successful defense response. *Plos one*, 13(10): 1-23. doi: 10.1371/journal.pone.0205705.
- Van Loon, L.C., Rep, M. y Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1): 135-162. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.
- Venegas-Molina, J., Proietti, S., Pollier, J., Orozco-Freire, W., Ramirez-Villacis, D. y Leon-Reyes, A. (2020). Induced tolerance to abiotic and biotic stresses of broccoli and *Arabidopsis* after treatment with elicitor molecules. *Scientific Reports*, 10(1): 10319. doi: 10.1038/s41598-020-67074-7.
- Villota Ceron, D., Bonilla Betancourt, M.L., Carrillo Carmen, H., Jaramillo Vásquez, J. y García Dávila, M.A. (2012). Caracterización morfológica de introducciones de *Capsicum* spp. existentes en el banco de germoplasma activo de Corpoica C.I. Palmira, Colombia. *Acta Agronómica*, 61(1): 16-26. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28122012000100003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122012000100003).
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R.G., Pandey, M. y Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and

- abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, 8(161): 1-12. doi: 10.3389/fpls.2017.00161.
- Wiesel, L., Davis, J.L., Milne, L., Redondo Fernandez, V., Herold, M.B., Middlefell Williams, J., Morris, J., Hedley, P.E., Harrower, B., Newton, A.C., Birch, P.R.J., Gilroy, E.M. y Hein, I. (2015). A transcriptional reference map of defence hormone responses in potato. *Scientific Reports*, 5(1): 15229. doi: 10.1038/srep15229.
- Zhang, H., Huang, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Zhang, H., Lu, X., Huang, D. y Huang, R. (2004). The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta*, 220(2): 262-270. doi: 10.1007/s00425-004-1347-x.
- Zoghbi-Rodríguez, N. y Teresa Hernández-Sotomayor, Y.S.M. (2019). Oomicetos: amenaza sin control para la agricultura y para todos. *Desde el Herbario CICY*, 11: 185-189. Disponible en: [https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde\\_Herbario/2019/2019-09-19-Zoghbi-Rodriguez-Hernandez-Sotomayor-Oomicetos.pdf](https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2019/2019-09-19-Zoghbi-Rodriguez-Hernandez-Sotomayor-Oomicetos.pdf).
- Zuluaga, A.P., Vega-Arreguín, J.C., Fei, Z., Matas, A.J., Patev, S., Fry, W.E. y Rose, J.K.C. (2016). Analysis of the tomato leaf transcriptome during successive hemibiotrophic stages of a compatible interaction with the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 17(1): 42-54. doi: 10.1111/mpp.12260.

## 11. ANEXOS



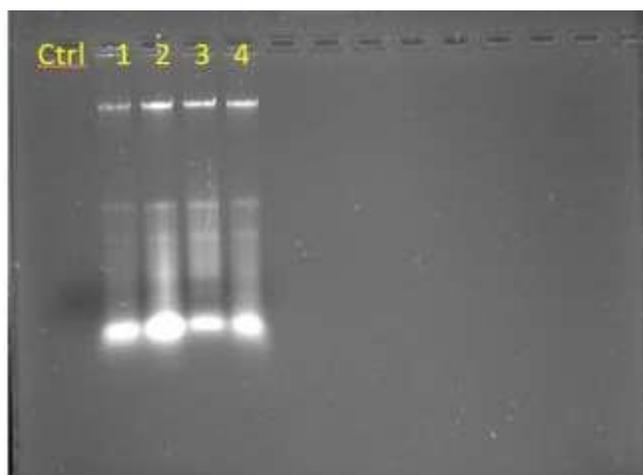
**Figura 14.** Índice de Severidad de la enfermedad para variedades *Capsicum chinense* Chiapas (CcC), *Capsicum annuum* Jalapeño (CaJ) y *Capsicum annuum* Ancho (CaA) a las A) 24 hpi, B) 48 hpi, C) 72 hpi y D) 96 hpi.

### Anexo A: Análisis de patogenicidad a nivel molecular (valuación de los oligonucleótidos de *P. capsici*)

Para esta sección se logró obtener un ADN genómico de buena integridad de micelio de *P. capsici* obtenido de un cultivo de medio V8 líquido con valores de calidad correspondientes a una buena muestra (Tabla 17; Fig. 15).

**Tabla 17.** Cuantificación de ADN genómico extraído de cuatro muestras de *P. capsici* Oaxaca.

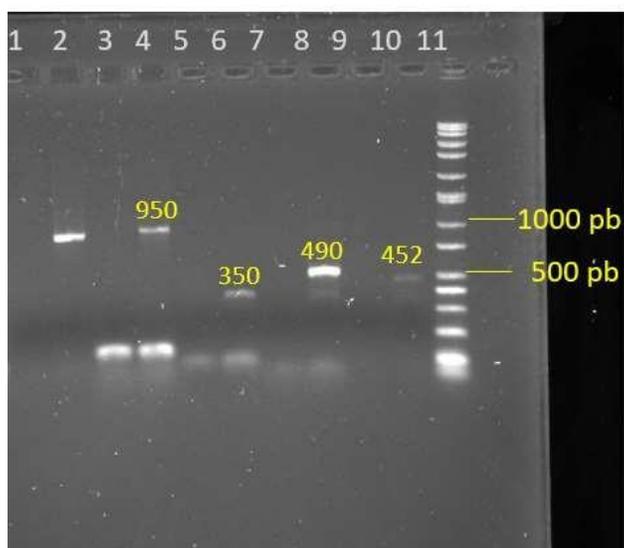
Cuantificación	Concentración (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230
Muestra 1	170.8	2.01	2.38
Muestra 2	655.4	2.09	2.41
Muestra 3	182.3	2.07	2.7
Muestra 4	235.0	2.06	2.67



**Figura 15. Electroforesis en gel de Agarosa 1%.** 3 microlitros del extracto de ADN genómico de las muestras. Carril 1.- Muestra control con agua. Carril 2.- Templado muestra 1. Carril 3.- Templado muestra 2, Carril 4.- Templado muestra 3, Carril 5.- Templado muestra 4.

El ADN genómico de *P. capsici* fue empleado como plantilla para evaluar los oligonucleótidos que amplifican los genes asociados al ciclo infeccioso de *Phytophthora capsici* seleccionados basados en reportes previos (*PcHmp1*, *PcNPP1*, *PcCDC14*). Como resultados observamos que en el fraccionamiento por electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa los fragmentos característicos a los productos correspondientes, de los tamaños en pares de bases (Pb) correspondientes (*PcHmp1*.- 950 pb, *PcNPP1*.- 350 pb, *PcCDC14*.- 490), también se evaluaron los oligonucleótidos del gen de la tubulina de *P. capsici* (*Pc tubulina*. - 950). Adicionalmente se evaluaron los oligonucleótidos de *CAP* (452 pb) que se emplean para la cuantificación de ADN del patógeno (Fig. 16).

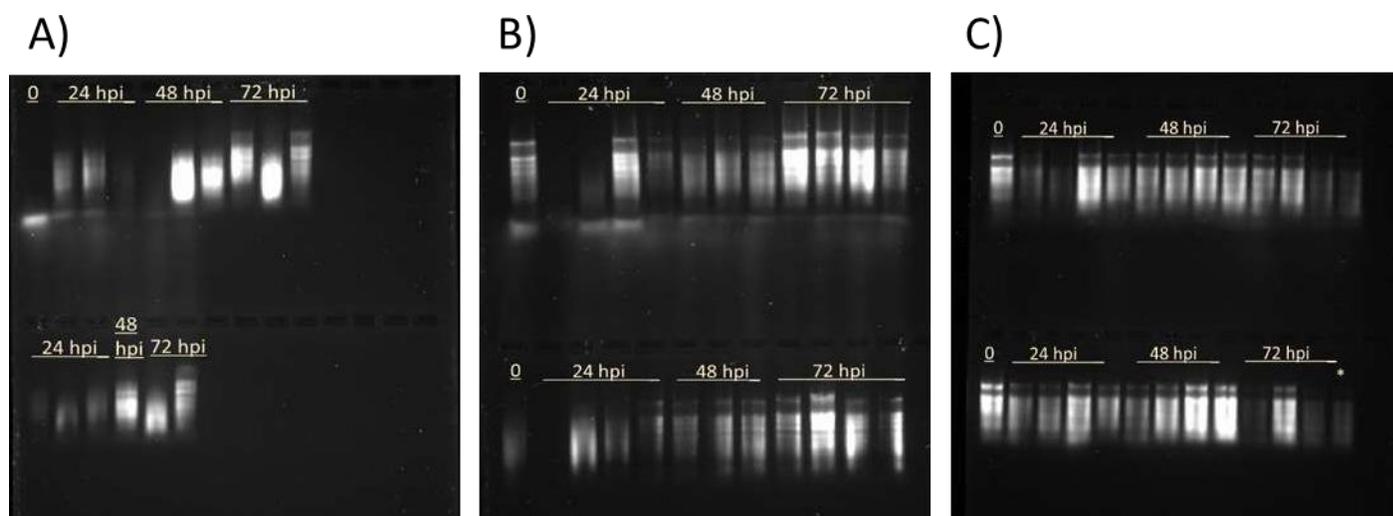
Se determinó que no hay formación de dímeros, indicando que el diseño y funcionamiento de los primers es el adecuado, esto es importante dado que estos primers nos permitirán detectar y determinar la fase infectiva activa en la interacción de *P. capsici* con *Capsicum* a los diferentes tiempos y cuantificar por qPCR la presencia del patógeno.



**Figura 16. Análisis de oligonucleótidos de *P. capsici*.** - 3 Microlitros de producto de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Carril 1.- control sin plantilla de ADN Carril 2.-Producto de PCR del gen *PcTubulina*, Carril 3.- Control sin plantilla de ADN, Carril 4.- Producto de PCR del gen *PcHmp1*, Carril 5.- Control sin plantilla de ADN, Carril 6.- Producto de PCR del gen *PcNPP1*, Carril 7.- Control sin plantilla de ADN, Carril 8.- Producto de PCR del gen *PcCDC14*, Carril 9.- Control sin plantilla de ADN, Carril 10.- Producto de PCR del gen *CAP*, Carril 11.- Marcador de 1 Kb de la casa comercial sigma.

## Anexo B: Análisis de fases infectivas en *Capsicum annuum* Jalapeño y Ancho

La extracción de ARN de las muestras de chile infectadas con *P. capsici* (Fig. 17) fue el prelude para poder determinar los marcadores de fases infectivas del patógeno a los diferentes tiempos posteriores a la infección, por este medio se podrá determinar en qué etapa de la infección se encuentra el patógeno para las diferentes variedades de chile evaluadas.



**Figura 17. Electroforesis RNA muestras de Chile infectadas con micelio de *P. capsici*. A) *Capsicum chinense* Chiapas, 24, 48 y 72 hpi, B) *Capsicum annuum* Jalapeño 24, 48 y 72 hpi, C) *Capsicum annuum* Ancho 24, 48 y 72 hpi.**

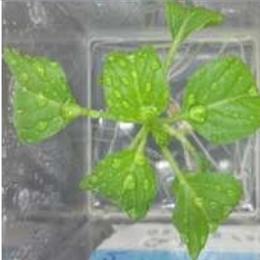
**Anexo C: Análisis del efecto a nivel macroscópico de tratamientos con BABA, ET y SA****Tabla 18.** Efecto fisiológico de tratamiento con BABA a concentraciones de 2.5 y 5 mM sobre *C. annuum* Ancho a las 24, 48 y 72 hpt.

<i>C. annuum</i> Ancho	24 hpt	48 hpt	72 hpt
CTRL			
BABA 2.5 mM			
BABA 5 mM			

**Tabla 19.** Efecto fisiológico del tratamiento con Etileno a concentraciones 0.1, 1 y 2.5 mM sobre *C. annuum* Ancho a las 24, 48 y 72 hpt.

<i>C. annuum</i> Ancho	24 hpt	48 hpt	72 hpt
CONTROL			
ETILENO 0.1 mM			
ETILENO 1 mM			
ETILENO 2.5 mM			

**Tabla 20.** Efecto fisiológico del tratamiento con Ácido salicílico a concentraciones 0.1, 1 y 2.5 mM sobre *C. annuum* Ancho a las 24, 48 y 72 hpt.

<i>C. annuum</i> Ancho	24 hpt	48 hpt
CONTROL		
SALICILICO 5 mM		
SALICILICO 2.5 mM		
SALICILICO 1 mM		