



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA A
LA INFECCIÓN DE *Pythium ultimum* EN SUSPENSIONES
CELULARES DE *Capsicum chinense* Jacq.**

Tesis que presenta

Yahaira Aracely Cab Guillén

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Enero, 2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Yahaira Aracely Cab Guillén titulado “**PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN DE *Pythium ultimum* EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Capsicum chinense* Jacq.**” fue realizado en el laboratorio 10 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, enero de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____

IBQ. Yahaira Aracely Cab Guillén

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Cambios metabólicos y el sistema de transducción de señales asociados a la interacción de *Capsicum chinense* con *Pythium sp.*” (Fronteras de la Ciencia, proyecto 35) bajo la dirección de la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca N°619265 otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

Al proyecto otorgado a SMTHS, Fronteras de la ciencia (035/2015).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), por el uso de las instalaciones para realizar este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por aceptarme en sus instalaciones para realizar una estancia de investigación.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por aceptarme como parte de su grupo de investigación y por toda su confianza.

Al comité tutorial conformado por los doctores Teresa Hernández Sotomayor, Julissa Ek Ramos e Ignacio Islas Flores, por sus aportaciones al trabajo, sus consejos y sugerencias, para desarrollar un buen trabajo de investigación.

De manera muy especial al M. en C. Armando Muñoz Sanchez, por su dedicación, sus consejos y apoyo técnico, para concluir con éxito la Maestría.

A la IQ. Silvia Andrade Canto por sus consejos y apoyo técnico en el uso del microscopio.

A la maestra Ángela Kú, por su apoyo en el uso del microscopio de epifluorescencia.

Al maestro Roberto Pech Kú y a los doctores Eugenia Sánchez Sandoval y Víctor Gonzáles Mendoza, por su apoyo técnico en el uso de las herramientas de biología molecular.

A mis compañeros del laboratorio 10 de la UBBMP: Cristina, Laura; Normig, Ibis, Roberto, Julieta, Jacqueline, por todas sus observaciones, críticas sobre el trabajo de investigación y su apoyo para concluir esta etapa.

A mis amigos que siempre estuvieron en todas las etapas de este proyecto y por ser parte importante de mi vida, Rosa, Salatiel y Sara.

A la Dra. Ana Luisa Ramos por proporcionarnos la cepa de *Pythium ultimum* (P233.08)

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mi familia, especialmente a mi esposo Carlos y a mi pequeño hijo Álvaro, por todo su apoyo, comprensión y paciencia durante el transcurso de esta etapa de mi vida profesional.

A mis padres, que siempre han estado en todo momento para apoyarme.

A mis suegros Sara y Filiberto, que en todo este tiempo me han apoyado y cuidado de mi familia.

A cada uno de mis familiares, tíos, primos, sobrinos, etc. que de alguna u otra manera me han alentado y apoyado en todo momento.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CAPÍTULO I	2
1.1 ANTECEDENTES.....	2
1.1.1 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.....	2
1.1.1.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE.....	3
1.1.1.2 PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGÉNESIS.....	5
1.1.1.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA EN PLANTAS.....	7
1.1.2 ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS.....	8
1.1.2.1 IMPORTANCIA DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LAS PLANTAS.....	10
1.1.2.2 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO.....	11
1.1.3 FACTORES BIÓTICOS QUE CAUSAN ENFERMEDADES EN PLANTAS.....	13
1.1.3.1 PRINCIPALES PATÓGENOS QUE CAUSAN PÉRDIDAS EN LOS CULTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL.....	14
1.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS OOMICETOS.....	15
1.1.4.1 <i>Pythium</i> sp.....	16
1.1.4.2 <i>Pythium ultimum</i>	17
1.1.4.3 MODO DE INFECCIÓN DE <i>P. ultimum</i>	19
1.1.5 GENERALIDADES DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	20

1.1.5.1 IMPORTANCIA Y USOS DEL CHILE HABANERO.....	21
1.1.5.2 FACTORES BIÓTICOS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	22
1.1.6 MODELO DE ESTUDIO.....	24
1.1.7 JUSTIFICACIÓN.....	25
1.1.8 PREGUNTA BIOLÓGICA.....	25
1.1.9 HIPÓTESIS.....	25
1.1.10 OBJETIVO GENERAL.....	26
1.1.10.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
1.1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	27
2. CAPÍTULO II.....	29
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
2.1.2 CEPA DE <i>P. ultimum</i>	29
2.1.3 CONDICIONES DE INFECCIÓN.....	30
2.1.4 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	31
2.1.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO.....	32
2.1.6 VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	34
2.1.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES <i>PR1</i>	36
2.1.7.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL POR EL MÉTODO DE TRIZOL.....	36
2.1.7.2 TRATAMIENTO CON DNAsa.....	36

2.1.7.3 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc).....	37
2.1.7.4 DISEÑO DE LOS INICIADORES DEL GEN <i>PR1</i>	37
2.1.7.5 CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL.....	37
3. CAPÍTULO III.....	39
3.1 RESULTADOS.....	39
3.1.1 EFECTO DE LA PRESENCIA DE <i>P. ultimum</i> SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR EN <i>C. chinense</i> Jacq.....	40
3.1.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN DE <i>P. ultimum</i> EN LA MORFOLOGÍA CELULAR DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	43
3.1.3 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO SALICÍLICO ENDÓGENO EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. chinense</i> Jacq. INFECTADAS CON <i>P. ultimum</i> ...48	
3.1.4 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL EN CÉLULAS DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	49
3.1.4.1 DISEÑO DE LOS INICIADORES DEL GEN QUE CODIFICA PARA <i>PR1a</i> y <i>PR1b</i>	50
3.1.4.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA <i>PR1a</i> Y <i>PR1b</i>	53
3.1.4.3 ACTIVACIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA PATOGÉNESIS.....	55
4. CAPÍTULO IV.....	57
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	57
5. CAPÍTULO V.....	65
5.1 CONCLUSIONES.....	65
5.2 PERSPECTIVAS.....	66

ANEXOS.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	71

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Modelo de Zig-Zag en la interacción planta-patógeno.....	4
Figura 1.2 Cascada de señalización de la respuesta de defensa en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 1.3 Estructura química del ácido salicílico.....	9
Figura 1.4 Biosíntesis del ácido salicílico en plantas.....	10
Figura 1.5 Modelos acerca de la percepción del AS.....	12
Figura 1.6 Ciclo de vida de <i>Pythium</i> sp.....	17
Figura 1.7 Proceso de infección en plantas causado por <i>P. ultimum</i>	20
Figura 1.8 Frutos de <i>C. chinense</i> Jacq., variedad naranja.....	21
Figura 1.9 Principales plagas y enfermedades que afectan los cultivares de <i>C. chinense</i> Jacq.....	23
Figura 1.10 Estrategia experimental.....	27
Figura 2.1 Suspensiones celulares de <i>C. chinense</i> Jacq.....	29
Figura 2.2 Estructuras morfológicas de <i>P. ultimum</i>	30
Figura 2.3 Estructura del Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y el producto colorimétrico Formazan.....	31
Figura 2.4 Viabilidad celular por medio de MTT.....	32
Figura 2.5 Cromatograma del estándar de ácido salicílico.....	33
Figura 2.6 Estructura química de 4'6-diamidino-2-fenilindol.....	34
Figura 2.7 Estructura química del blanco de calcofluor.....	35

Figura 3.1 comportamiento de la viabilidad celular de <i>C. chinense</i> Jacq. infectada con <i>P. ultimum</i>	41
Figura 3.2 Efecto de la infección de <i>P. ultimum</i> en el crecimiento de suspensiones celulares de <i>C. chinense</i> Jacq.....	42
Figura 3.3 Morfología celular de <i>C. chinense</i> Jacq. infectadas con <i>P. ultimum</i>	44
Figura 3.4 Efecto de la infección de <i>P. ultimum</i> en la morfología celular de <i>C. chinense</i> Jacq.....	45
Figura 3.5 Células de <i>C. chinense</i> infectadas con <i>P. ultimum</i>	46
Figura 3.6 Evaluación de la viabilidad en células de <i>C. chinense</i> Jacq. infectadas con <i>P. ultimum</i>	47
Figura 3.7 Evaluación del contenido endógeno de ácido salicílico en suspensiones celulares de <i>C. chinense</i> Jacq. infectadas con <i>P. ultimum</i>	48
Figura 3.8 Extracción de ARN total de células de <i>C. chinense</i> Jacq.	51
Figura 3.9 Secuencia del gen que codifica para la <i>PR1a</i> en <i>Capsicum annuum</i>	52
Figura 3.10 Secuencia del gen que codifica para la <i>PR1b</i> en <i>Capsicum annuum</i>	53
Figura 3.11 Amplificación de los genes <i>PR1a</i> y <i>PR1b</i> de <i>C. chinense</i> Jacq.....	54
Figura 3.12 Evaluación mediante RT-qPCR de los perfiles de expresión de genes relacionados a la patogénesis (<i>PR1a</i> y <i>PR1b</i>) en <i>C. Chinense</i> Jacq.....	56
Figura 4.1 Modelo del mecanismo de respuesta de <i>C. chinense</i> Jacq ante la infección de <i>P. ultimum</i>	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1 Familia de Proteínas Relacionadas a Patogénesis (PRs).....	6
Cuadro 2.1 Condiciones de la exposición de los fluorocromos para observar las estructuras celulares de <i>C. chinense</i> Jacq.....	35
Cuadro 2.2 Iniciadores utilizados en la amplificación de los genes <i>PR1a</i> y <i>PR1b</i>	38
Cuadro 3.1 Concentración de ARN total y análisis de pureza.....	50

ABREVIATURAS

AJ	Ácido jasmónico
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Ácido salicílico
ASGT	AS glucosil Transferasa
CFW	Blanco de calcofluor
DAPI	4´6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
EF1α	Factor de elongación 1 α
ET	Etileno
ETI	Inmunidad desencadenada por el efector
ETS	Susceptibilidad desencadenada por el efector
hdi	Horas después de la infección
mdi	Minutos después de la infección
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
LPS	Lipopolisacáridos
MAMPS	Patrones moleculares asociados a microbios
MAPKs	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazolio
NPR1	No-expresivo del gen relacionado con la patogénesis 1

PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PR	Proteínas relacionadas a patogénesis
PR1a	Proteína relacionada a patogénesis 1a (ácida)
PR1b	Proteína relacionada a patogénesis 1b (básico)
PTI:	Inmunidad desencadenada por PAMP
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT	Transcriptasa reversa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
SABP	Proteína de unión al AS
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SMe	Salicilato de metilo

RESUMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo de importancia comercial para el estado de Yucatán, porque éste es considerado el centro de producción de esta especie. Su importancia económica, se centra en su uso en la gastronomía, en la elaboración de fármacos, cosméticos, pinturas y gas lacrimógeno. Sin embargo, los cultivos de chile son susceptibles a diversas plagas y enfermedades, que reducen la producción y la calidad del fruto. Este cultivo es susceptible a la infección por el oomiceto *Pythium ultimum*, el cual, induce la pudrición de las raíces y la marchitez en la etapa de plántulas o en plantas completas, causando pérdidas en la producción cercanas al 80% en las regiones productoras en México. En nuestro grupo estamos interesados en las vías de transducción de señales que desencadena la infección con este patógeno, particularmente en aquellas que involucran la síntesis de fitohormonas como el ácido salicílico (AS) y la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PRs*). En este estudio demostramos que *P. ultimum* posiblemente esté induciendo una reacción de hipersensibilidad (RH) en suspensiones celulares de *C. chinense*, causando daños morfológicos y estructurales. Además, en las primeras doce horas de la infección induce el aumento en la cantidad de AS endógeno como parte de la respuesta de defensa, y también aumentó los niveles de expresión de los genes *PR1*, siendo *PR1b* el que mostró mayor expresión.

ABSTRACT

Capsicum chinense Jacq. (chile habanero) is a crop of great commercial importance in the Yucatan state, because it is considered as a main zone of production of this species. Their economic importance is funded in several aspects; it is key in the regional cuisine of Yucatan, in the elaboration of medicines, cosmetics, paints and tear gas. However, chile crops are susceptible to various diseases, which reduce the production and quality of the fruit. *Pythium ultimum* oomycete induce root rot and wilting at the stage of the seedlings or whole plants, causing losses in the production of chile plants of around 80% in Mexico. Therefore, we were interested in the signal transduction pathway that triggers infection by this pathogen, which involves the synthesis of phytohormones such as salicylic acid (SA) and the expression of genes related to pathogenesis (*PR1*). In this work we show that *P. ultimum* is able to provoke an induced response in cell suspensions of *C. chinense*, causing morphological and structural damage, it also induces the increase in the amount of endogenous SA in response during the first twelve hours after infection and also *PR1* gene expression was increased with *PR1b* being the most expressed.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*C. chinense* Jacq.) es uno de los de mayor pungencia o picor en el mundo. La cantidad de capsaicina ha sido determinante en el incremento de la demanda de esta especie en el mercado nacional e internacional. La capsaicina recibe múltiples usos en la gastronomía, en la elaboración de fármacos de aplicación tópica, aditivo en cosméticos, pinturas, gases lacrimógenos, entre otros. En México, se considera a los oomicetos entre los principales agentes que causan daños por ahogamiento y marchitez en las plantas, ocasionando pérdidas de hasta un 80% en la producción agrícola (González-Pérez *et al.*, 2004).

El género *Pythium* spp. contiene algunos de los patógenos más importantes que causan grandes pérdidas en los cultivos de interés agronómico. La propagación de dichos microorganismos es difícil de controlar, sin embargo, se buscan alternativas para inducir resistencia en plantas y así poder combatir los efectos causados por dichos patógenos.

Para prevenir la infección de diferentes fitopatógenos, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos, como barreras físicas, químicas, la síntesis de fitoalexinas y fitohormonas, como el ácido jasmónico (AJ), el etileno (ET) y el ácido salicílico (AS), que dificultan la infección por dichos microorganismos. Se ha observado que los niveles de AS aumentan, en la respuesta de defensa de las plantas. También, se produce la síntesis y entrecruzamiento de proteínas de pared, lignificación de la pared celular y depósito de calosa en torno a la lesión. Así mismo, el AS está involucrado de manera esencial en la ruta de transducción de señales que conduce a la activación de genes *PR*, que codifican para proteínas relacionadas a la patogénesis (PR).

El interés de este trabajo de investigación es estudiar la modificación en los niveles de AS endógeno, así como la inducción de la expresión de genes *PR1* y evaluar las características morfológicas de las células de *C. chinense* Jacq., en respuesta a la infección con *P. ultimum*.

1. CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

Las plantas poseen un sistema de defensa, que es capaz de reconocer moléculas o señales, activando una respuesta inmune adaptada al tipo de organismo atacante (Howe y Jander, 2008). Para hacer frente al ataque por patógenos o insectos, las plantas han desarrollado estrategias para reconocer diferentes tipos de interacciones bióticas, y responder así activando respuestas específicas que les permitan protegerse frente a un patógeno (Zamioudis y Pieterse, 2012).

La primera línea de defensa es el reconocimiento de estructuras específicas de microorganismos patogénicos, como lo son los lipopolisacáridos (LPS), la flagelina y la quitina entre otros, los cuales han sido denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), o también descritos como patrones asociados a microbios (MAMPs), ya que esta primera línea no hace distinción entre simbiosis parasíticas o patogénicas (Zipfel y Felix, 2005). Esta última línea implica eventos posteriores al reconocimiento inicial y que determinan el nivel de respuesta del hospedero y la diferenciación entre microorganismos patogénicos. A diferencia de algunos animales, las plantas solo tienen inmunidad innata, pero tienen un impresionante arreglo de receptores que intentan suprimir a los PAMPs, activando la inmunidad desencadenada por MAMPs o PTI (inmunidad desencadenada por PAMPs, por sus siglas en inglés) (Jones y Dangl, 2006).

Las plantas han desarrollado dos niveles de inmunidad innata para defenderse contra patógenos. El primero, es la inmunidad activada por los PAMPs (PTI), y activada por el reconocimiento de los PAMPs mediante proteínas membranales llamadas receptores de reconocimiento a PAMPs (PRR, por sus siglas en inglés). Es de resaltar que los PAMPs son moléculas altamente conservadas entre las diferentes clases de microorganismos y que por esta razón los PRR son específicos y sensibles en su interacción con los PAMPs. Tras la detección de los PAMPs por el sistema inmune, se activa en las plantas una respuesta de defensa para protegerse del organismo atacante.

En la Figura 1.1, se observa, que los PRR reconocen los PAMPs activando PTI (Fase 1), confiriéndole a la planta una resistencia basal para evitar la virulencia del patógeno (Jones y Dangl, 2006; Torto-Alalibo *et al.*, 2009). Sin embargo, los patógenos exitosos han evolucionado, secretando efectores que facilitan la evasión de la respuesta de PTI y llevar a las plantas hasta un estado de susceptibilidad activada por efectores (ETS), por sus siglas en inglés (Fase 2) (Fu *et al.*, 2012).

Con el fin de defenderse de los patógenos que suprimen el primer mecanismo de defensa, las plantas desarrollaron un segundo nivel de defensa que se activa por el reconocimiento de efectores específicos del patógeno. El reconocimiento de un efector patogénico por las proteínas R, la cual contiene un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR), conduce a una inmunidad activada por el efector (ETI, por sus siglas en inglés). Esta respuesta se caracteriza por una rápida muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) que incluye una respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) en el sitio de la infección.

1.1.1.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE

Cuando en las plantas ocurre el reconocimiento de patógenos, las plantas pueden activar la respuesta inmune (PTI o ETI) utilizando diferentes vías de señalización (Tiffin y Moeller, 2006). La PTI comprende la señalización a través de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés). Las MAPKs son componentes ubicuos de la transducción de señales en eucariotes, actúan en la transferencia de señales desde receptores ubicados en la membrana plasmática, hasta la activación de genes de respuesta al patógeno atacante.

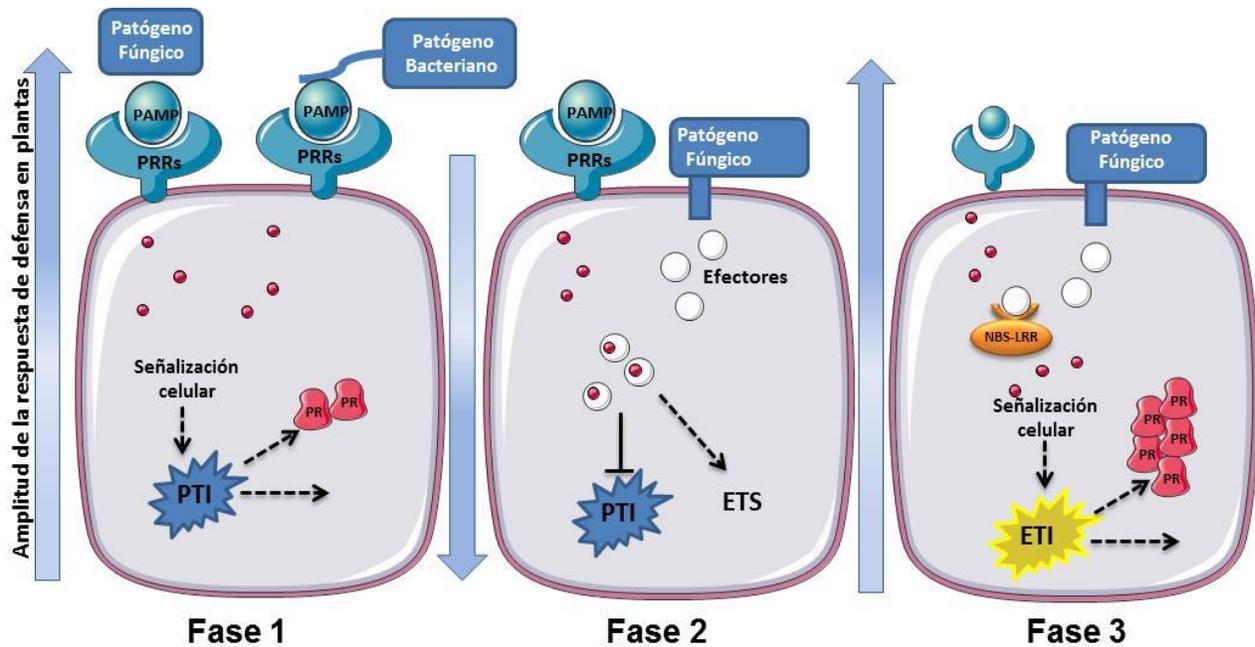


Figura 1.1 Modelo Zig-Zag de la respuesta del sistema inmune de la planta. En la fase 1, los PAMPs, son reconocidos a través de los receptores PRRs, activando la respuesta PTI. En la fase 2, los patógenos liberan efectores al interior de la célula, que interfieren con la PTI, resultando en una susceptibilidad de la planta al patógeno (ETS). En la fase 3, los efectores son reconocidos por una proteína-R intracelular, activando una respuesta mucho más intensa llamada ETI; modificada de Jones y Dangl, 2006.

La cascada de señalización a través de las MAPKs consiste en que una MAPK cinasa-cinasa (MAPKKK), fosforila una MAPK cinasa (MAPKK), que a su vez fosforila a otra MAPK. Esta ruta puede regular la actividad de varios sustratos, semejantes a factores de transcripción, así como a otras proteínas cinasa (Pitzschke *et al.* 2009). La cascada de las MAPKs actúa después de la percepción de los PAMPs, activando la fosforilación en cadena de las MAPKKs, permitiendo la activación de factores de transcripción WRKY, y la activación de los genes de defensa (Figura 1.2) (Suarez-Rodríguez *et al.*, 2007).

Otra ruta de señalización es activada por algunas proteínas citoplasmáticas de resistencia (R) que involucra a la proteína de susceptibilidad 1 a la enfermedad mejorada (EDS1, por sus siglas en inglés), a la proteína deficiente en fitoalexina 4 (PAD4, por sus siglas en inglés), al AS, a la proteína no expresora de los genes PR1 (NPR1, por sus siglas en inglés)

y a factores de transcripción WRKY (Durrant y Dong, 2004).

En la vía de señalización activada por patógenos, la respuesta de defensa puede resultar en la muerte celular programada, que incluyen un flujo rápido de iones calcio al interior de la célula, dando lugar a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y a un aumento en la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), incluyendo quitinasas, β -1,3 glucanasas, inhibidores de proteasas y de proteínas de transferencia de lípidos, muchas de las cuales tienen una actividad biocida.

Las PR y otras proteínas asociadas a la inmunidad son también sobreexpresadas como parte de la defensa basal en respuesta al estrés abiótico o expresadas constitutivamente en algunos tejidos (van Loon *et al.*, 2006). Sin embargo, actualmente el conocimiento acerca de las vías de señalización que se desencadenan después de la activación de las proteínas PRR y R es parcial. Se conoce que la vía de señalización a través de las proteínas R desencadenan una ruta de señalización mediadas por hormonas vegetales, como el AS, AJ y ET, que son importantes reguladores de la expresión génica (Bari y Jones, 2009). Tal es el caso del AS que induce la expresión de genes PR y con ello la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés).

1.1.1.2 PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA PATOGÉNESIS

Las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR), se han identificado como polipéptidos que en una gran cantidad de cultivos son inducidos en respuesta a la infección por oomicetos, hongos, virus, bacterias o ataque de insectos (van Loon *et al.*, 2006). Debido a que las PR se acumulan en el punto de infección, como en los tejidos distales al sitio primario, son denominados marcadores de la respuesta de la SAR.

Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Hasta la fecha se conocen 17 familias PR1-PR17, que poseen actividades definidas tal como las PR2 (β -1,3-lucanasas) y PR3 (quitinasas) (cuadro 1.1) y que coadyuvan a la protección de la planta ante el ataque de patógenos (Bliffeld *et al.*, 1999).

Cuadro 1.1 Familia de Proteínas Relacionadas a Patogénesis (PRs)

Familia PR	Miembro tipo	Plantas en la que fue aislada	Propiedades	Gen
PR-1	Tabaco PR-1a	Arroz, cebada, maíz, perejil, tabaco, tomate	Antifúngica	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco PR-2	Arroz, Cebada, Maíz, Perejil, Tabaco, Tomate, frijol, papa, pepino, soya, remolacha, repollo, garbanzo	B-glucanasa	<i>ypr2</i>
PR-3	Tabaco P. Q	Arroz, , colza, remolacha, pimienta, tomate	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI y VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR-4	Tabaco R	Caucho, tomate, tabaco	Quitinasa tipóp I y II	<i>Ypr4, Chid</i>
PR-5	Tabaco S	Arroz, avena, cebada, sorgo, papa, tabaco, trigo ,tomate	Semejante a taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomate inhibidor I	Cebada, papa, tabaco, tomate	Inhibidor de proteasas	<i>Ypr6, Pis ('Pin')</i>
PR-7	Tomate P69	Tomate	Endoproteinasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Quitinasa Calabaza	Pepino	Quitinasas tipo III	<i>Ypr8, Chid</i>
PR-9	Peroxidasa formada de lignina Tabaco	Arroz, trigo, tabaco, tomate	Peroxidasa	<i>Ypr9, Prx</i>
PR-10	Semejante a PR-1	Arroz, espárragos, frijol, papa, perejil, soya	Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Quitinasa Clase V Tabaco	cebada	Quitinasa tipo I	<i>Ypr11, Chic</i>
PR-12	Rábano Rs-AFP3	Arroz, cebada, pimienta	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis TH12.1	cebada	Tionina	<i>Ypr13, thi</i>
PR-14	Cebada LTP4	Arroz, Cebada, pimienta	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14, Ltp</i>
PR-15	OxOa (germin) cebada	cebada	Oxalato-oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	OxOLP cebada	Cebada, trigo	Semejante a Oxalato-oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	PRp27 Tabaco	Cebada, tabaco, trigo	Peptidasa	<i>Ypr17</i>

De esta gran familia, el grupo de las PR1 es el más estudiado, aunque aún se desconoce la función que tiene durante las respuestas de defensa. Estas proteínas han sido detectadas en un amplio número de especies y en particular se conocen dos isoformas, una ácida y otra básica, y poseen un peso molecular de entre 14 y 16 kDa. Las proteínas PR1 se han encontrado en la pared celular y en su capa más externa. La detección de la proteína reforzando la pared celular, sugiere su función en la prevención de la dispersión del patógeno (Santén *et al.*, 2005), dadas las características anteriores, la expresión de estos genes y la detección de sus productos se utilizan como marcadores de la respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos.

1.1.1.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA EN PLANTAS

El fenómeno de la SAR confiere resistencia a la planta ante una infección secundaria por patógenos biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos, y se presenta en la mayoría de las plantas; sin embargo, el tiempo y el nivel de protección depende de la especie vegetal y del efector. La SAR se caracteriza por dos procesos de defensa, uno local y otro sistémico, en los que es requerida la acumulación de proteínas PR, las cuales son proteínas con actividad antimicrobiana (van Loon *et al.*, 2006). La activación de la SAR se asocia además con los niveles elevados de la hormona AS, en el lugar de la infección.

El primer tipo de resistencia SAR descrita se derivó de la interacción de una planta con un virus, tal respuesta hace más resistente a la planta al ataque posterior de un patógeno. La SAR, suele ser de larga duración y es capaz de proteger a la planta frente a un amplio rango de patógenos tales como los hongos, las bacterias, los virus y los oomicetos (Durrant y Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2009).

Para la identificación de genes relacionados a la defensa, se ha empleado plantas mutantes, que es una herramienta de gran importancia. El primer trabajo realizado, se basó en el reconocimiento de genes que se expresan en respuesta a un patógeno. El uso de la expresión del gen *NahG*, que codifica para la enzima salicilato hidroxilasa (una enzima que utiliza como sustrato al AS y lo convierte en catecol), que ocasiona una reducción en la acumulación de AS y en la expresión de los genes *PR*'s, fue probado en plantas de tabaco y de *A. thaliana* que no expresaban los genes *PR*'s fueron susceptibles a la infección por

virus, hongos y bacterias. Esto nos sugiere que la acumulación del AS es necesaria en la expresión de la resistencia en plantas (Tiryaki y Tunaz, 2004).

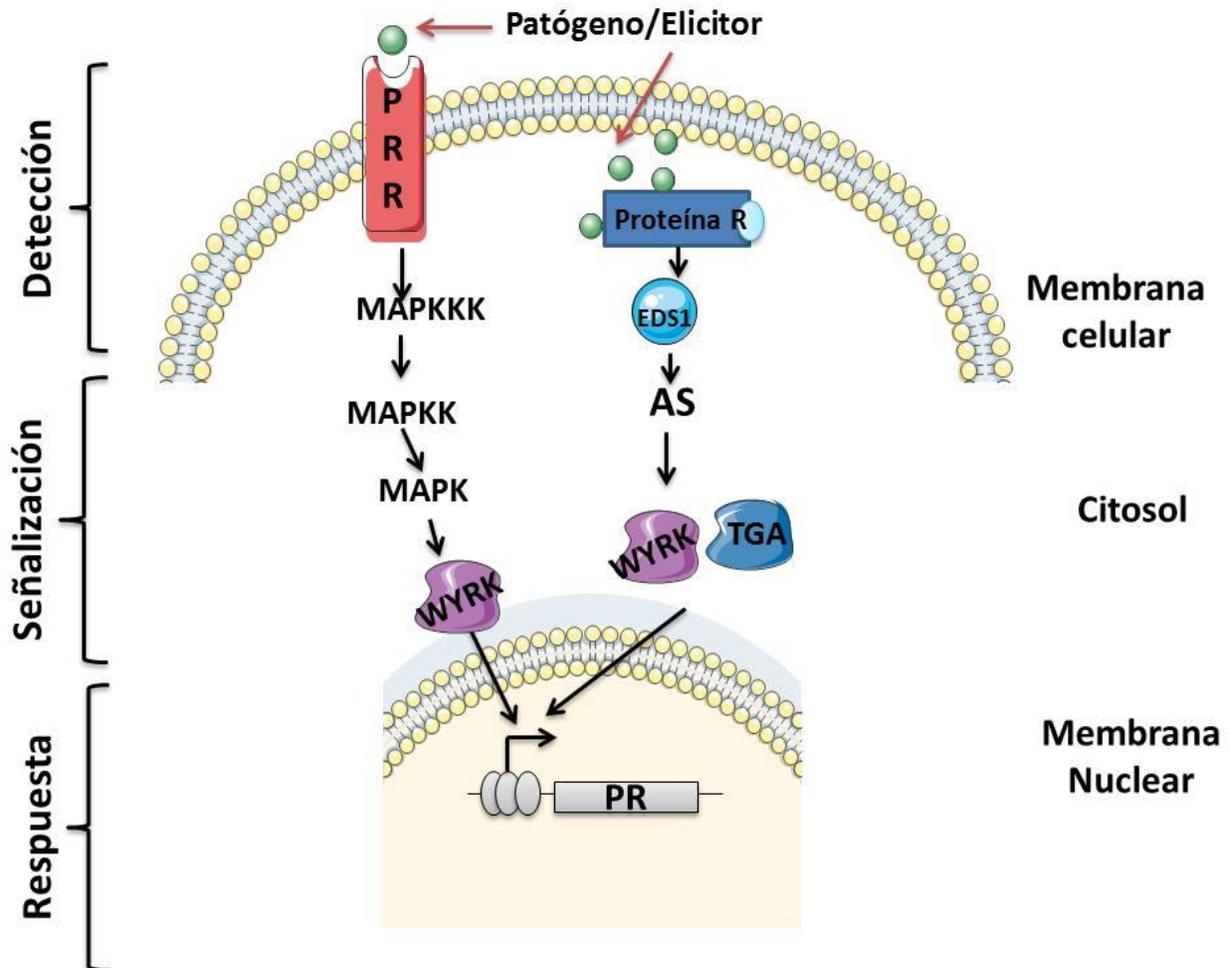


Figura 1.2 Cascada de señalización de la repuesta de defensa en *Arabidopsis thaliana* (adaptado de Tiffin y Moller, 2006).

1.1.2 ÁCIDO SALICÍLICO EN PLANTAS

El ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados compuestos fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático (Figura 1.3). El AS puede ser metabolizado, conjugado y transportado rápidamente a diferentes tejidos de las plantas y los niveles de AS en diferentes especies son de aproximadamente 1 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco.

El AS puede sintetizarse por dos vías enzimáticas, que requieren el metabolismo primario del corismato. La fenilalanina puede ser convertida en AS por dos vías, una mediada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), en donde la fenilalanina es convertida en ácido cinámico, que dará lugar a la formación del ácido benzoico o ácido ortocumarico, para generar AS (Chen *et al.*, 2009; Rankin, 1992). Por otro lado, el AS puede generarse a partir del ácido corismico, mediante la actividad enzimática de la enzima isocorismato sintasa (ICS) y la isocorismato piruvato liasa (IPL) (Figura 1.4) (Verberne *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001).

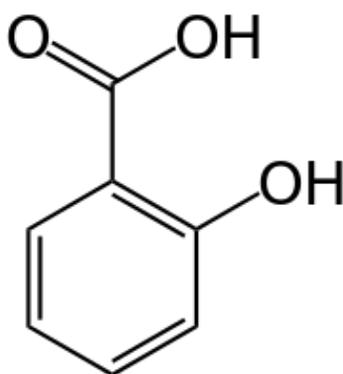


Figura 1.3 Estructura química del ácido salicílico.

La mayor parte del AS producido, como respuesta al ataque por patógenos, es sintetizado por la segunda vía en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* y *Solanum lycopersicum* (Wildermuth *et al.*, 2001; Uppalapati *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2008). La mayoría del AS en la planta puede ser glucosilado (ASG) por la enzima AS glucosil transferasa (ASGT), y que es inducida por patógenos. En *Arabidopsis*, el AS se sintetiza en cloroplastos mientras que en tabaco la enzima ASGT está localizada en el citosol. El ASG en tabaco es activamente transportado del citosol hacia la vacuola, donde puede ser almacenado en su forma inactiva y posteriormente, en caso de ser necesario puede ser convertido en AS (Dean *et al.*, 2005).

Otro derivado del AS, es el salicilato de metilo (SMe). En esta forma, el AS es móvil y puede transportarse por el floema hacia las partes distales de la planta, donde generará una respuesta sistémica ante el ataque por un patógeno.

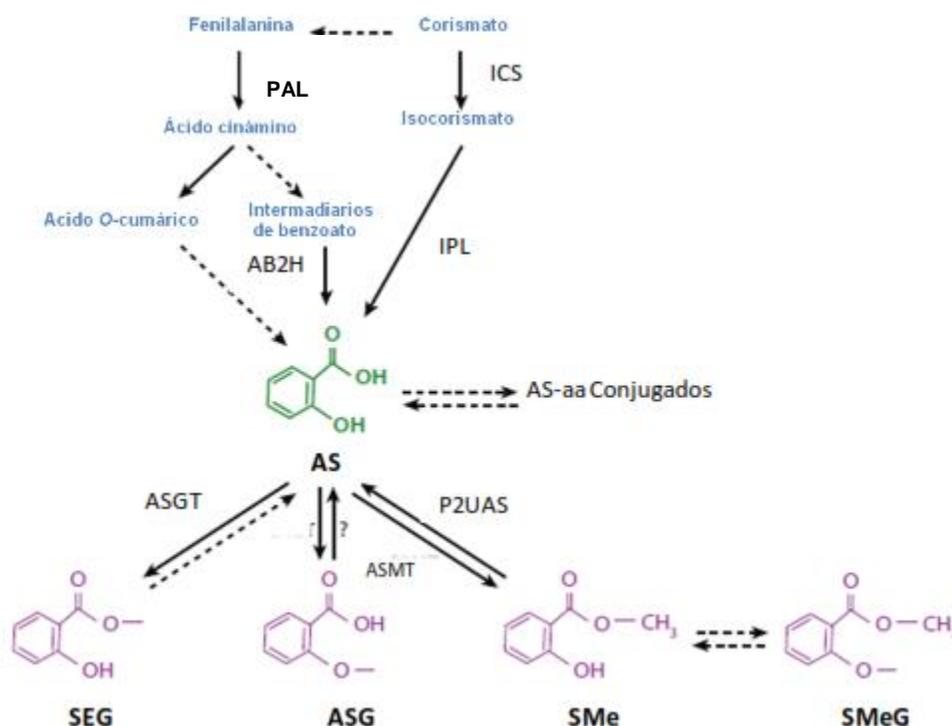


Figura 1.4 Biosíntesis del ácido salicílico en plantas. El ácido salicílico se genera a partir de dos vías: La de la fenilalanina y la del corismato. El AS puede ser glucosilado, metilado o formar complejos con aminoácidos (Vlot *et al.*, 2009). PAL, fenilalanina amonio liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; AB2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa; AS, ácido salicílico; ASGT, ácido salicílico glucosil transferasa; aa, amino ácidos; ASMT, AS metil tranferasa; P2UAS, proteína 2 unida a AS; MES, metil esterasa; SEG, saliciloil éster glucosa; ASG, AS O- β glucósido; SMe, salicilato de metilo; SMeG, salicilato de metilo O- β -glucosido.

1.1.2.1 IMPORTANCIA DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LAS PLANTAS

Los compuestos fenólicos participan en diversas funciones metabólicas de las plantas, por ejemplo: la síntesis de la lignina, la actividad alopatáica, y en algunos casos, en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa, como las fitoalexinas. El ácido salicílico es un compuesto fenólico que participa en procesos como la germinación de semillas, el

crecimiento celular, la respiración, el cierre de estomas, la expresión de genes asociados a senescencia, la respuesta a estrés abiótico, en la termogénesis y resistencia a enfermedades (Raskin, 1992; Humphreys y Chapple, 2002; Vlot *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha descrito que, en algunos casos, el efecto del AS dentro del metabolismo de las plantas puede ser indirecto, ya que altera la síntesis y/o señalización de otras hormonas, que incluyen la vía del AJ, el ET y las auxinas (Loake y Grant, 2007; Balbi y Devoto, 2008).

El primer efecto descrito del AS es su participación en la inducción de la floración y la formación de brotes en cultivos celulares de tabaco (Eberhard *et al.*, 1989). Sin embargo, el efecto en la floración estimulada por el AS no es específico, ya que su acción involucra la participación de otros reguladores de crecimiento, como las giberelinas. Una hipótesis, es que el mecanismo por el cual el AS induce la floración implica la inhibición de la formación del ET.

1.1.2.2 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO

La señalización desencadenada por AS, incluye la percepción de señales extracelulares, la expresión de genes de defensa e interacciones proteína-proteína o proteína-AS. En la actualidad, se han identificado cuatro proteínas de unión al AS en tabaco y *Arabidopsis*: la primera es la SABP (proteína blanco de AS), una proteína con actividad de catalasa que es capaz de degradar al H₂O₂ y es específicamente inhibida por el AS. Por otra parte, el AS también puede inhibir la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa (APX) citosólica, provocando el aumento de los niveles de H₂O₂, dando lugar al estado oxidativo, que se produce en la infección por un patógeno (Chen *et al.*, 1993).

Otros estudios proponen que el AS puede unirse a proteínas que contienen hierro, como la aconitasa, la lipoxigenasa y la peroxidasa, por lo que son consideradas blancos celulares del AS (Yan y Dong, 2014). Sin embargo, estas proteínas de unión a AS no explican completamente la respuesta al AS, incluyendo la reprogramación transcripcional mediada por AS.

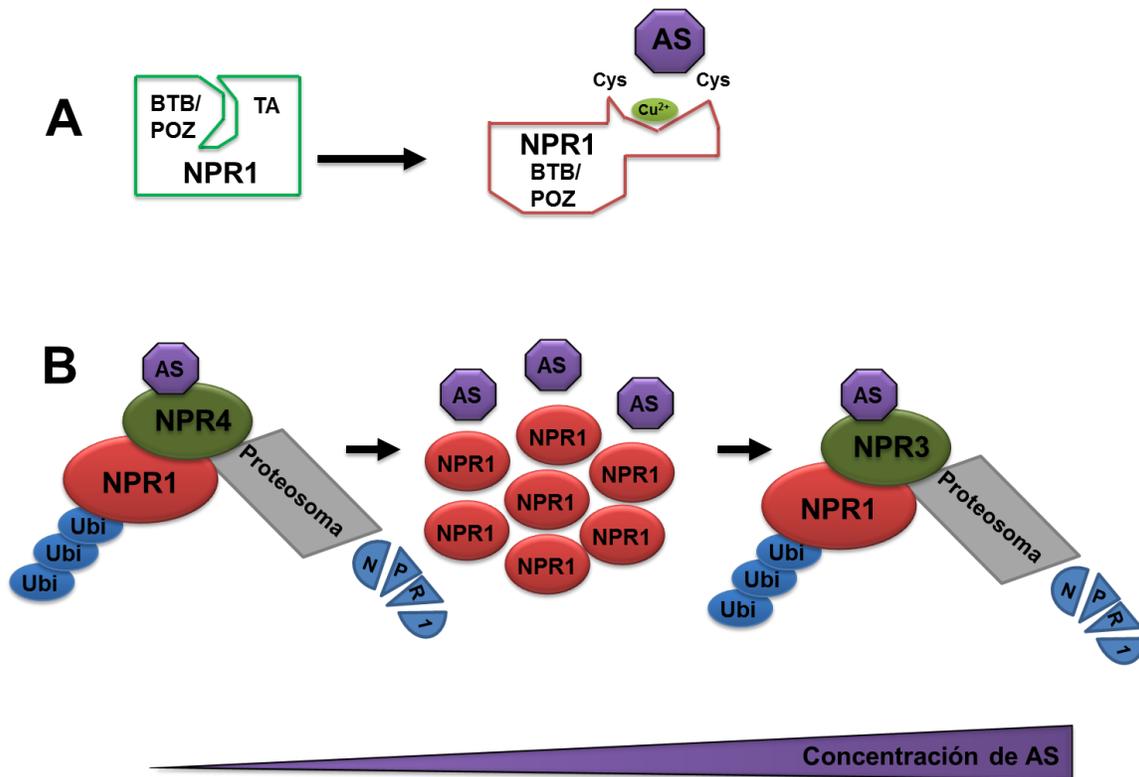


Figura 1.5 Modelos para la percepción del AS. A) La unión directa del AS a NPR1 modula su actividad. B) La acumulación de NPR1 está regulada por AS a través de los receptores NPR3 y NPR4. La infección por patógenos desencadena la acumulación del AS. A concentraciones bajas de AS, el receptor NPR4 desencadena la degradación de NPR1, a través del proteasoma 26S. Cuando los niveles del AS son intermedios, la proteína NPR1 se acumula. Las elevadas concentraciones del AS desencadenan la degradación del NPR1 mediada por el receptor NPR3 (Seyfferth y Tsuda, 2014).

Wu y colaboradores en 2012, identificaron en *A. thaliana* a NPR1 como una proteína de unión a AS, porque demostraron que el AS interactúa, a través de la coordinación del cobre, en los residuos Cys521 y Cys529 dentro del dominio de transactivación. Este evento da como resultado la regulación de la conformación proteica que conduce a la desoligomerización de NPR1 para formar un dímero (Figura 1.5 A).

Dong y colaboradores en 2014 presentaron un modelo alternativo a la percepción de AS, que implica dos receptores de AS adicionales. Se ha logrado demostrar que NPR3 y NPR4, funcionan como receptores de AS, mediante la degradación de NPR1 por el complejo Cullin 3 ubiquitin ligasa dependiente de AS (CUL3) (Fu *et al.*, 2012), regulando de esta manera la

muerte celular programada y la inmunidad de la célula.

El nuevo modelo propone que bajos niveles (rango nM) de AS interrumpen la interacción NPR1-NPR4, dejando NPR1 libre de la degradación mediada por NPR4. Por otra parte, la interacción NPR1-NPR3 permite la degradación de NPR1 cuando las concentraciones de AS son excesivas (en un rango de 1M). Por lo tanto, la señalización de NPR1 solo se permite en un rango moderado de concentración de AS (Figura 1.5 B).

Este modelo explica la relación entre la homeostasis del nivel de NPR1 y la acción de diferentes concentraciones de AS. El mecanismo anterior implica la existencia de diferentes receptores celulares de AS que corresponden con el modelo conceptual para la percepción de AS intracelular y la señalización inducida por AS.

1.1.3 FACTORES BIÓTICOS QUE CAUSAN ENFERMEDADES EN PLANTAS

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, las plantas interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos.

Entre los organismos que pueden causar daño mecánico en las plantas, se encuentran los nematodos y los insectos, pero, además, existen microorganismos patogénicos como hongos, bacterias y oomicetos, con capacidad para provocar enfermedades a las plantas.

De acuerdo a la forma de nutrición, dichos microorganismos se pueden dividir en necrótrofos, biótrofos y hemibiótrofos. Los necrótrofos son microorganismos que destruyen los tejidos de la planta huésped, mediante la producción de toxinas, y luego asimilan el contenido celular de manera saprófita, por ejemplo *Botrytis cinerea*, que ataca a los viñedos y *Fusarium oxysporum*, que ataca las raíces de las plantas de banano (*Musa paradisiaca*) (Stone, 2001).

Los biótrofos requieren de la planta huésped para completar su ciclo de vida, obteniendo nutrientes de las células metabólicamente activas, comúnmente a través de estructuras especializadas que penetran en las células (Shulze-Lefert y Panstruga, 2011), un organismo de éste tipo de patógeno es el hongo *Hyaloperonospora* spp.

Los hemibiótrofos, son patógenos que pueden adoptar ambos estilos de vida, presentando una fase inicial biotrófica y una fase avanzada necrotrófica, como, por ejemplo, hongos del género *Colletotrichum* y oomicetos como *Phytophthora infestans* y algunas especies de *Pythium* ssp. Por lo que se denominan hemibiótrofos.

1.1.3.1 PRINCIPALES PATÓGENOS QUE CAUSAN PÉRDIDAS EN LOS CULTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL

Los patógenos de plantas pueden reducir significativamente el rendimiento y calidad en cultivos hortícolas. A menudo sobreviven en el suelo por muchos años y cada uno de los cultivos hortícolas puede ser susceptible a varias especies. A veces es difícil predecir, detectar y diagnosticar el organismo causante de las enfermedades de las plantas, ya que dichas enfermedades se reflejan en general, como putrefacciones que afectan el tejido radicular y la germinación de semillas (Koike *et al.*, 2003).

Uno de los problemas conocidos como Damping-off de las plantas es causado por una compleja asociación de hongos y oomicetos como *Phytophthora*, *Peronospora* y *Pythium*. Los oomicetos son un grupo de protistas filamentosos superficialmente parecidos a los hongos. El nombre significa “hongo huevo” y se refiere al oogonio (estructura esférica que contiene los gametos femeninos). Estos microorganismos habitan en medios acuosos, y engloban a un grupo de especies tanto saprófitas como parásitas y que actúan sobre animales y plantas. Por sus efectos negativos en los cultivos de interés agrícola, muchas de estas especies de oomicetos son de interés pues ocasionan grandes pérdidas económicas al devastar a los cultivos. Uno de los géneros que más destaca es *Pythium*, cuyas especies tienen un gran número de huéspedes y contribuyen a la enfermedad conocida como ahogamiento o Damping-off.

1.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS OOMICETOS

Los oomicetos comparten ciertas características con los hongos, su forma de crecimiento como hifas filamentosas, nutrición por absorción, metabolismo heterotrófico, y reproducción por esporas (Richards *et al.*, 2006; Fry, 2008). *Pythium* y *Phytophthora* son referidos usualmente como mohos de agua u hongos primitivos, a pesar de que no son hongos verdaderos, pero se parecen y se comportan como ellos (wick, 2003).

Dentro de las características biológicas que los distinguen de los hongos eucarióticos, está la composición de sus paredes celulares, las cuales contienen β -1,3 y β -1,6 glucanos y no quitina, la cual se encuentra en las paredes de los hongos verdaderos (Colditz, *et al.*, 2009). Sin embargo, análisis bioquímicos y filogenéticos de la secuencia de genes mitocondriales y ribosomales, sugieren que los oomicetos tienen poca afinidad taxonómica con los hongos filamentosos y están más relacionados a las algas café-doradas o heterocontes (hace referencia a la presencia de flagelos desiguales), dado que presentan meiosis en los gametangios y por lo tanto, sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide (Kumar, 1996).

Los oomicetos pertenecen al Reino Stramenophila o Cromista, Phylum Oomycota, Orden Peronosporales y Familia Pythiaceae, (Alexopoulos, 1996; Baptista, 2004). También conocidos como organismos “heterocontes”, lo que significa que sus zoosporas poseen flagelos con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y un flagelo más corto, delgado, cilíndrico y en forma de látigo o flecha (Jaramillo y Rojas, 2003).

La familia Pythiaceae comprende solamente dos géneros, *Pythium* y *Phytophthora*, con características morfológicas muy parecidas; sin embargo, se pueden distinguir por los métodos de germinación que presentan, o por la estructura del esporangio (el lugar donde ocurre la diferenciación de las zoosporas); *Phytophthora* produce esporangios que al madurar forman zoosporas dentro del mismo esporangio (Waterhouse, 1963; Villa, 2006), mientras que *Pythium*, en sus esporangios produce primero una vesícula, hacia donde se traslada el protoplasma y se produce la diferenciación de las zoosporas (Romero, 1993). No obstante, ambos producen oosporas y micelio cenocítico, ambos tienen células diploides y anteridios, antes de la formación de oosporas (Villa, 2006).

1.1.4.1 *Pythium* sp.

Los oomicetos fitopatógenos originan grandes pérdidas en la producción de hortalizas, plantas ornamentales y forestales. El ciclo de vida de los oomicetos transcurre entre las plantas hospederas y el suelo, por lo tanto, la supervivencia y patogenicidad de los oomicetos depende de las condiciones ambientales (humedad y temperatura) y de las características intrínsecas de resistencia de las plantas (Agrios, 1997).

Pythium causa el ahogamiento de las plántulas, la pudrición de la semilla, raíz y frutos carnosos además de otros órganos, que se encuentran en contacto con el suelo (Agrios, 1997).

Cuando una planta es atacada por especies fitopatógenas de *Pythium*, las hifas penetran los tejidos mediante la actividad de las celulasas. Una vez que logran colonizar el tejido, forman estructuras reproductivas para generar oosporas (Allen *et al.*, 2004). Las oosporas son estructuras de resistencia que permiten que *Pythium* sobreviva en el suelo hasta que vuelva a infectar una nueva planta.

Las oosporas son el producto sexual de la fusión de un oogonio y uno o varios anteridios (Figura 1.3). Algunos reportes sugieren que la reproducción de *Pythium* es homotática, es decir, que no se requiere otro organismo para poder producir estructuras reproductivas; no obstante, también se han encontrado casos de reproducción heterotática (para la reproducción sexual se requiere la unión de dos organismos diferentes que poseen de gametos compatibles) (Ko, 2008). Se ha reportado que la presencia de fitoesteroles promueve el desarrollo de oosporas (Ayers *et al.*, 1976; Ko, 1998), por lo que son empleados para el aislamiento y cultivo de este oomiceto en laboratorio.

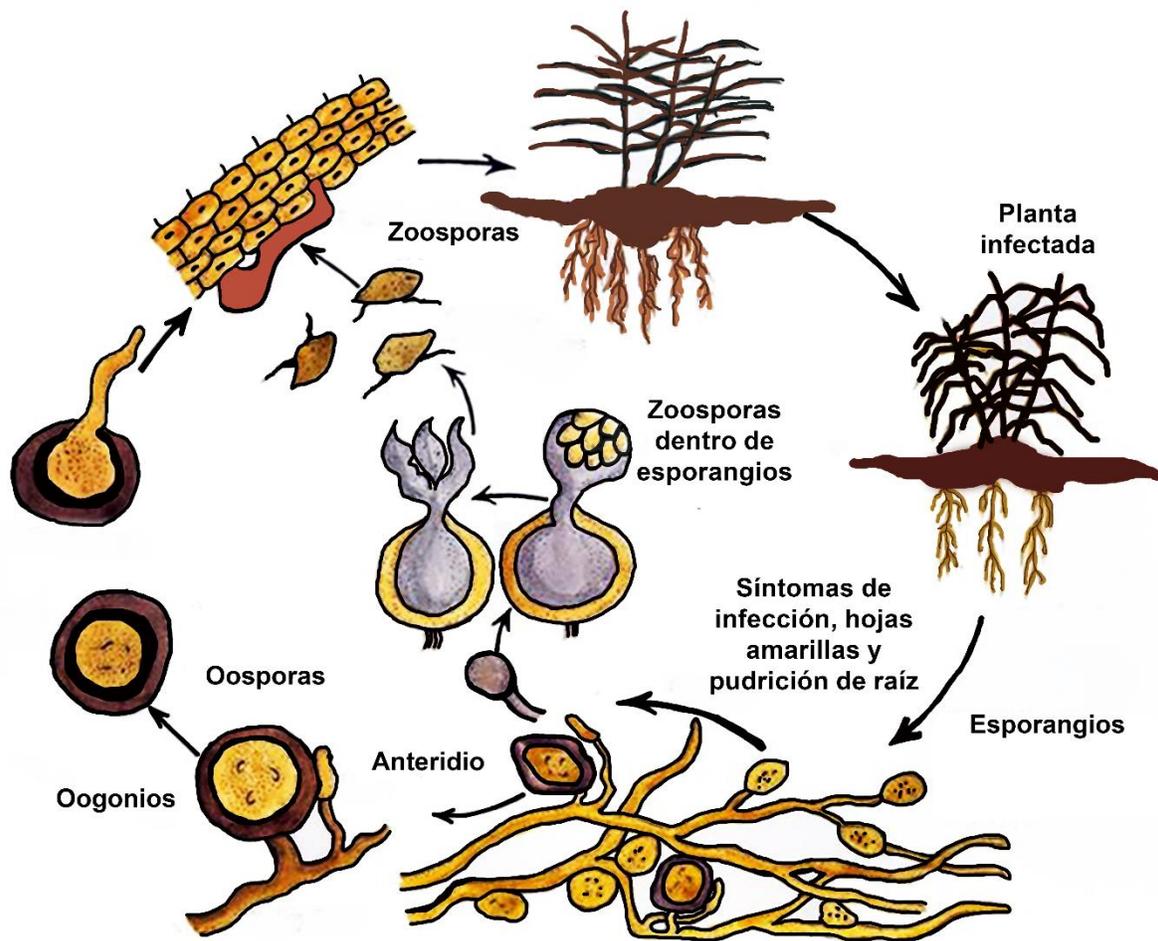


Figura 1.6 Ciclo de vida de *Pythium* spp. El ciclo reproductivo del género *Pythium* puede llevarse a cabo por dos vías, la reproducción asexual y la reproducción sexual. En la reproducción asexual, los esporangios dan lugar a la formación de vesículas, donde se almacenan las zoosporas y son liberadas durante la infección; por otra parte, la reproducción sexual se lleva a cabo con el desarrollo de un oogonio (gametos femeninos) y un anteridio, el que realiza la fecundación, que va a dar origen a las oosporas y, durante la germinación, infectar al hospedero (Allen *et al.*, 2004).

1.1.4.2 *Pythium ultimum*

P. ultimum es un patógeno vegetal ubicuo y uno de los más patogénicos en especies de cultivo (Martin, 2009). No requiere otro tipo de apareamiento para la reproducción sexual, ya que es autofértil, es decir, homotálico. *P. ultimum* se divide en dos variedades: *P. ultimum* var. *ultimum* es el grupo más común y produce oosporas, pero muy raramente esporangios y zoosporas, mientras que *P. ultimum* var. *sporangiferum* es un grupo raro y

menos patogénico que produce tanto oosporas como esporangios.

Las oosporas germinadas crecen rápidamente y colonizan las plantas huésped produciendo hifas (Burki *et al.*, 2008). La infección por *P. ultimum* causa graves pérdidas económicas.

Los genomas de varios oomicetos patógenos de plantas han sido secuenciados, incluidas tres especies de *Phytophthora* (*P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum*) (Francis y St Clair, 1993). Esto permite la identificación de genes de patogenicidad y una mejor comprensión de los mecanismos de infección de estos organismos, especialmente con respecto al repertorio de moléculas efectoras que rigen el resultado de la interacción planta-patógeno.

El genoma de *P. ultimum* (42.8 Mb) codifica 15, 290 genes y tiene una gran similitud de secuencias, con especies de *Phytophthora*, incluido el patógeno *Phytophthora infestans*, causante del tizón en la papa. La secuenciación completa del transcriptoma de *P. ultimum* reveló la expresión del 86% de los genes, muchos de ellos con expresión diferencial bajo estrés abiótico y en presencia de un huésped (Lévesque *et al.*, 2010).

Lévesque y colaboradores en 2010, publicaron el genoma de *P. ultimum*. El proteoma predicho incluye un gran repertorio de proteínas involucradas en las interacciones de los patógenos con las plantas, aunque, sorprendentemente, el genoma de *P. ultimum* no codifica ningún efector RXLR clásico, pero si a unos pocos efectores Crinkler, esto en comparación con otros oomicetos fitopatógenos.

Se identificaron un número menor de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos; no se encontraron cutinasas, lo que sugiere que la degradación de cutina de las plantas no es un mecanismo de penetración de *P. ultimum*, lo que nos indica una forma diferente de infección en comparación con otras especies de oomicetos. *P. ultimum* mostró nuevas características en su proteoma, incluida la expansión de genes implicados en la proteólisis y de genes únicos de *Pythium* como las perforinas, que generan poros en la membrana plasmática, con la finalidad de incorporar sus efectores en el huésped. También se identificó una pequeña familia de genes de cadherinas, proteínas implicadas en la adhesión celular, el primer reporte de éstos en un genoma diferente de los metazoos.

1.1.4.3 MODO DE INFECCIÓN DE *P. ultimum*

El repertorio de genes dentro del genoma de *P. ultimum*, refleja su estilo de vida patogénico (Figura 1.7). *P. ultimum* es un patógeno oportunista de plántulas jóvenes y raíces de plantas con poca o ninguna cutícula o tejido fuertemente suberizado, lo cual es consistente con la falta de genes codificadores de cutinasa en éste oomiceto. Es un competidor pobre contra los invasores secundarios de tejidos vegetales dañados y organismos del suelo con mejor capacidad saprófita (Campion *et al.*, 2009).

En el genoma de *P. ultimum* se encuentran genes que codifica celulasas y pectinasas que facilitan la penetración inicial y la infección del huésped, pero en cultivo in vitro no parece utilizar estos polisacáridos de plantas como una importante fuente de carbono y carece de la capacidad de degradar de manera efectiva otros polisacáridos como el xilano (Chérif *et al.*, 19991) y quitina (Boudjeko *et al.*, 2006). Como un patógeno primario, que generalmente inicia la infección, *P. ultimum* probablemente tiene acceso de primera mano a carbohidratos fácilmente degradables como el almidón y la sacarosa.

Tras el agotamiento de estas fuentes de carbono, *P. ultimum* parece centrarse en la reproducción rápida y la producción de estructuras de supervivencia (Campion *et al.*, 1997), en lugar de cambiar su metabolismo hacia la utilización de las fuentes de carbono más difíciles, como los polisacáridos de la pared celular de la planta. Curiosamente, el arsenal de enzimas de *P. ultimum*, dirigido a carbohidratos vegetales, es sorprendentemente similar al encontrado en el genoma del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* (Abad *et al.*, 2008), un patógeno de la raíz que también carece de xilanasas, pero que tiene una alta capacidad de degradación de pectina. En resumen, el acceso a la secuencia del genoma de *P. ultimum* ha ayudado a resolver las hipótesis sobre la patogénesis y los mecanismos de supervivencia de este oomiceto ha permitido avanzar en la comprensión de los eventos que ocurren en la interfaz planta-patógeno, especialmente durante la necrotrofia.

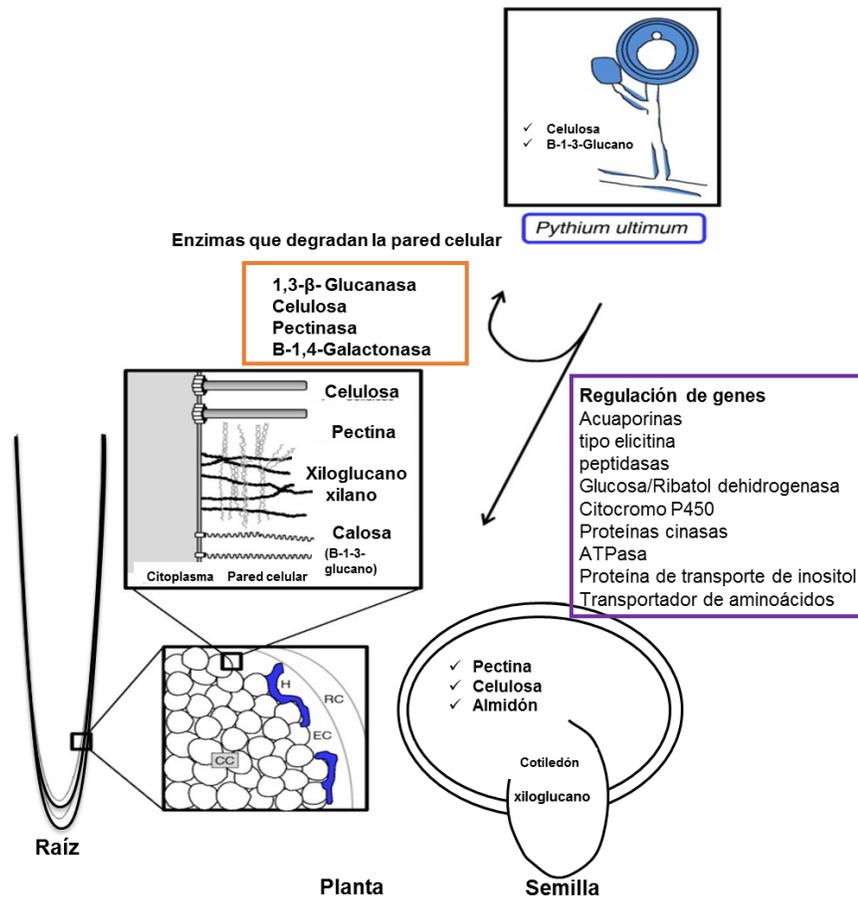


Figura 1.7 Proceso de infección en plantas causado por *P. ultimum*. El patógeno secreta proteínas necesarias para la degradación de los polisacáridos de la pared celular de la planta y azúcares de almacenamiento (recuadro naranja). *P. ultimum* puede modificar la expresión de genes de la planta (recuadro morado). Modificado de Lévesque *et al.*, 2010.

1.1.5 GENERALIDADES DE *Capsicum chinense* Jacq.

C. chinense Jacq. (Figura 1.8), pertenece a la familia de las Solanaceas; el género *Capsicum*, es originario de Suramérica, aunque también es ampliamente conocido en el sureste mexicano, donde forma parte de la gastronomía regional. El chile habanero es uno de los que presenta mayor pungencia o picor en el mundo, su contenido de capsaicina está entre las 200,000 a 500,000 unidades “Scoville” (Bosland, 1996; Long-Solís, 1998; Ramírez

et al., 2005). El contenido de capsaicina ha sido determinante en el incremento de la demanda de esta especie de chile en el mercado nacional e internacional. La capsaicina tiene amplio uso en la medicina, los cosméticos, las pinturas, los gases lacrimógenos y las salsas (Soria-Fregosa *et al.*, 2002; Salazar-Olivo *et al.*, 2004).

En México, los estados que producen el chile habanero son Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Sonora, Veracruz, Chiapas y Baja California Sur. La mayor superficie cultivada se encuentra en el estado de Yucatán con un 73% (708.43 ha) del total de la superficie sembrada (SIAP-SAGARPA, 2007). En 2010, Yucatán promovió ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), la denominación de origen, por lo que únicamente el chile habanero y sus derivados (como son las salsas) producidos en el estado, ostentan la denominación “Chile Habanero de Yucatán” (SIAP-SAGARPA, 2012).



Figura 1.8 Frutos de *C. chinense* Jacq., variedad naranja.

1.1.5.1 IMPORTANCIA Y USOS DEL CHILE HABANERO

La importancia económica del chile se basa principalmente en el uso de sus frutos. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el chile es, a nivel mundial, el quinto producto hortícola, por superficie cultivada. El interés por este cultivo no se centra únicamente en su importancia económica y consumo

humano; también se ha demostrado que el chile es una fuente excelente de colorantes naturales, minerales y vitaminas A, C y E (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). El chile habanero tiene gran demanda, ya que se considera dentro de los más picantes y aromáticos.

Además de su uso como alimento o condimento, es utilizado en medicina, debido a la presencia de capsaicinoides, particularmente la capsaicina que tiene un efecto antiinflamatorio y contrairritante. Existen productos farmacéuticos, hechos a base de extracto de chile habanero, que sirven para aliviar dolores musculares. También se usa en ungüentos, lociones y cremas de uso tópico para tratar problemas de dolor crónico relacionado con artritis, gota, neuralgias y cicatrices quirúrgicas. Del chile habanero se extraen oleorresinas, cuya aplicación, además en la industria alimentaria, se extiende a la industria química para la elaboración de pinturas, barnices y gases lacrimógenos.

1.1.5.2 FACTORES BIÓTICOS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE *C. chinense* Jacq.

La gran mayoría de las especies de chile son susceptibles al ataque de plagas y enfermedades (Figura 1.9), dichas enfermedades ocasionan fuertes pérdidas económicas a los productores. Estas pérdidas son variables año con año y dependen de las condiciones climáticas, manejo del cultivo, control químico y los insectos y malezas, pero dichas pérdidas pueden alcanzar el valor total de la producción si las condiciones son favorables para el patógeno (Vidales y Alcantar, 1989).

Diversos tipos de insectos ocasionan pérdidas económicas en cultivos de chile, por ejemplo: el barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii*) perfora los frutos, causando grandes pérdidas por atacar directamente el producto final; la pulga saltona (*Epitrix cucumeris*) que se alimenta del follaje de las plantas jóvenes; los trips *Frankliniella occidentales* y *Trips tabaci* L. que succionan los jugos celulares causando defoliación en las plantas; el pulgón (*Myzus persicae*) y la mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) los cuales se alimentan succionando la savia de las plantas hospederas causando un daño directo. No obstante, también son portadores de diferentes virus, tal es el caso del virus del mosaico del tabaco, virus Y de la papa, virus moteado del chile y virus huasteco del chile, entre otros, causando un daño indirecto (Uvalle, 1985; Greenleaf, 1986; Nuez *et al.*, 1996).

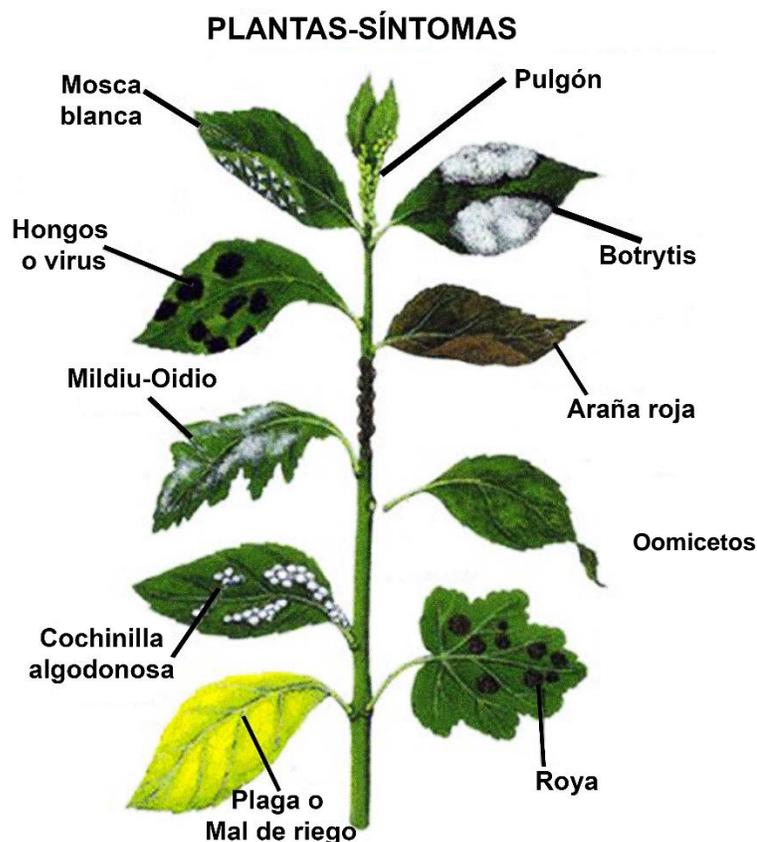


Figura 1.9 Principales plagas y enfermedades que afectan los cultivos de *C. chinense* Jacq. Se observan los diferentes tipos de plagas y sus características de infección. Por ejemplo, los hongos y virus forman necrosis en la parte afectada. Se observa el marchitamiento y oscurecimiento de las hojas, dependiendo del tipo de patógeno; adaptado de Villa-Castorena y colaboradores (2014).

Por otro lado, se encuentran las enfermedades conocidas como marchitez del chile, causadas por el oomiceto *Phytophthora capsici* L; el Damping-off causado por un complejo de microorganismos constituido por el oomiceto *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium*. Estos patógenos atacan los cultivos principalmente en la etapa de semillero, causando la muerte de las plántulas si no se combaten a tiempo. Los patógenos se pueden encontrar en el suelo o las semillas y su actividad se ve favorecida por la presencia de materia orgánica en descomposición y altos niveles de humedad; además, atacan a las plantas poco lignificadas (DeWitt y Bosland, 1993; Ochoa-Alejo y Ramírez, 2001).

Las bacterias *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas solanacearum*, causan marchitez prematura de las plántulas recién trasplantadas en el campo. También llegan a dañar los frutos, causando severas pudriciones y manchas; a causa de esto, algunos frutos son rechazados en el mercado, años tras año, provocando pérdidas del 30 al 40% de la cosecha (Nuez *et al.*, 1996; Ochoa-Alejo y Ramírez, 2001).

1.1.6 MODELO DE ESTUDIO

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq., que fueron obtenidas a partir de callos de hipocótilo de chile habanero de la variedad naranja (Gutiérrez-Carbajal, 2006).

Estudios realizados en el grupo de Investigación de la Dra. Hernández-Sotomayor, en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular en Plantas, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), han demostrado el efecto del ácido salicílico, como respuesta a la toxicidad por el aluminio (Cab-Guillén, 2011). Al evaluar suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq., se observó que la toxicidad por aluminio causaba un daño morfológico, ya que las células presentaron pérdida de turgencia y un incremento en el contenido de AS endógeno (Cab-Guillén, 2011).

Debido a que existen reportes de la participación del AS en procesos de defensa de estrés biótico y abiótico; en el trabajo antes mencionado se estudiaron los efectos de la aplicación de AS en suspensiones celulares expuestas a la toxicidad por aluminio. Se observó que la aplicación de AS favorecía el incremento de hasta 10 veces el contenido de AS endógeno y, a nivel morfológico las células expuestas a aluminio y AS simultáneamente no presentaron signos visibles de la toxicidad por aluminio, por lo que se sugiere que el AS está involucrado en el proceso de resistencia a la toxicidad por aluminio.

En la literatura consultada, no se encontraron trabajos que evaluaran suspensiones celulares y su relación con los efectos que causa la infección de *P. ultimum*; sin embargo, se ha reportado que el AS participa en los mecanismos de defensa contra diferentes patógenos, por lo cual, estamos interesados en estudiar la vía de transducción de señales en la interacción entre células de *C. chinense* y *P. ultimum*

1.1.7 JUSTIFICACIÓN

En México, los oomicetos son considerados entre los principales agentes que causan pérdidas en cultivos de importancia económica. En Yucatán, el género *Pythium* spp. afecta las plantas de chile habanero, principalmente en la etapa de semillero, causando la muerte de las plantas y pérdidas económicas importantes.

Estudios preliminares han demostrado que al aumentar el contenido de ácido salicílico (AS) en una línea de suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq., éste induce la tolerancia a estrés abiótico (Cab-Guillén, 2011). De igual manera, se ha demostrado que el AS participa como molécula de señalización en los mecanismos de defensa al estrés biótico en plantas (Vlot, *et al.*, 2009), activando la expresión de genes relacionados a la patogénesis en especial a *PR1* (Mou *et al.*, 2003; Pieterse *et al.*, 2014).

Por lo tanto, en este trabajo se estudiaron los cambios en los niveles de AS endógeno y la inducción de la expresión de genes *PR1* como respuesta al estrés biótico, mediante la infección de cultivos celulares de *C. chinense* Jacq. con *P. ultimum*.

1.1.8 PREGUNTA BIOLÓGICA

¿Cómo influye la infección de *P. ultimum* en el contenido endógeno del AS y en la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PR1*), en un cultivo *in vitro* de suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq?

1.1.9 HIPÓTESIS

Si la infección con *P. ultimum*. en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. induce un aumento en el contenido de AS, entonces esta respuesta modificará la expresión de genes relacionados con la resistencia a patógenos (*PR1*).

1.1.10 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto a la infección de suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. con *P. ultimum* y su efecto en los niveles del ácido salicílico endógeno y en la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PR1*).

1.1.10.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los cambios morfológicos en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*.
- Determinar el contenido de AS endógeno en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*.
- Evaluar la expresión de genes relacionados con la patogénesis (*PR1*) en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*.

1.1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

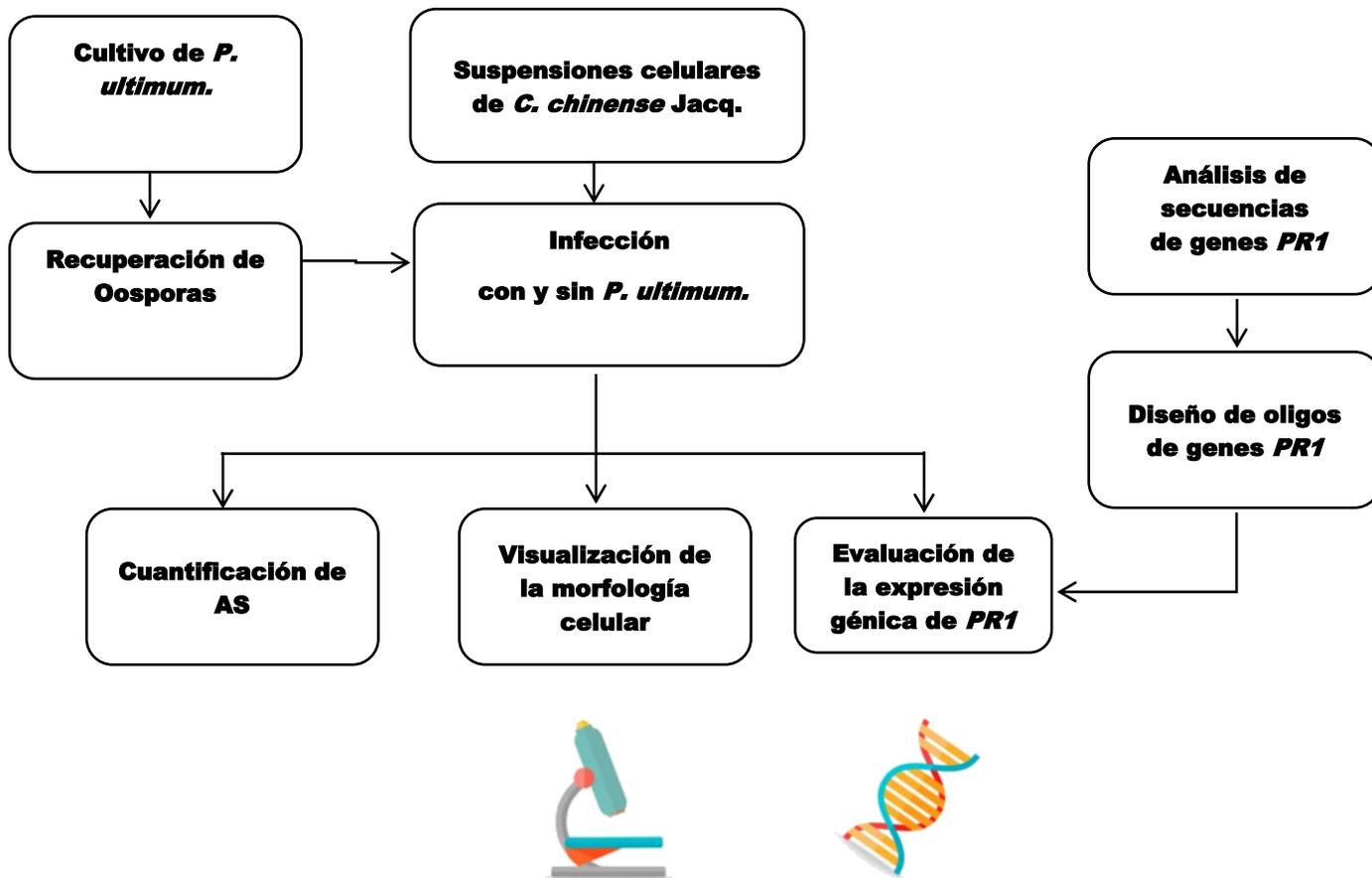


Figura 1.10 Diagrama experimental seguido en éste trabajo de investigación.

2. CAPÍTULO II

2.1 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Como material vegetal se utilizaron suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq., mantenidas en un medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962), pH 5.6 (Figura 2.1), complementado con 0.5 mM de mio-inositol, 0.02 mM de tiamina, 0.2 mM de cisteína, 4 μ M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 3% de sacarosa. Las células se subcultivaron cada 14 días, se incubaron a 25°C, con fotoperíodo de 24 horas en luz blanca y agitación constante de 100 rpm.



Figura 2.1 Suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. de 14 días de cultivo en un medio MS pH 5.6.

2.1.2 CEPA DE *P. ultimum*

En este mismo trabajo se utilizaron oosporas de *P. ultimum* para llevar a cabo la infección de las suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. La cepa de *P. ultimum* fue cultivada en un medio V8 Herdez® (Figura 2.2), que contiene 200 ml de jugo V8 Herdez® (jugo de tomate, apio, zanahoria, lechuga, espinaca, berros, betabel y perejil) y 23.5 g de agar bacteriológico (BD Bioxon) en un litro, la cepa se incubó por 7 días a 28 °C. Para la

recuperación de las oosporas, el cultivo de *P. ultimum* se resuspendió en 5 ml de agua estéril/glicerol (1:1 v/v).

Se realizaron raspados a toda la superficie de la caja con la ayuda de un portaobjetos, el material obtenido se filtró por medio de una gasa y se mantuvo almacenado por 1 hora a 37 °C y posteriormente a 4°C, esto con la finalidad de inducir la liberación de las oosporas, el conteo de estas se llevó a cabo como lo indica el proveedor de la cámara de Neubauer Improved de la marca Superior Marienfeld (Anexo I).

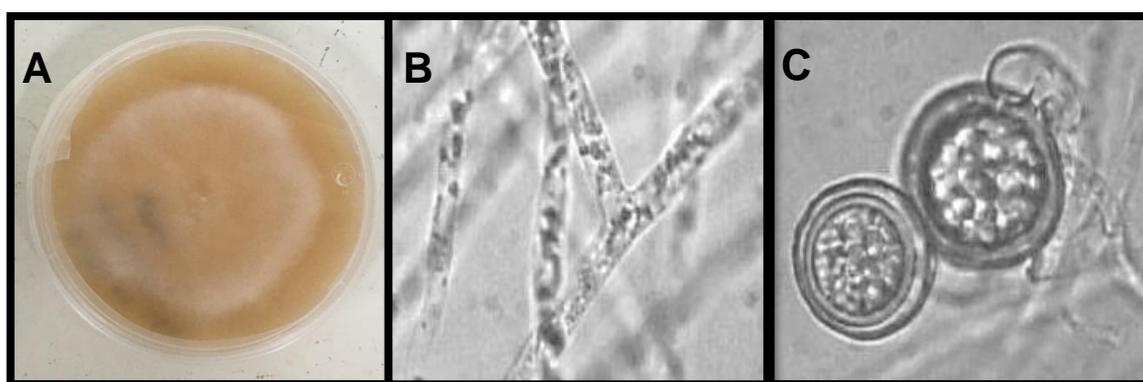


Figura 2.2 Estructuras morfológicas de *P. ultimum*. A) cultivo de *P. ultimum* en medio V8 de 5 días, B) micelio, C) oosporas.

2.1.3 CONDICIONES DE INFECCIÓN

Células de 14 días del ciclo de cultivo, fueron filtradas en papel filtro de poro mediano, enseguida, 1.5 g de células (peso fresco) se resuspendieron en 25 ml de medio de cultivo MS y se mantuvieron en agitación a 100 rpm a 25°C durante 12 horas, previo a la infección.

Posteriormente se realizaron las infecciones, adicionando una concentración de 1×10^4 oosporas de *P. ultimum*, para posteriormente tomar muestras de las células infectadas a 0, 0.5, 1, 6, 12, 24 y 48 horas después de la infección (hdi). Para el análisis de la viabilidad celular, cambios en la morfología celular, la cuantificación de AS endógeno y los niveles de expresión de *PR1a* y *PR1b*.

2.1.4 MEDICIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

La cuantificación de la viabilidad de las células de *C. chinense*, se realizó utilizando el Bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma). Las células viables con metabolismo activo convirtieron el MTT en un producto de formazan de color púrpura (Figura 2.3).

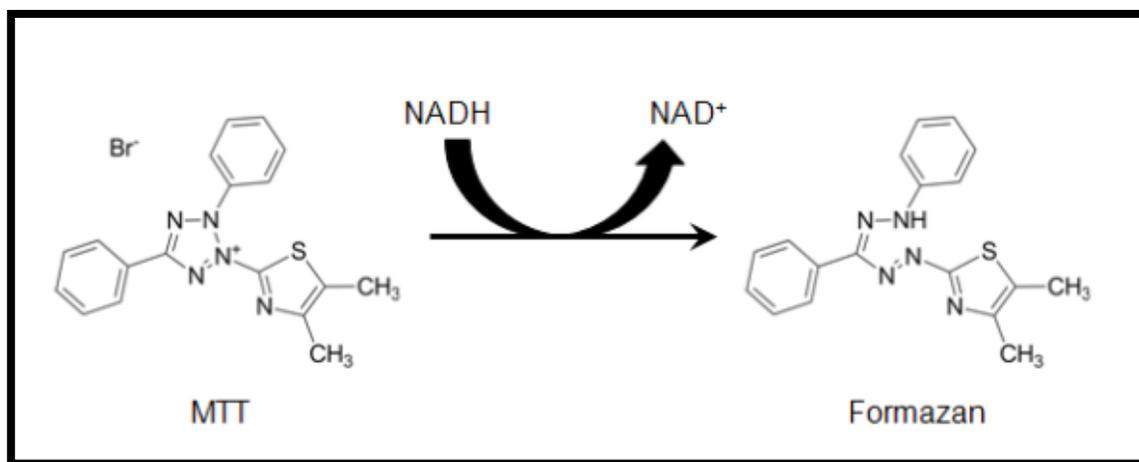


Figura 2.3 Estructura del Bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y el producto colorimétrico Formazan.

La cuantificación de la viabilidad por el método de MTT se realizó en suspensiones celulares de *C. chinense* de 14 días de cultivo, de acuerdo con la metodología de Castro-Concha y colaboradores (2006), con algunas modificaciones. Las células fueron preacondicionadas y sometidas a la infección con y sin oosporas de *P. ultimum*, se tomó 1 ml de las suspensiones celulares y se realizaron lavados con un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a un pH 7.5, se realizó una centrifugación a 1, 875 x g por 5 min, se resuspendieron las células en 1 ml del amortiguador, se adicionó 1.25 mM de MTT y se dejaron incubando durante 4 horas en oscuridad a 25 °C, en un orbitador parabólico.

Posteriormente se realizaron lavados con un amortiguador de fosfato para retirar el excedente del MTT y se centrifugó a 1, 875 x g por 5 min. Para la solubilización de las sales de formazan generadas, se añadió 1.5 ml de metanol al 50 % y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% (Sigma, Aldrich), se incubó por 30 min a 60 °C, se centrifugaron a 1, 875 x g por 5 min, se recuperó el sobrenadante y se cuantificó por espectrofotometría a 570 nm.

Como testigo de la conversión química de MTT a formazan se utilizaron células muertas, para ello se tomó una alícuota de 1 ml de suspensiones celulares, las cuales fueron expuestas a una temperatura de 80 °C por una hora. El método de MTT es un indicador de células vivas, por lo tanto, la cantidad de formazan generada es directamente proporcional al número de células viables (Figura 2.4).

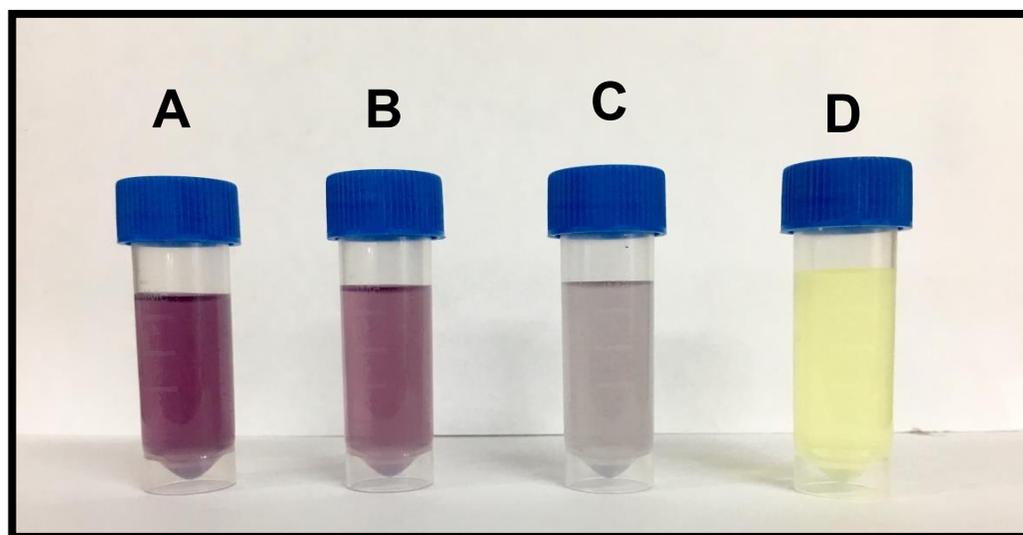


Figura 2.4 Viabilidad celular por medio de MTT. A) células sin infectar, B) células con 24 hdi, C) células con 48 hdi y D) células testigo (células muertas por exposición a calor).

2.1.5 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO

Para la cuantificación del AS, se realizó una extracción celular de *C. chinense* Jacq., las células se pulverizaron con nitrógeno líquido, y se adicionaron 800 μ l de una solución amortiguadora que contenía 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 250 mM sacarosa, 10 % de glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM pirofosfato de sodio, 0.2 mM ortovanadato de sodio, 1.24 mM de fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) y 1 mM β -mercaptoetanol, se homogenizaron con un politrón por 1 min y se centrifugó a 20,442 x g, durante 30 minutos a 4°C y finalmente el sobrenadante fue recuperado.

Para la extracción orgánica del AS se utilizó 0.5 ml del sobrenadante y se le adicionó 1 ml de HCl 1 M, se homogenizó por medio de un vortex por 1 min y posteriormente se le

adicionaron 2 ml de diclorometano/isopropanol (9:1 v/v), la mezcla se agitó por 5 min consecutivos por medio de un vortex, se centrifugó a 3,351 x g durante 5 min, posteriormente se recuperó la fase orgánica (parte inferior). La fase orgánica recuperada se concentró en un centrivap (DyNA Vap) a una presión de 400 mbar aproximadamente por una hora. El concentrado se resuspendió en 50 µl de un amortiguador de acetato de sodio pH 3.7/ metanol (72:28 v/v). La cuantificación del AS se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

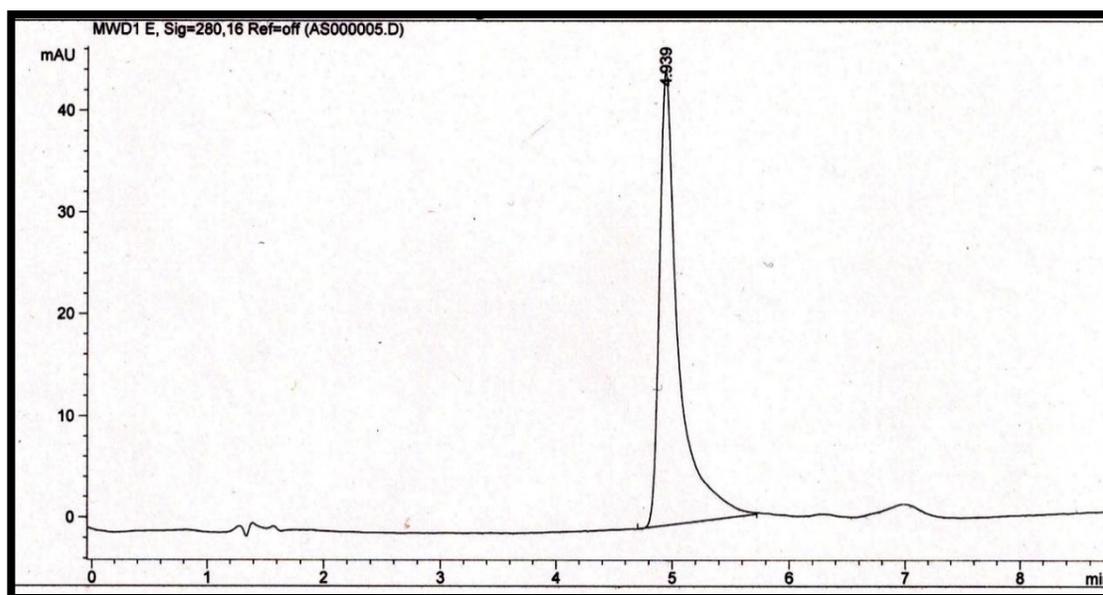


Figura 2.5 Cromatograma del estándar de ácido salicílico, con un tiempo de retención de 4.9 minutos.

Este análisis se realizó en un equipo Agilent 1100, utilizando una columna de intercambio iónico Eclipse XDB-C18 (4.6 X 150 mm). La elución se llevó a cabo utilizando una mezcla que contenía una solución amortiguadora de acetato de sodio pH 3.6/metanol (72/28 v/v) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 1 ml/ min a 25 °C. La cuantificación del AS se realizó utilizando una solución estándar de salicilato de sodio (Sigma Aldrich), la cual fue disuelta previamente en la solución de fase móvil y tiene un tiempo de retención de 4.9 minutos (Figura 2.5). Para la preparación de la curva estándar se utilizó un rango de concentración 0.02 a 1 µg/µl (Anexo II).

2.1.6 VISUALIZACIÓN DE LA MORFOLÓGICA CELULAR DE *C. chinense* Jacq.

Después de la infección de las suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. con *P. ultimum*, se tomó 1 ml de cada muestra, se realizaron lavados con un amortiguador de fosfato de sodio pH 5.6 y se centrifugo a 1 000 x g por 1 min. Posteriormente se tomaron 250 µl de cada muestra y se le añadieron 750 µl del amortiguador de fosfato, se realizó una agitación leve, posteriormente se adicionarán los fluorocromos de acuerdo con el orden del cuadro 2.1.

La tinción del núcleo se realizó con el 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se une a los pares de adenina-timina del ADN (Figura 2.6) (Molecular Probes, Inc, 2006). La pared celular fue teñida con blanco de calcofluor (CFW, por sus siglas en inglés) (Figura 2.7), este fluorocromo se une a la celulosa y quitina presentes en las paredes celulares de los organismos vegetales.

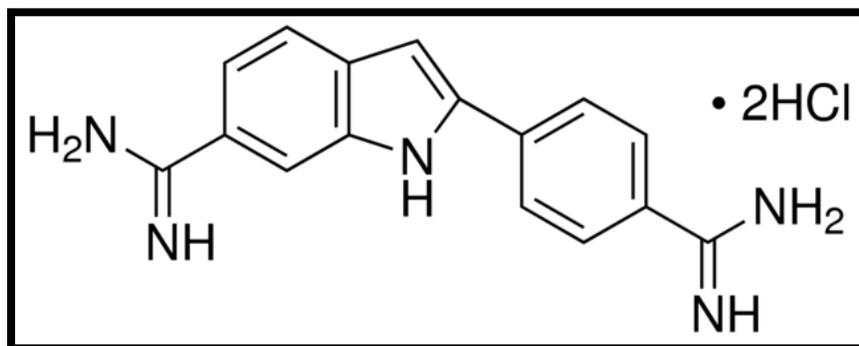


Figura 2.6 Estructura química de 4'6-diamidino-2-fenilindol.

Para la tinción de la membrana plasmática se utilizó el fluorocromo Cell Mask™ (Orange Plasma Membrane Stains) de Invitrogen™. Las condiciones para la observación de los diferentes fluorocromos utilizados se describen en el Cuadro 2.1.

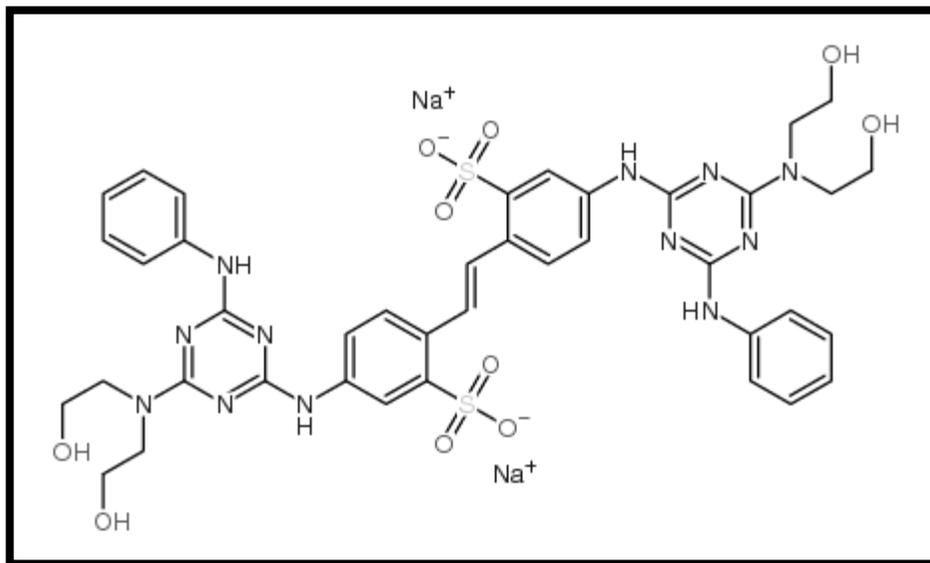


Figura 2.7 Estructura química de blanco de calcofluor.

Cuadro 2.1 Condiciones de la exposición de los fluorocromos para observar las estructuras celulares de *C. chinense* Jacq.

Fluorocromo	Localización	Concentración	Tiempo de exposición	Emisión/ Excitación
DAPI	Núcleo	1 μ M	30 min	358/461
Blanco de calcofluor	Pared celular	2 μ M	30 min	300/440
Cell Mask	Membrana celular	1X (como indica el proveedor, Invitrogen™)	15 min	554/567

2.1.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES *PR1*

2.1.7.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL POR MEDIO DE TRIZOL

Para la extracción del ARN total de las suspensiones celulares de *C. chinense* se siguieron las recomendaciones del proveedor (Trizol Reagent, Invitrogen). Aproximadamente a 100 mg de peso seco de las suspensiones celulares de *C. chinense*, se le agregaron 300 µl de Trizol, se homogenizó el tejido por medio de un pistilo, posteriormente se añadieron 300 µl de fenol pH 8.0 y 300 µl de una mezcla de cloroformo:isoamilico (1:1), se agitó vigorosamente por 1 min, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 15 min y se transfiere a un tubo eppendorf estéril la fase acuosa, en donde el ARN permanece soluble, la precipitación de los ácidos nucleicos se realizó adicionándole 200 µl de alcohol isopropílico (Sigma Aldrich). Las muestras fueron incubadas a -20°C durante 1 hora (Pech-Kú *et al.*, 2018).

Finalmente, el precipitado fue centrifugado a 12, 000 x g durante 15 min y la pastilla fue lavada con etanol (Sigma Andrich) al 70 % en agua/dietilpirocarbonato (DEPC), y se resuspendió en 30 µl de agua tratada con DEPC. La integridad del ARN se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 Volts durante una hora y la visualización se realizó con Gel-Red (Bioline). El gel se observó en un fotodocumentador de luz UV (Quantity One. V. 4. 2 Bio-RAD). La cuantificación del ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría a 260/280 nm en un Nanodrop 2000.

2.1.7.2 TRATAMIENTO CON DNAsa

Para el tratamiento con la DNAsa, a 2 µg de ARN total obtenido, se le adicionó 1 µl del amortiguador de reacción 10 x que contienen MgCl₂, 1 µl de DNAsa I libre de RNAsa 1U/ µl (Thermo Scientific), en un volumen final de 10 µl con agua DEPC. Posteriormente esta reacción fue incubada en un termociclador (Multigene™ mini) a 37 °C por 30 min, la reacción se detuvo con 1 µl de EDTA y se incubó a 65°C por 10 min. El ARN se utilizó para la síntesis de ADNc (ADN complementario).

2.1.7.3 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO

Al ARN libre de ADN contaminante, se le agregó 1 μl de iniciador (oligodT)₁₈ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Thermo Scientific), el volumen fue ajustado a 13 μl con agua libre de nucleasas. Se incubaron los tubos a 65°C durante 5 minutos y después a 4°C por 2 min.

Se le añadió 4 μL de 5X del amortiguador de la reacción (Thermo Scientific), 2 μl de dNTP 10 mM (Thermo Scientific) y 1 μL de transcriptasa reversa 200 U/ μL (Thermo Scientific) y los tubos se incubaron a 45 °C durante 50 minutos y a 70 °C durante 10 minutos por último a 4 °C por 2 min. El ADNc obtenido fue usado como templado para la reacción de PCR en tiempo real.

2.1.7.4 DISEÑO DE LOS INICIADORES DEL GEN *PR1*

Los iniciadores del gen *PR1a* y *PR1b* se diseñaron tomando en cuenta la secuencia reportada en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), del cual, fue diseñado un par de cebadores para cada gen a utilizar (Cuadro 2.2).

Para la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de los genes, se eligió al gen EF1a el cual tiene un perfil de expresión constante en las células y es adecuado para realizar la normalización de los datos de expresión (Andersen, 2003).

2.1.7.5 CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

Para la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó el ADNc (500 ng) como molde; 6 μl de Máxima SYBR Green/ ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Scientific), 0.5 μl iniciadores directo; 0.5 μl iniciadores reverso y aforado a un volumen de 12 μl con agua inyectable (Diluyente). Los parámetros para la amplificación fueron los siguientes: 50 °C por 2 min, 95 °C por 5 min, 40 ciclos de incubación con 95 °C por 30 seg, 52 °C por 10 seg y 72 °C por 30 seg. Finalmente se incubaron a 50 °C por 30 seg y 20 °C por 10 seg. Posteriormente se realizó el análisis de los datos por medio del software PikoReal 2.2.

Cuadro 2.2 Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes PR1a y PR1b. a) Forward y b) Reverse

Gen	Descripción del gen	Iniciadores	Tamaño teórico
PR1a	XM_016726851.1 PREDICTED: <i>Capsicum annuum</i> basic form of pathogenesis-related protein 1-like (LOC107879924)	a) 5' CCATTTTAGTTGCTTGTTTCCTTAC 3'	74
		b) 5' ATTTTGTTGTGGAGAATTTTGAGC 3'	
PR1b	XM_016686956.1 PREDICTED: <i>Capsicum annuum</i> pathogenesis-related leaf protein 6 (LOC107842907)	a) 5' CATTACTCGTTTGTCTCATCG 3'	91
		b) 5' TTGTGAACCGCAAGATAGTC 3'	
EF1α	XM_016694873.1 PREDICTED: <i>Capsicum annuum</i> eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma-like (LOC107850385), mRNA	a) 5' GATATTCTCATGGCTACAATGCTTAA 3'	127
		b) 5' GCATAATTTCAACAGCAGCTAAATG 3'	

3. CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

INTRODUCCIÓN

Las plantas se enfrentan constantemente a agentes microbianos que pueden causar enfermedades, como bacterias, hongos y oomicetos. Con el fin de defenderse y contrarrestar la infección de los patógenos, las plantas han desarrollado varios mecanismos de defensa como el engrosamiento de la pared celular, la producción de ROS, la síntesis de fitohormonas como AS, la expresión de genes PR y la muerte celular programada.

En la actualidad, los estudios que investigan la interacción entre patógenos y su huésped se basan principalmente en infecciones en plantas (Kamoun *et al.*, 2015), la desventaja es que una lesión se compone de diferentes zonas, que van desde una zona biotrófica en el borde de la lesión a una zona necrotrófica en el centro. Esta distribución hace que sea difícil recolectar material de una sola etapa específica de la infección (van West *et al.*, 1998). Además, debido al grosor de las hojas con capas de células y la autofluorescencia de la clorofila, los estudios por medio de microscopía son complicados de realizar.

Un modelo *in vitro* puede eliminar las desventajas de los estudios en plantas. Las células individuales podrían permitir un proceso de infección más sincronizado y mayor accesibilidad para estudios de microscopía. En diversos estudios se han utilizado cultivos de suspensión celular en lugar de plantas enteras. Las suspensiones celulares también se han utilizado con como un sistema para estudiar las vías de señalización y compuestos exógenos en las células vegetales.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un sistema de infección *in vitro* de suspensiones celulares de *C. chinense* para evaluar el proceso de infección por *P. ultimum*. Para ello se llevaron a cabo pruebas de viabilidad celular, que incluyeron la observación de los cambios morfológicos de las células y el análisis de la estimulación de la síntesis del AS y la inducción de la expresión de genes *PR*, como respuesta de defensa.

3.1.1 EFECTO DE LA PRESENCIA DE *P. ultimum* EN LA VIABILIDAD DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE *C. chinense* Jacq.

Las células son capaces de responder a la infección de patógenos y eso puede conducir las al suicidio (muerte) celular, por lo tanto, en este trabajo fue necesario evaluar el porcentaje de las células viables y parámetros como peso fresco, y peso seco para determinar el efecto de la inoculación con *P. ultimum* en las suspensiones celulares de *C. chinense*.

Para el análisis de la viabilidad celular, realizado por el método del MTT, como se describe en el apartado 2.1.4 de materiales y métodos, se encontró diferencias entre los porcentajes de la viabilidad en los diferentes periodos evaluados. Las suspensiones celulares no inoculadas (testigo), se tomaron como el 100% de la viabilidad.

Las suspensiones celulares inoculadas a las 0 hdi, no presentaron diferencia en la viabilidad celular entre las células testigo; mientras que a las 12 y 24 hdi, las células tuvieron un porcentaje de viabilidad del 15 y 20% respectivamente, y las células inoculadas durante 48 hdi, tuvieron una disminución de muerte celular del 45% respecto a las células testigo, como se puede apreciar en la Figura 3.1.

Por lo tanto, estos resultados nos indican que la concentración de oosporas utilizadas para la infección reduce la viabilidad celular aproximadamente un 50%. Esta reducción en la viabilidad, permite realizar pruebas relacionadas a la respuesta de las células en un período de tiempo de 48 hdi, el cual se fijó como período máximo a estudiar en esta investigación.

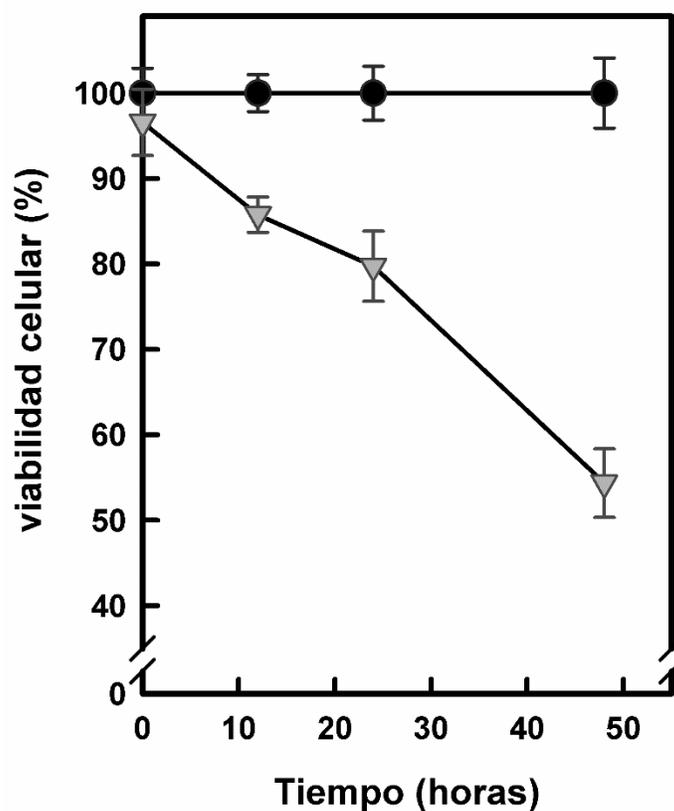


Figura 3.1 Comportamiento de la viabilidad celular de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*. Las células de 14 días, sin inocular (●) e inoculadas (▼) con 1×10^4 oosporas de *P. ultimum*. La viabilidad celular se determinó a diferentes tiempos después de la infección. Los datos son expresados en porcentaje de viabilidad tomando como el 100 % la viabilidad de las células no infectadas. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm ES.

En la Figura 3.2 se muestran los valores de peso fresco y seco de las células de *C. chinense* infectadas con *P. ultimum*. Los pesos obtenidos son expresados en porcentaje de peso tomando como 100% el peso seco o fresco de las células no infectadas.

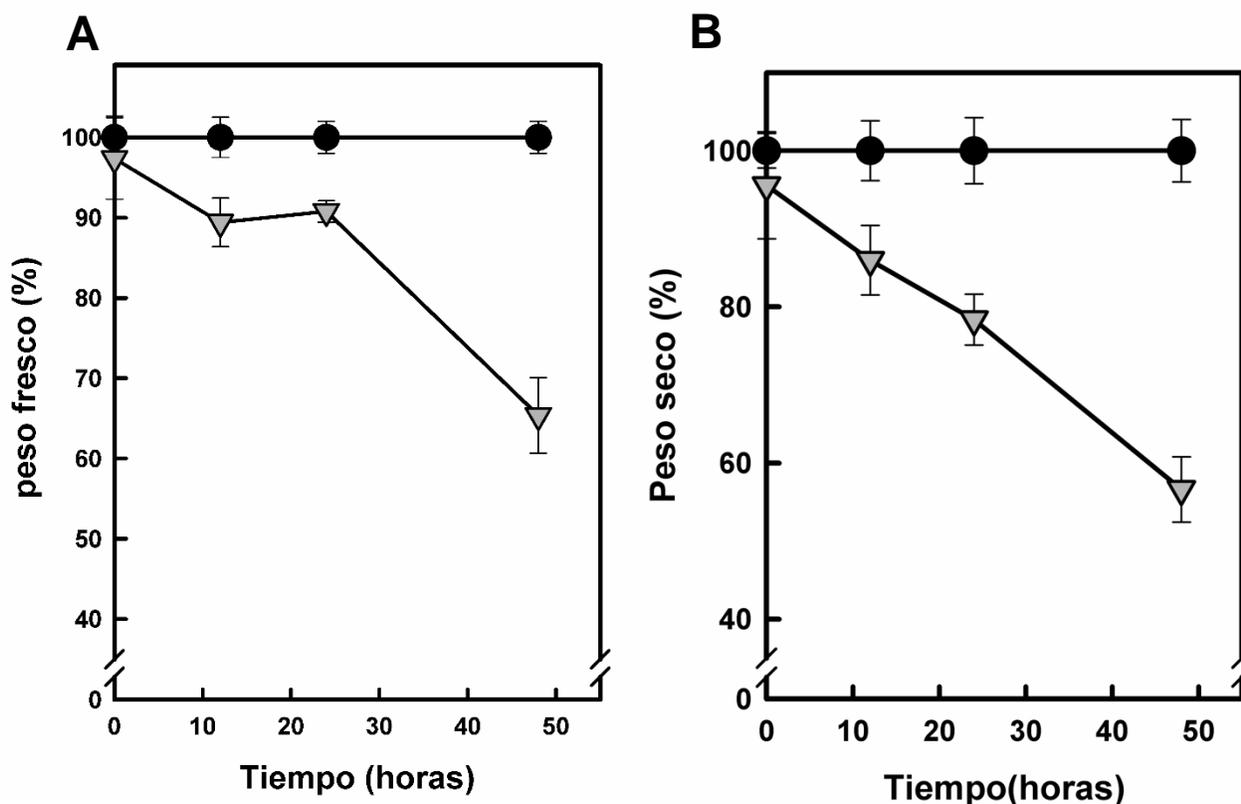


Figura 3.2 Efecto de la infección de *P. ultimum* en el crecimiento celular de *C. chinense* Jacq. Se evaluó un curso temporal de infección de *P. ultimum*, en un período de 0 a 48 hdi y se midió el porcentaje de peso fresco (A) y peso seco (B), en células de 14 días de su ciclo de cultivo. Células sin infectar (●) e infectadas (▼). Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes por triplicado \pm ES.

La Figura 3.2A muestra el comportamiento la biomasa en peso fresco de las suspensiones celulares después de la infección con *P. ultimum*. Se observa que en el tiempo 0 hdi, no hay una diferencia en el inóculo inicial de las suspensiones celulares infectadas y las células testigo; mientras que en tiempos de 12 y 24 hdi, no se observan cambios en la reducción de la biomasa en estos dos períodos evaluados, que fue de un 10% con respecto al testigo, y a las 48 hdi se observa una reducción de \sim 50% en la biomasa de las células infectadas.

Para el caso del peso seco (Figura 3.2B), los resultados indican que en células infectadas con *P. ultimum* el peso seco sigue un patrón de decremento similar al observado en el peso fresco.

En conjunto, estos resultados nos sugieren que a las 48 hdi, las oosporas de *P. ultimum* están generando una reducción cercana al 50% en el crecimiento de las suspensiones celulares de *C. chinense*. Sin embargo, las células infectadas en periodos de 12 y 24 hdi no tuvieron diferencia en el porcentaje de peso fresco, mientras que en peso seco, si se aprecia una diferencia en el peso, por lo cual, esto nos indica que las células están reteniendo agua, como parte de su respuesta a la infección de *P. ultimum*.

3.1.2 EFECTO DE LA INFECCIÓN DE *P. ultimum* EN LA MORFOLOGÍA CELULAR DE *C. chinense* Jacq.

Para la visualización de los cambios que podría generar la infección de *P. ultimum* sobre la morfología celular de *C. chinense* Jacq., se utilizó microscopia de epifluorescencia, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.5 de este documento.

Las células analizadas provenían del día 14 de su ciclo de cultivo y fueron previamente acondicionadas en un medio fresco por 12 horas, posteriormente se realizó la infección con una concentración de oosporas de 1×10^4 y se evaluó en diferentes tiempos después de la infección tal como se describió en la sección de materiales y métodos.

Las micrografías tomadas en campo claro (Figura 3.3A), muestran una agrupación de células, donde las células testigo presentaron una estructura definida, con la delimitación de la pared celular, turgencia adecuada y tuvieron un desarrollo estable durante los tiempos de infección. En las células que fueron infectadas se observaron cambios en la morfología celular conforme transcurre el tiempo de infección. En color naranja se aprecia la delimitación de la membrana plasmática (Figura 3.3B) y en azul la delimitación de la pared celular y los núcleos (Figura 3.3C).

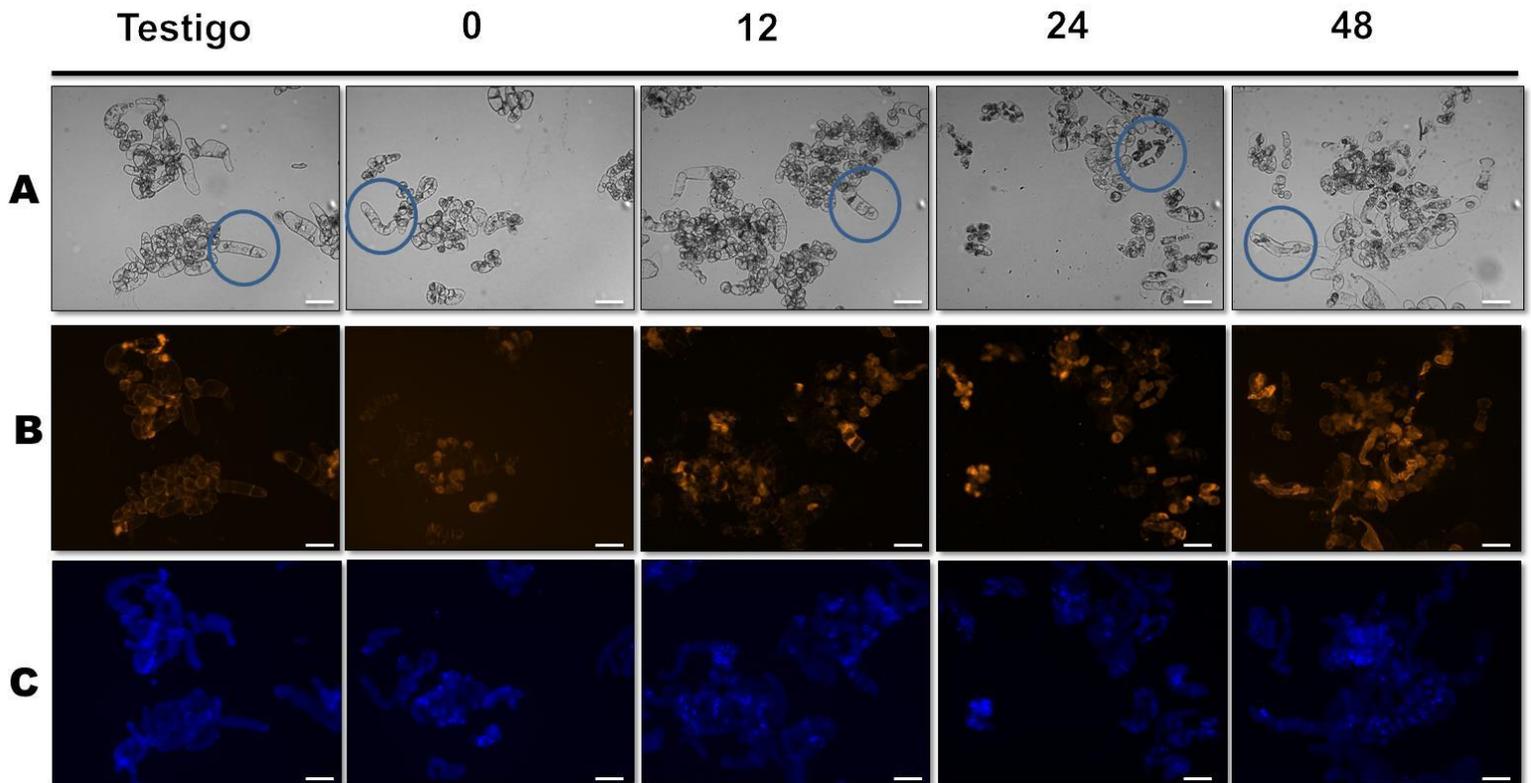


Figura 3.3 Morfología celular de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*. Las células fueron infectadas con el patógeno durante un período de 0 a 48 hdi. Posteriormente fueron observadas por medio de microscopía de epifluorescencia. A) campo claro, B) tinción de membrana plasmática y C) tinción de la pared celular y el núcleo. Estas micrografías son representativas de tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan 10 μm .

Un análisis más cercano de las células para determinar por medio de microscopía de campo claro las estructuras que están sufriendo modificaciones. Las células testigo son alargadas, cilíndricas y generalmente se agrupan en forma de cadenas (Figura 3.4A). Las células testigo presentan una buena composición en forma, tamaño y adecuada turgencia. En contraste, en las células infectadas conforme aumenta el tiempo de la infección se puede observar que la estructura celular se ve modificada, siendo la membrana plasmática afectada a partir de las 12 hasta las 48 hdi (Figura 3.4A), donde se observa que las células presentaron un desprendimiento y contracción de la membrana hacia el interior de la célula.

En la Figura 3.4B, una contracción y separación de la membrana plasmática de la pared

celular son visualizados a partir de las 12 hdi. Además, fue posible apreciar los límites de la pared celular, sin embargo, entre las 12 y 48 hdi es notoria una disminución en la coloración de la pared celular, esto posiblemente porque se esté llevando un proceso de degradación de la pared celular como consecuencia de la infección de *P. ultimum*. Por otra parte, a las 48 hdi se puede visualizar que existen daños irreversibles en las principales estructuras celulares como la membrana plasmática y la fragmentación de los núcleos (Figura 3.4C).

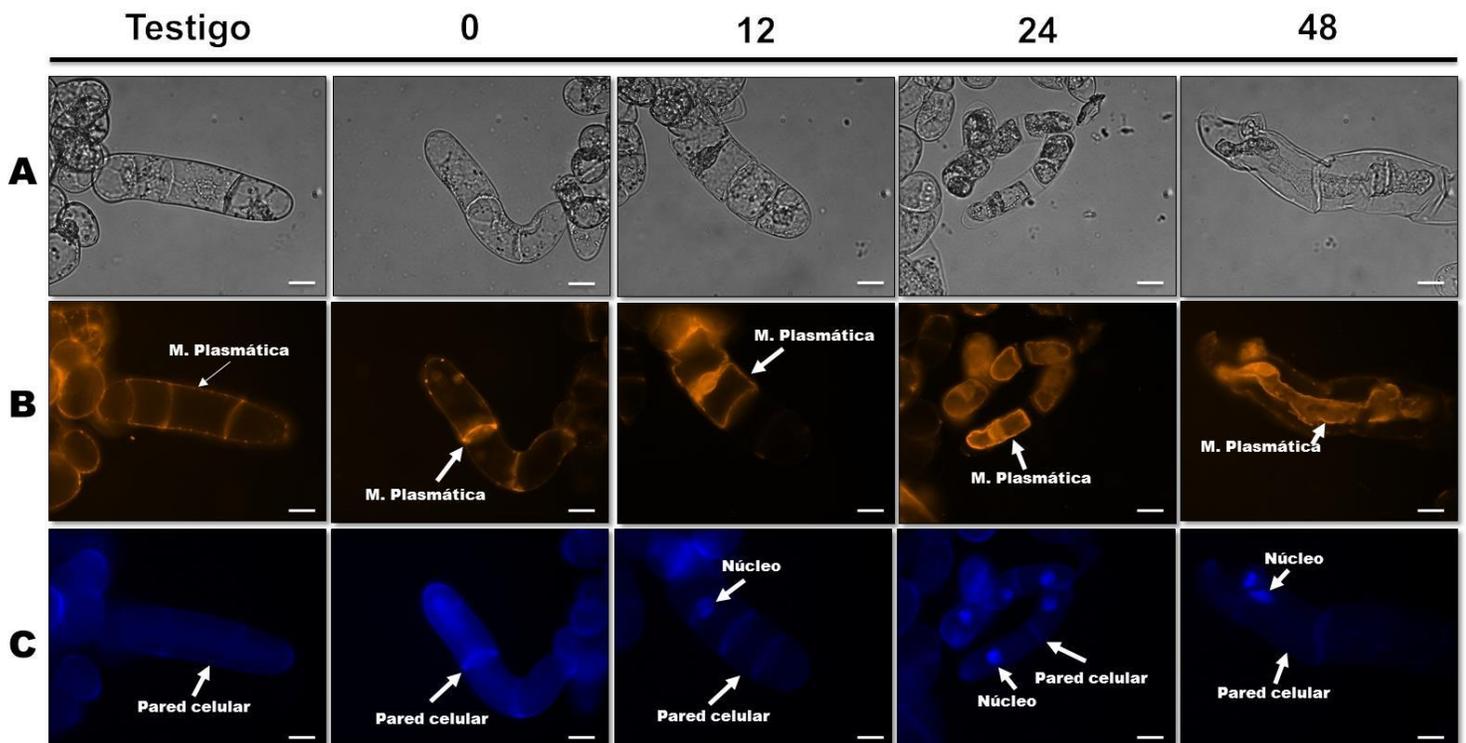


Figura 3.4 Efecto de la infección de *P. ultimum*. en la morfología celular de *C. chinense* Jacq. Células de 14 días de su ciclo de cultivo fueron infectadas con 1×10^4 oosporas por diferentes períodos de tiempo. A) campo claro, B) membrana plasmática y C) pared celular y núcleo. Estas imágenes son representativas de tres experimentos independientes por triplicado. Las barras representan 20 μm .

En la Figura 3.5, se observan las hifas de *P. ultimum* infectando a las células de *C. chinense* a las 48 hdi, se aprecia la penetración de las hifas en las células (Figura 3.5C) y la formación de esporangios de *P. ultimum* (Figura 3.5B, flecha azul), como evidencia de que se está llevando a cabo una reproducción de *P. ultimum* y una infección exitosa.

Estos resultados sugieren que la infección por *P. ultimum* genera daños irreversibles a las células de *C. chinense*, con daños en las estructuras principales de las células e inician con la degradación de la pared celular, la contracción de la membrana plasmática, la pérdida de turgencia, hasta ocasionar daños más severos como es la afectación de la estructura nuclear (Figura 3.4 y Figura 3.5).

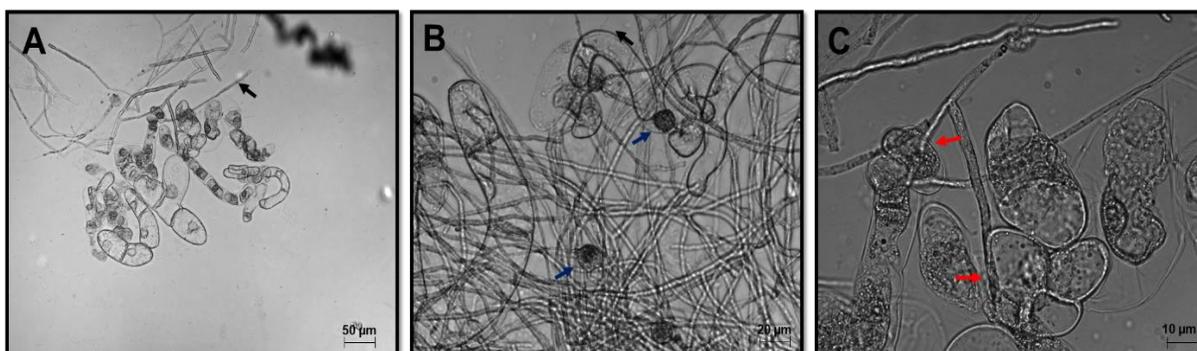


Figura 3.5 Células de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*. Células de 14 días fueron infectadas con 1×10^4 oosporas durante 48 horas. A) las hifas de *P. ultimum* (flecha negra) y el grupo de células, B) esporangios (flechas azules) y c) células infectadas (flechas rojas).

En base en resultados obtenidos de las micrografías (Figura 3.3), se realizó el conteo de un total de 100 células por experimento y se determinó el porcentaje de células dañadas, este resultado se muestra en la Figura 3.6 y se observa que existe un patrón ascendente del porcentaje de células dañadas, conforme transcurre el tiempo de la infección. Entre las células que no fueron infectadas y las del tiempo 0 hdi, no hay una diferencia en el porcentaje de células dañadas, el cual fue de aproximadamente 10%; en contraste, a las 12 y 24 hdi, hubo un porcentaje de células dañadas del 19 y 25% respectivamente, al final de la evaluación de 48 hdi, se observó que el 45% de células infectadas presentaron evidencias de daño en la estructura de la membrana plasmática.

Estos resultados nos indican que la infección de *P. ultimum* en suspensiones celulares de *C. chinense*, tiene efectos iniciales sobre la integridad celular, lo que deriva en posible proceso de muerte celular y después de la evaluación de la viabilidad celular, encontramos evidencia de una reducción de las células viables. Esta observación de la muerte celular en nuestro cultivo puede llevarnos a sugerir, que en una planta completa este proceso de muerte celular puede formar parte de un mecanismo de respuesta necesaria frente a la

infección por este patógeno (Fu *et al.*, 2012).

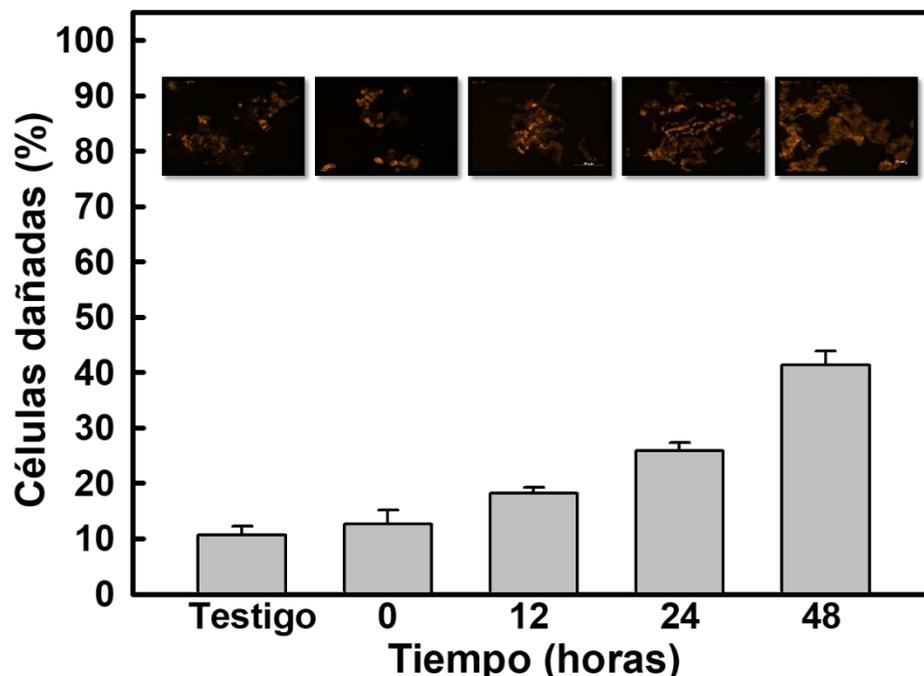


Figura 3.6 Evaluación de las células viables de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*. El porcentaje de daño se evaluó contando las células teñidas de naranja (membrana plasmática) durante un período de tiempo. Esto se presenta en las imágenes de microscopía (parte superior). El número total de células fue ajustado al 100%.

3.1.3 EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO SALICÍLICO ENDÓGENO EN SUSPENSIONES CELULARES DE *C. chinense* Jacq. INFECTADAS CON *P. ultimum*.

El AS es conocido por su actividad regulatoria en plantas, principalmente en participar como molécula de señalización durante el ataque por patógenos. Con la finalidad de evaluar la modificación del contenido de AS total en celulares de *C. chinense* infectadas con *P. ultimum*, se llevó a cabo la cuantificación del AS total en células de 14 días de su ciclo de cultivo, que fueron infectadas con 1×10^4 oosporas. La evaluación se realizó en períodos cortos (minutos) y largos (horas). La extracción y cuantificación de AS se realizó como se describe en el apartado de materiales y métodos.

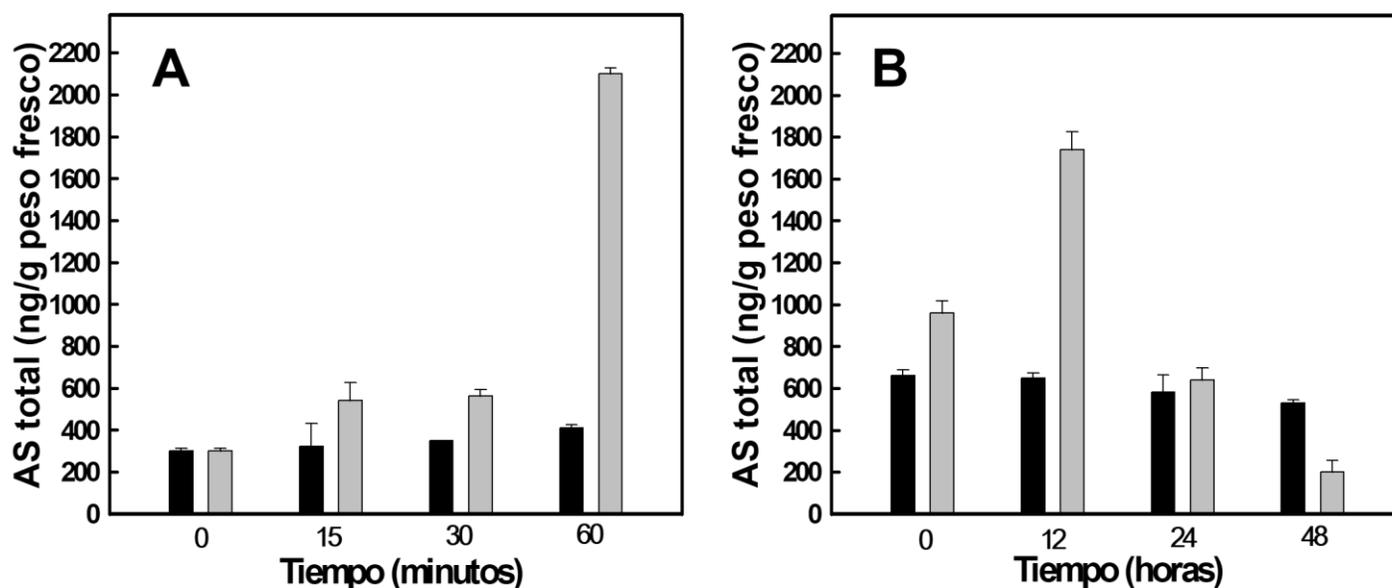


Figura 3.7 Evaluación del contenido endógeno de ácido salicílico en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. infectadas con *P. ultimum*. Las células de 14 días de su ciclo de cultivo fueron infectadas con una concentración de 1×10^4 oosporas por diferentes períodos. Células sin infectar (■) y células infectadas (■). El contenido del AS total se evaluó minutos después de la infección (panel A) y horas después de la infección (panel B). Los datos representan dos experimentos independientes por triplicado \pm ES.

Los resultados de la cuantificación de AS total en células de *C. chinense* (Figura 3.7), muestran que los niveles de AS endógenos se ven modificados por la presencia de oosporas de *P. ultimum*, en un período de 60 minutos después de la infección (mdi), donde se observa que el contenido del AS total a los 15 y 30 mdi aumentó el doble comparado con el contenido basal (Figura 3.7A), alcanzando un pico máximo de 5 veces más el contenido del AS a los 60 mdi en comparación con los niveles basales del AS que contienen las células no infectadas.

En la Figura 3.7B se presenta la cuantificación del AS total en los períodos 12 a 48 hdi, donde se observó que a las 12 hdi, las células que fueron infectadas alcanzaron un pico máximo de 2.5 veces más en contenido del AS en comparación con las células testigo, y conforme avanzaba el tiempo este contenido del AS disminuyó hasta que a las 24 hdi

alcanzó niveles basales y, al finalizar la evaluación a las 48 hdi el contenido de AS total de las células infectadas disminuyó a la mitad.

El aumento del AS a los 60 mdi y a las 12 hdi, permite sugerir que el AS es sintetizado como parte de la respuesta de señalización que están llevando a cabo las células ante el reconocimiento de *P. ultimum*.

3.1.4. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL EN CÉLULAS DE *C. chinense* Jacq.

La extracción de ARN total es uno de los procesos claves para el estudio de la expresión de genes. Con el ARN total se inició el proceso de la síntesis del ADNc, que se utilizó posteriormente para la amplificación de los genes que codifican para la *PR1a* y la *PR1b*. Para este procedimiento fue de suma importancia prevenir la contaminación por ADN y la degradación del ARN.

Para lograr la síntesis del ADNc es necesario verificar la integridad del ARN total, esta se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa y fue observada en un foto documentador de luz UV. La concentración del ARN después de los tratamientos con la DNAsa fue de aproximadamente 650 ng/ μ l.

El ARN total, extraído de las células de *C. chinense* se muestra en la Figura 3.8; del carril 1 al 3, podemos observar que el ARN se encuentra contaminado con ADN genómico, por tal motivo, se realizaron los tratamientos con DNAsa de cada una de las muestras. En los carriles del 4 al 6 se observó que después del tratamiento con DNAsa, las muestras de ARN no presentaron contaminación por ADN genómico (Figura 3.8). Además, se presenta la evidencia de que las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 28S y, 18S siguen una relación ~ 2:1 lo que sugiere suficiente calidad del ARN para ser utilizado para la síntesis del ADNc.

Cuadro 3.1 Concentración de ARN total y rango de pureza.

Muestra	Concentración ng/μl	Rango de pureza 260/280
1	693	2.01
2	580	1.89
3	765	1.93

3.1.4.1 DISEÑO DE LOS INICIADORES DEL GEN QUE CODIFICA PARA LAS *PR1a* Y *PR1b*

Con la finalidad de analizar la expresión de los genes que codifican para las *PR1a* y *PR1b* en *C. chinense* Jacq., se realizó la revisión de las secuencias en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]) y se encontró una secuencia para cada gen, tomando en cuenta estas secuencias se diseñaron los cebadores para cada uno de los genes. En la Figuras 3.9 y 3.10 se pueden observar las secuencias de cada gen y la ubicación de cada uno de los pares de iniciadores diseñados para las *PR1a* y *PR1b* respectivamente.

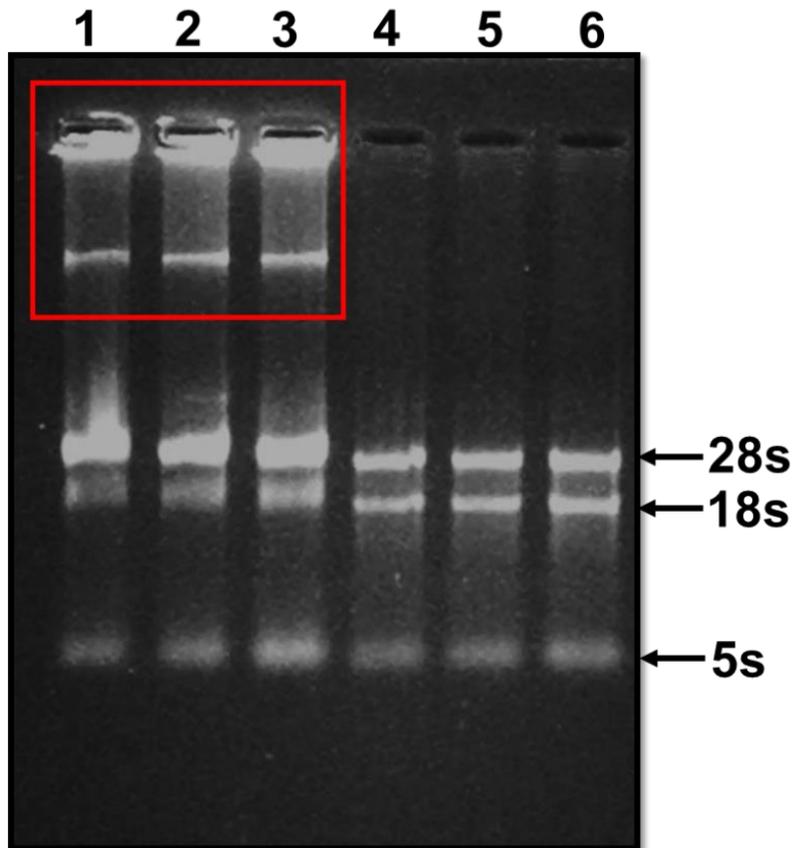


Figura 3.8 Extracción del ARN total de células de *C. chinense* Jacq. Células de 14 días del ciclo de cultivo, se realizó la extracción y separación electroforética de ARN (unidades 28S, 18S y 5S ribosomales), en gel de agarosa al 1% teñido con el Red 3x (Bioline). El ARN obtenido de las suspensiones celulares sin tratamiento con DNAsa (carril del 1 al 3), el recuadro rojo muestra la presencia de ADN genómico. El ARN tratado con la DNAsa (carril del 4 al 6). Los carriles 3 y 6 representan al ARN de células infectadas con 1×10^4 oosporas de *P. ultimum*.

PR1a >XM_016726851.1 PREDICTED: *Capsicum annuum* basic form of pathogenesis-related protein 1-like (LOC107879924) 848 bp

```

1  aaaatccatc cacagtatgc cttgttctca tcaaaacccg aaatggaata ctccatttta
61  gttgcttggt tccttacctt tgctatattt cattcatcac aagctcaaaa ttctccacaa
    CAPR1a1-FW                                CAPR1a1-REV
121  caaaattttc ttaacgctca caatgcagct cgtagacaag ttggagtcag ccctatgacg
181  tgggacaata ggcttgcagc ttatgcccaa aattacgcaa atcaaagaat tggtgactgc
241  ggtatggtcc actctcatgg ccatacggg gaaaacctag ccgccgcttt cccccagctc
301  aacgctgctg gagccgtgaa gatgtggttc gatgagaaga aatggtacga ttataattcg
361  aattcttgty caccaggaaa agtatgtgga cactatactc aagtggtytg gcgtaattca
421  gtacgtcttg gttgtgccag gtttcgatgc aacaatgggt gggtttttat aacgtgtaat
481  tatgatccac caggtaatta tataggacaa cgcccgtatg gtgatctgga agaacaacct
541  gcctttgatt ccaaattgga tcttccaact gatgtctaata tatgagttta cgtaatcaaa
601  tcatgaatga ataaagtctc aatgtgttaa ttaaataat aacaagtgtt attatgtgat
661  gttatcaatc ttctgatga gtttaatgat aatgtaatgg gtgcataggt aaatatatat
721  agtcgaaatt gatgtccata tatatatgga tcatttggac ccgtgcatct gaatgttagt
781  tgattaacca gtttatgtag agtcttttgt tgcttgattt ttattattgt atattctagt
841  tttaaadc

```

Figura 3.9 Secuencia del gen que codifica para la *PR1a* en *Capsicum annuum*. La ubicación de los iniciadores diseñados a partir de la secuencia del gen de *PR1a* en *Capsicum annuum*, se localizan entre los nucleótidos 50 y los 130. Se diseñaron los iniciadores denominados *PR1a-FW* / *PR1a Rev*, los cuales amplifican para un fragmento de 74 pb.

XM_016686956.1 PREDICTED: *Capsicum annuum* pathogenesis-related leaf protein 6 (LOC107842907)

```

1 attcataatc ataacaaaaa tatttctttt ttctcaacta gacctaaaac aaaatggggt
61 tgttcaacat tccattatta ctcgtttgtc tcatcgtatt ggccatattt cactcttgtc
      CAPR1b-FW
121 acgcccacaaa ttcacctcaa gactatcttg cggttcacia caacgcccggt gcccaagtcg
      CAPR1b-Rev
181 gagtcggggc tatgtcgtgg gatgcaggct tggcatctcg agcacaaaac tatgccaact
241 caagaactgg tgattgcaac ttgattcatt caggtgcagg ggagaacctt gcccaagggcg
301 gtggcgatta cacggggagg cgtgccgtgg agttgtgggt gtctgagaag cctaactata
361 accatgctac caaccaatgc gctggaggcg agtgcagaca ctatactcaa gtggctctggc
421 gcaactcagt tcgactaggt tgtggtcggg ctcgttgcaa caatgggtgg tggttcattt
481 cttgcaacta tgatcctgta ggcaactggg tcggacaacg tccttactaa actttgttac
541 ttatggcatg ttattcccat attaagcttg acaagtggat caggtcgatc tctgtctaag
601 atgttaaggg attaatgca cgtctataat tattattacc tttgatgttg cttgtataaa
661 taattccacg taccatattg tcatggtata gtggacataa gttgataatt aagtattgca
721 ccttcttggt tccataaaa

```

Figura 3.10 Secuencia del gen que codifica para la *PR1b* en *Capsicum annuum*. La ubicación de las regiones utilizadas para el diseño de los iniciadores que permiten amplificar al gen *PR1b*, se encuentran entre los nucleótidos 150 a 240. Los iniciadores *PR1b-FW/PR1b-Rev*, amplifican un fragmento de 91 pb.

3.1.4.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA *PR1a* Y LA *PR1b*

Con el objetivo de evaluar la especificidad de los iniciadores diseñados para la *PR1a* y la *PR1b*, se llevó a cabo el desarrollo de la RT-qPCR para la amplificación de los fragmentos del gen. Con el ADNc de las células de *C. chinense*, se utilizaron los iniciadores diseñados para la *PR1a*, la *PR1b* y, el Factor de Elongación 1 α (*EF1 α*) como control interno (Figura 3.11, carril 7). La reacción se llevó a cabo a 52 °C en 40 ciclos, para ambos iniciadores y los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa.

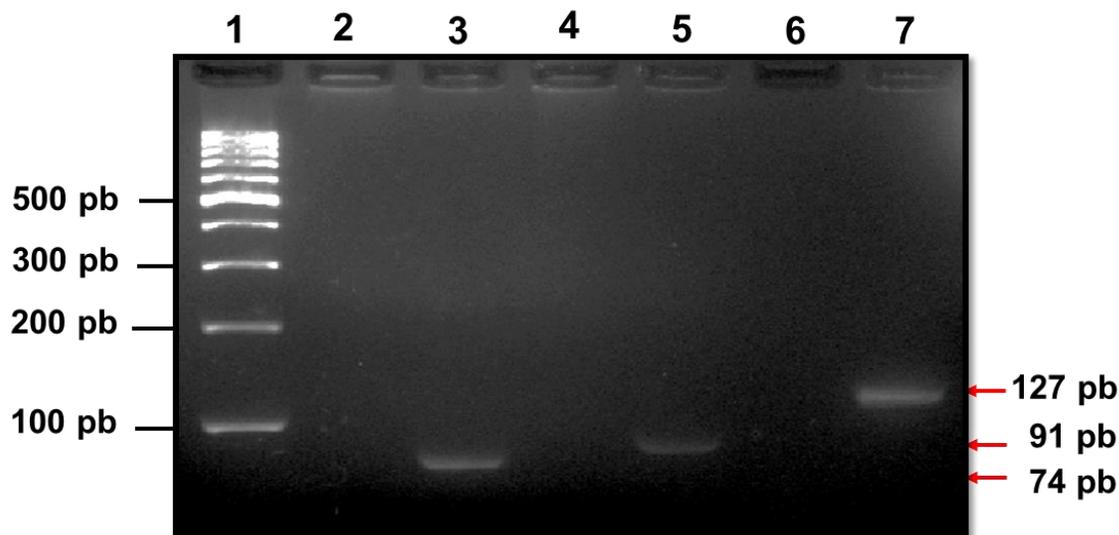


Figura 3.11 Amplificación de segmentos de nucleótidos los genes *PR1a* y *PR1b* de *C. chinense* Jacq. El ADNc obtenido de *C. chinense* fue utilizado para la amplificación de los genes *PR1a* y *PR1b*. Carril 1: marcador de 100 pb; carril 2,4 y 6 son control negativo (sin ADNc); carril 3: amplificación de *PR1a* de 74 pb; carril 5: amplificación de *PR1b* con 91 pb, y carril 7: amplificación de *EF1α* con 127 pb. Los fragmentos amplificados fueron separados en un gel de agarosa 4% y visualizados con Gel-Red.

En la Figura 3.11, se observó una banda para la *PR1a* (carril 3) y una banda para la *PR1b* (carril 5), con el tamaño de los fragmentos esperados de 74 pb y 91 pb respectivamente. Para poder evaluar la expresión de la *PR1a* y la *PR1b*, fue necesaria la comparación con un gen de referencia. Un gen de referencia tiene la característica de que se expresa de manera constitutiva, y no varía su expresión, por lo tanto, se utilizó el gen *EF1α*. La amplificación del *EF1α* se realizó en las mismas condiciones de los genes *PR1a* y *PR1b*.

Estos resultados sugieren que los iniciadores diseñados son específicos para cada uno de los genes de nuestro estudio; esto se confirmó en la amplificación de una banda y con el tamaño del fragmento esperado (Figura 3.11). Por lo tanto, estos iniciadores fueron utilizados para analizar la expresión relativa de los genes *PR* por medio de RT-qPCR.

3.1.4.3 ACTIVACIÓN DE GENES RELACIONADOS A LA PATOGÉNESIS (*PR1*).

Las plantas son capaces de coordinar la expresión de genes *PR* específicos en respuesta al ataque de patógenos. La expresión del gen *PR1* se ha usado durante mucho tiempo como un marcador de resistencia a enfermedades mediada por AS.

Con el fin de monitorear la manera de responder de las células de *C. chinense* ante la infección de *P. ultimum*, se analizó la expresión de los genes *PR1a* y *PR1b*, los cuales están involucrados en la respuesta de defensa frente la infección por un patógeno (Tornero *et al.*, 1997). El análisis de la expresión se realizó en un período de 0 a 48 hdi. Este análisis con la RT-qPCR fué utilizado para conocer la modificación en los niveles del transcrito de los genes involucrado en la respuesta de defensa (*PR1a* y *PR1b*) en un evento de infección provocado por *P. ultimum*.

Los niveles de expresión del gen de la *PR1a* no se vieron modificados en el transcurso de la infección con *P. ultimum* en comparación con los niveles de expresión de la *PR1a* en células no infectadas (Figura 3.12). Sin embargo, se encontró que la *PR1b*, mantuvo su expresión a niveles basales hasta los 15 mdi, posteriormente a partir de los 30 mdi y hasta las 12 hdi, su expresión se ve modificada alcanzando un pico máximo de expresión de 3.5 veces más que la expresión basal de las células no infectadas en un tiempo de 1 hdi (Figura 3.12). Posteriormente estos niveles de expresión disminuyeron hasta alcanzar el mismo nivel de expresión que tenía a las 0 hdi durante el tiempo máximo de infección (48 hdi).

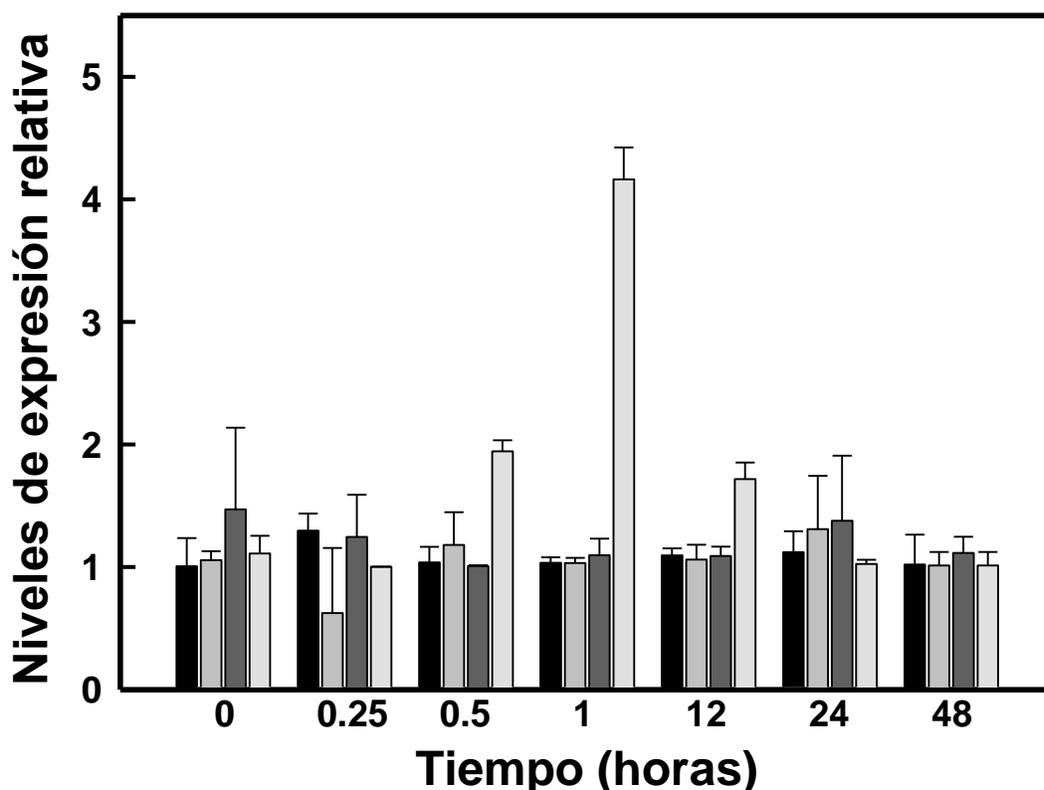


Figura 3.12 Evaluación mediante RT-qPCR de los perfiles de expresión de los genes relacionados a la patogénesis (*PR1a* y *PR1b*) en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. La expresión génica fue determinada en células de 14 días de su ciclo de cultivo, en presencia o ausencia del patógeno, durante un período de 48 hdi. Las barras (■) corresponden al testigo de *PR1a*, (▒) representa al gen *PR1a*, (■) representa al testigo de *PR1b* y (□) al gen *PR1b*. Cada barra representa el promedio de tres experimentos con dos replicas cada uno \pm ES.

4. CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

C. chinense Jacq. es un cultivo de gran importancia económica en México, sin embargo, como la mayoría de los cultivos es susceptible a la infección por patógenos tan diversos como bacterias, hongos y oomicetos (Macías *et al.*, 2003). En México, los oomicetos son considerados uno de los patógenos con mayor afectación a los cultivos, ocasionando pudrición en la raíz y marchitamiento de las plantas jóvenes y adultas. El oomiceto *P. ultimum* es uno de los más patogénicos y con un amplio espectro de hospederos. No obstante, las plantas han desarrollado mecanismos de respuestas estructurales y sistémicos que participan en la defensa y en contrarrestar los efectos del patógeno atacante.

Uno de estos mecanismos de respuesta es la activación de la SAR, un mecanismo de amplio espectro capaz de defender a las plantas de diferentes patógenos (Durrant y Dogn, 2004). Esta respuesta se inicia con una infección en un área local, posteriormente se activa un mecanismo de respuesta sistémico, que se caracteriza por la acumulación de AS y la activación de la expresión de genes relacionados a la defensa. En particular el gen *PR1* se ha estudiado como marcador de la SAR.

Los estudios de interacción planta-patógeno, se realizan principalmente infectando hojas. Una desventaja de infectar a hojas es la aparición simultánea de diferentes etapas de infección, como es la infección hemibiotrófica alrededor de la infección y la necrotrofica en el centro de este tipo de infección, por lo tanto, los estudios en hojas hacen que sea difícil recolectar material de una sola etapa específica de la misma (van West *et al.*, 1998). Además, debido al grosor de las hojas con una multicapa de células y la autofluorescencia de la clorofila, los estudios de microscopía se pueden encontrar con ciertas dificultades para los respectivos análisis.

Un sistema de suspensiones celulares permite un proceso de infección más sincronizado, debido a que cada célula presente en el medio de cultivo tiene la misma oportunidad de infectarse, además de permitir que las células sean más accesibles para su estudio por medio de microscopía. No obstante, también tiene sus desventajas, como la sensibilidad

del cultivo a la manipulación, mantener las condiciones adecuadas para su multiplicación y, el hecho del costo económico que se necesita para su mantenimiento.

En este estudio el proceso de infección con *P. ultimum* fue ensayado y desarrollado por primera vez en un sistema de suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. y que resultó en una inducción de la infección activa donde se observaron las evidencias de daño celular (Figura 3.5).

Estudios especializados en las interacciones planta-patógeno, han utilizado cultivos de suspensiones celulares en sustitución de las plantas completas (Val F. *et al.*, 2008). Las suspensiones celulares se han utilizado con éxito como un sistema modelo para estudiar las vías de señalización del metabolismo celular o el efecto de la aplicación de diferentes compuestos en el cultivo vegetal. Por ejemplo, en células de perejil se realizaron estudios para controlar la muerte celular y los cambios en los componentes estructurales de la célula, durante la infección con *P. infestans* (Naton *et al.*, 1996).

En investigaciones recientes, se estudiaron en suspensiones celulares de *Solanum tuberosum* y *Arabidopsis thaliana*, las respuestas de defensa ante la infección por patógenos, y se demostró que los tratamientos con inductores o zoosporas de *P. infestans*, así como la exposición a otros patógenos (*P. infestans*, *V. dahliae*, *S. subterranea* y *C. coccodes*), inducen la alcalinización del medio, la producción de ROS y la inducción de genes relacionados a la defensa (Moroz *et al.*, 2017).

En el presente estudio (Capítulo 3.1) se estableció un modelo *in vitro* de suspensiones celulares de *C. chinense* con la finalidad de investigar si estas eran susceptibles a la infección con oosporas de *P. ultimum*, evaluando cambios en la viabilidad celular (Figura 3.1) y en la estructura celular (Figuras 3.3 y 3.4) como indicador de la infección, así como en la acumulación del AS endógeno (Figura 3.7) y la expresión de genes *PR1*, como marcadores de la respuesta celular desencadenada por un patógeno (Figura 3.12).

Para investigar cómo responden las células ante la exposición con oosporas de *P. ultimum*, se examinó la muerte celular como mecanismo de defensa empleada por la planta durante la interacción con un patógeno potencial (Torres *et al.*, 2006). En nuestro estudio, primero se analizó la viabilidad de las células, donde la cepa indujo la muerte celular de *C. chinense*.

A las 48 hdi con *P. ultimum*, el 50% de las células estaban muertas, lo que se comprobó con las observaciones microscópicas (Figura 3.3 y 3.4), que revelaron daños severos en las estructuras principales de las células.

P. ultimum estableció la infección mediante la penetración de las hifas a las células y la formación de esporangios en 48 hdi (Figura 3.5). Por lo tanto, la inoculación con *P. ultimum* resultó en una infección exitosa. Las células de *C. chinense* fueron susceptibles para la infección con *P. ultimum*, no es sorprendente ya que este oomiceto tiene un rango de hospederos amplio y es una de las cepas más infecciosas de la familia Pythaceas (Levesque *et al.*, 2010). Este comportamiento infectivo también se observó en un estudio con diferentes cepas de la familia de *Pythium*, donde se evaluó el porcentaje de infección en portainjertos de manzanos con diferentes grados de resistencia a patógenos, en el cual *Pythium ultimum* fue la especie con un número mayor de portainjertos infectados (Rios *et al.*, 2017).

Nuestros resultados son similares a lo reportado en diferentes trabajos donde se utilizaron suspensiones celulares como modelos, tal es el caso de las células de tomate (Msk8) expuestas a *Phytophthora infestans* (Govers *et al.*, 2017), en ese estudio la viabilidad celular resultó en un 72% de las células muertas en 20 hdi. En ese trabajo también se inoculó una línea de suspensiones celulares de tabaco (BY-2) y un 37% de las células se infectaron y generaron haustoria en el 5% de las células. Ese resultado sugiere que dependiendo del patógeno y del modelo de estudio la patogenicidad puede variar.

P. ultimum es capaz de infectar con éxito las células de *C. chinense* y generar esporangios los cuales son estructuras que definen que el ciclo de vida del patógeno está en proceso en estas células huésped (Figura 3.5). Esto apoya que la línea de suspensiones celulares de *C. chinense* es un potencial sistema de infección para el estudio de las respuestas de defensa ante la infección por *P. ultimum*.

Los resultados obtenidos respecto a la observación de cambios en la estructura celular (Figura 3.4) son similares a lo reportado por Naton y colaboradores en 1996, donde observaron una reducción en la viabilidad celular y cambios en la morfología de las suspensiones celulares de perejil durante la infección con *P. infestans*. Estos cambios en las células durante la infección se pueden deber a la formación de las especies reactivas

del oxígeno, principalmente los radicales de oxígeno altamente agresivos que producen la peroxidación lipídica (Govers *et al.*, 2017; Sutherland, 1991; Tzeng y De Vay, 1993).

Los cambios observados en las principales estructuras de las células de *C. chinense*, como son la pared celular, membrana plasmática y núcleo (Figura 3.4), se pueden deber tanto al proceso de infección por parte de *P. ultimum*, como a la respuesta de las células mismas. Los daños en la pared celular se pueden estar generando debido a que *P. ultimum*, secreta proteínas con actividad de proteasas y, enzimas que degradan la pared celular (celulasas y pectinasas), que facilitan la penetración inicial y la infección del huésped (Figura 3.5).

Los cambios en la morfología de la membrana plasmática, observados en este estudio (Figura 3.4), se pueden derivar de diversos eventos bioquímicos que ocurren en primera instancia en la membrana plasmática como, por ejemplo: los ácidos grasos insaturados pueden oxidarse y eliminarse de la bicapa lipídica, ya que las ROS (H_2O_2), que se generan como respuesta inicial de las células ante el ataque por un patógeno pueden desencadenar la activación de las lipoxigenasas (Kulkarni *et al.*, 1990). Por lo tanto, puede aumentar la degradación de los ácidos grasos que han sido liberados por las lipasas. Este evento puede ocasionar un deterioro de la membrana plasmática, lo que finalmente resultaría en un colapso estructural.

En un estudio del transcriptoma de *P. ultimum*, se identificaron genes específicos de este oomiceto. De manera interesante, se encontró, que codifican para una proteína de 588 aminoácidos, con un dominio que interactúa con la membrana plasmática (Perforina/MACPF). En plantas y animales, las proteínas MACPF forman poros en las membranas celulares, lo que lleva a la muerte celular programada como parte del desarrollo de la infección o de la defensa contra los patógenos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a lo reportado por Levine y colaboradores en 1998, donde observaron daños en una línea de suspensiones celulares de tabaco inoculadas con un péptido secretado por *Phytophthora cyptoenia*. En ese estudio, se reportó que a las primeras 6 hdi las células presentaban eventos de plasmólisis y cambio en el grosor de la pared celular. Por otra parte, en un cultivo *in vitro* de Msk8 que fueron infectadas con diferentes cepas de *Phytophthora*, se observó una reducción del 72% en la viabilidad de las células Msk8 a las 20 hdi, además de observar por microscopía una

infección primaria y haustorios completamente desarrollados en células infectadas, así como la reubicación del núcleo hasta el punto de penetración a los 16 hdi. En el mismo trabajo, se evaluó la producción de ROS, que es otro marcador para la activación de las respuestas de defensa. En la célula vegetal, ROS puede causar directamente el fortalecimiento de las paredes de la célula huésped a través de la reticulación de glicoproteínas (Bradley *et al.*, 1992 ; Lamb y Dixon, 1997), o la peroxidación lipídica y el daño a la membrana (Lamb y Dixon, 1997; Montillet *et al.*, 2005).

Múltiples estudios en monocotiledóneas y dicotiledóneas han demostrado que el AS juega un papel importante como molécula señal (Le Henanff *et al.*, 2009). Después del ataque por patógenos, los niveles de AS incrementan local y sistemáticamente en plantas infectadas. Además, el AS es requerido para inducir la expresión de genes *PR* en diversas especies de plantas (Durrant y Dong, 2004), como uva (Zhang, *et al.*, 2016), tomate (Chen *et al.*, 2009) manzana (Malnoy *et al.*, 2007), tabaco (Liu *et al.*, 2002) y arroz (Yuan *et al.*, 2007).

Los resultados presentados aquí demostraron que los niveles de AS se incrementan (Figura 3.6) en los primeros minutos después de la infección con *P. ultimum*, alcanzó un pico máximo de acumulación a los 60 mdi. En nuestro estudio, se sugiere que en las primeras etapas de la infección se está llevando a cabo una respuesta por la vía del AS. Estudios previos han demostrado el papel de AS como regulador positivo en la ruta de señalización en la respuesta de defensa de las plantas (Wu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2009); por lo tanto, en nuestro modelo de estudio el AS es una molécula de señalización que está estimulando la activación de defensa ante la infección por *P. ultimum*.

Como se mencionó anteriormente, los niveles de AS aumentan de manera evidente en las células que rodean los sitios de infección (Enyedi *et al.*, 1992), y también aumenta la expresión de genes *PR1*. En este trabajo se evaluó la modificación en el contenido de AS endógeno y los niveles en la expresión de genes *PR1*.

Los resultados sugieren que en las primeras etapas de la infección se está llevando a cabo una respuesta por la vía del AS y que se correlaciona con la expresión del gen *PR1b* básico (Figura 3.12). Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por Tornero y colaboradores en 1997, donde sugieren que AS producido por la infección por TMV o aplicado a los tejidos, es un potencial regulador de la señal desencadenada por un patógeno

y que actúa positivamente en la expresión del gen *PR1b1* básico, pero no tiene ningún efecto sobre la expresión de la contraparte ácida *PR1a2*.

Govers y colaboradores en el 2017, observaron que en la línea celular Msk8 inoculadas con oosporas de *P. infestans* resultó en un aumento en la expresión del gen *PR1b*, a las 6 hdi, mientras que los niveles de expresión de *PR1a*, solían mantenerse en estado basal, en comparación con el testigo. Por lo tanto, estos resultados nos indican que el gen *PR1b* responde ante la infección.

Si bien los mecanismos mediante los cuales el AS induce la expresión de los genes *PR-1*, son aún desconocidos, se ha sugerido que el peróxido de hidrógeno actúa como un mensajero secundario del AS en la señalización de la SAR. La SAR se refiere a las distintas señales y rutas, las cuales juegan papeles importantes en la capacidad de las plantas de defenderse contra el ataque de patógenos. Existen diferentes genes asociados al SAR que son conocidos como genes SAR, entre los cuales los genes *PR* y, específicamente la familia *PR-1* son los más representativos (Ryals, *et al.*, 1996). Gracias a este conocimiento, se puede asociar la acumulación de las proteínas *PR-1*, con la acumulación del AS, lo que los vincula directamente a nivel molecular.

Los presentes resultados pueden estar indicando que el AS podría funcionar como un activador de los niveles de *PR1b*, como mecanismo de respuesta ante la infección de *P. ultimum* en células de *C. chinense*. Para entender mejor este mecanismo de respuesta de las células ante la infección por *P. ultimum*, se propone el modelo presentado en la Figura 4.1.

La guerra biológica continua entre las plantas y varios patógenos microbianos, como ocurre con todos los organismos que evolucionan conjuntamente, para la supervivencia del más apto (Bittel y Robatzek, 2007). Para defenderse contra los patógenos, las plantas utilizan un sistema de protección (resistencia pasiva) que involucra una serie de barreras estructurales y fitoanticipinas antimicrobianas preformadas para prevenir / atenuar la invasión de posibles atacantes (Pritchard y Birch, 2011; Schwessinger y Zipfel, 2008). En este trabajo se sugiere que *P. ultimum* inicia el proceso de infección en las primeras horas después de la infección, posiblemente secretando proteínas que degradan la pared celular y perforinas que generan poros en la membrana plasmática, posiblemente, esto

posiblemente es la causa de los daños observados en la membrana plasmática a las primeras 12 hdi (Figura 3.4) en *C. chinense*.

P. ultimum libera efectores en el interior de la célula de las cuales son reconocidos por proteínas de tipo NBS-LRR que se encuentran en el citosol, las cuales generarán una cascada de señalización para activar la respuesta a la infección de *P. ultimum*, se sugiere que tal activación sea a través de la vía del AS. En este trabajo se observó una acumulación del AS endógeno a los primeros 60 mdi (Figura 3.7) y se mantuvo hasta las 12 hdi; la acumulación del AS sugiere que *P. ultimum* induce la expresión de genes *PR1* principalmente de *PR1b* (Figura 3.12), que va conllevar a la codificación de la proteína PR1b que es trasladada hacia el apoplasto para combatir la infección de *P. ultimum*.

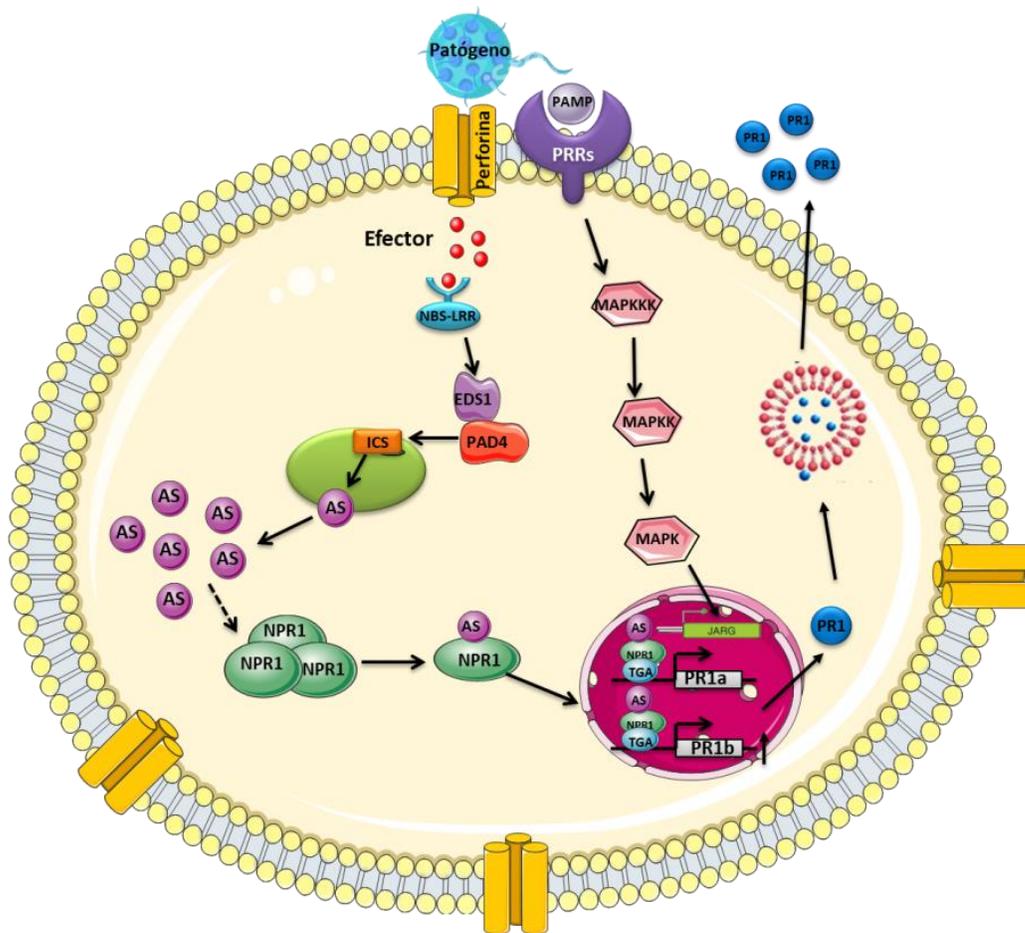


Figura 4.1 Modelo del mecanismo de respuesta de *C. chinense* Jacq. ante la infección por *P. ultimum*. Respuestas inmunes innatas de la planta y los eventos celulares con respecto a la inmunidad activada por patrón molecular asociado con el microbio / patógeno (M / PAMP), la inmunidad activada por el efector (ETI) (adaptado de Muthamilarasan y Prasad, 2013). PRRs: receptores relacionados a patógenos, MAPK's: proteínas cinasas activadas por mitógenos, NBS-LRR: proteínas con unión a nucleótidos (NBS) y repeticiones ricas en leucina (LRR), EDS1: Mayor susceptibilidad a la enfermedad 1, PDA4: deficiencia de fitoalexina 4, ICS: Isocorismato Sintasa, AS: ácido salicílico, NPR1: No- expresor del gen *PR1*, *PR1a* y *b*: genes relacionados a patógenos 1 ácido y básico, PR1: proteína relacionado a la patogénesis 1.

5. CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden derivar las siguientes conclusiones:

- Se estableció la infección de las suspensiones celulares de *C. chinense* con *P. ultimum*,
- La infección por *P. ultimum* ocasiona lesiones a las células en un período de 12 a 48 horas después de la infección, causando daños a estructuras principales de la célula, como es la pared celular, membrana plasmática y núcleo.
- Los niveles de AS se modificaron a los primeros minutos después de la infección, obteniendo un pico máximo a las 60 mdi
- Los niveles expresión del gen *PR1b* fueron estimulados de forma correlativa con los niveles endógenos de AS.
- Los niveles de expresión del gen *PR1a*, no se vieron modificados en los primos 60 mdi.

5.2 PERSPECTIVAS

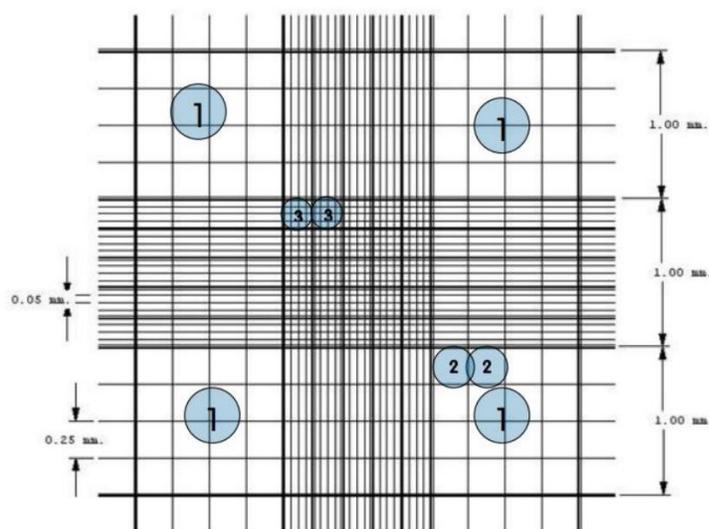
En este trabajo se estableció la infección de *P. ultimum* en suspensiones celulares de *C. chinense*, donde se analizó a lo largo del tiempo la viabilidad celular como indicador de la infección y cómo respuesta a la infección se determinó las modificaciones de los niveles de AS y se analizó la expresión del gen PR1, donde se observó que la expresión de PR1b es dependiente de la concentración de AS. Con base a esto se propone lo siguiente:

- La medición de otros parámetros, que nos indiquen la infección de las células, como medir la fuga de electrolitos, que es un método indirecto para cuantificar la muerte celular y los cambios de pH como respuesta ante la infección.
- Cuantificar los niveles de ROS, como respuesta inmediata.
- Análisis de genes, que se encuentren por encima de la vía de señalización de AS
- Análisis del gen NPR1, como indicador de la respuesta dependiente de AS.

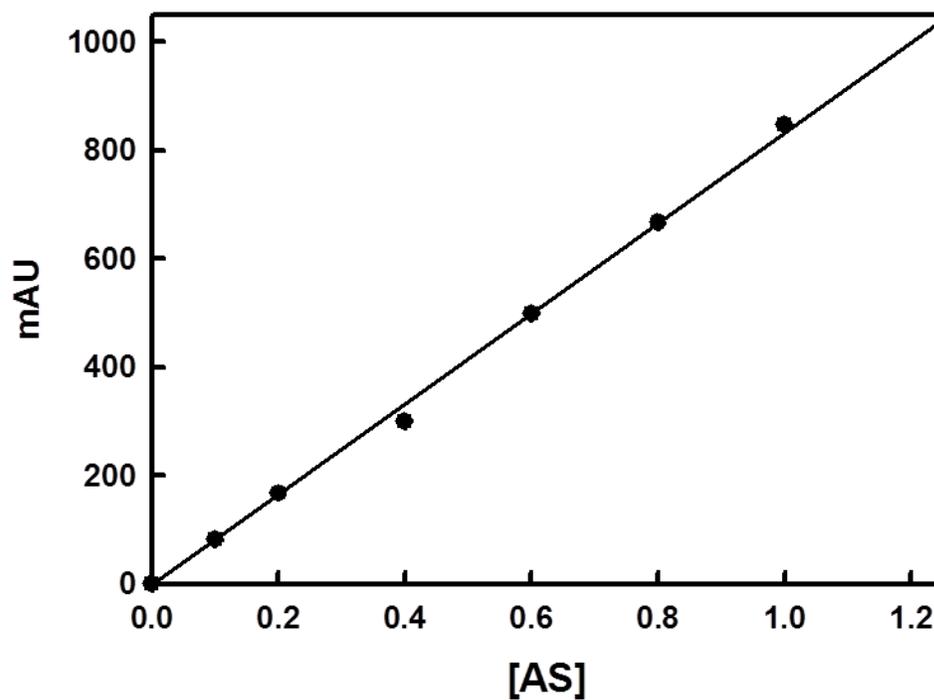
ANEXOS

Anexo I. Protocolo para el conteo de oosporas de *Pythium ultimum*.

1. La cámara es limpiada con etanol al 70% y en cada celda se le añade 10 µl de las oosporas, en la orilla entre el cubreobjetos y la cámara, llenando por difusión la cámara con la muestra.
2. Se observan los campos de la cuadrícula con el objetivo 40X.
3. Se cuentan las oosporas de los recuadros número 1 (Figura A1).
4. Se calcula la concentración de oosporas con la siguiente formula.
5. Concentración = [(oosporas contadas) (10,000)]/número de cuadros.



Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer Improved.

Anexo II. Curva estándar de ácido salicílico**Anexo III. Cell Mask™**

Toda la información requerida para la tinción de la membrana plasmática con cellmask, se puede encontrar en el siguiente link.

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/c10045>

Anexo IV. Estructuras reproductivas de *P. ultimum*

Se observan en las siguientes figuras las estructuras reproductivas de *P. ultimum* a) hifas, esporangios, b) oospora y c) anteridio intercalar (flecha negra) y oogonio de *P. ultimum* (flecha roja).



BIBLIOGRAFÍA

Abad, P., J. Gouzy, J.M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E.G. Danchin, E. Deleury, L. Perfus-Barbeoch, V. Anthouard, F. Artiguenave, V.C. Blok, M.C. Caillaud, P.M. Coutinho, C. Dasilva, F. De Luca, F. Deau, M. Esquibet, T. Flutre, J.V. Goldstone, N. Hamamouch, T. Hewezi, O. Jaillon, C. Jubin, P. Leonetti, M. Magliano, T.R. Maier, G.V. Markov, P. McVeigh, G. Pesole, J. Poulain y M. Robinson-Rechavi (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*. 26, 909–915.

Able, A.J., D.I. Guest y M.W. Sutherland (2000). Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Physiology*. 124, 899-910.

Agrios, G.N (1997). *Plant Pathology*. 4th edition. San Diego CA: Academic Press. pp 635.

Alexopoulos, C.J., C.W. Mims y M. Blackwell (1996). *Introductory Mycology*. New York, John Wiley & Sons. pp. 868.

Allen, T.W., A. Martinez, y L.L. Burpee (2004). Pythium blight of turfgrass. *The Plant Health Instructor*. 10, 1094.

Andersen, G.R., P. Nissen y J. Nyborg (2003). Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 28, 434-41.

Ayers, A.R., J. Ebel, B. Valent y P. Albersheim (1976). X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiology*. 57, 760-765.

-
- Balbi, V. y A. Devoto (2008). Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytologist journals*. 177, 301-318.
- Baptista, F.R., C.L.A. Pires-Zottarelli, M. Rocha y A.I. Milanez (2004). The genus *Pythium* Pringsheim from Brazilian cerrado areas, in the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*. 27, 281-290.
- Bari, R. y J.D. Jones (2009). Role of plant hormones in plant defence response. *Plant Molecular Biology*. 69, 473-488.
- Bliffeld, M., J. Munday, I. Potrykus y J. Fütterer (1999). Genetec engineering of wheat for increases resistance to powdery mildew disease. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. 98, 1079-1086.
- Bosland, P.W. (1996). Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA. pp. 479-487.
- Boudjeko, T., C. Andème-Onzighi, M. Vicré., A. Balangé, D. Ndoumou y A. Driouich (2006). Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. *Planta*. 223, 271-282.
- Bradley, D., P. Kjellbom y C. Lamb (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*. 70, 21-30.
- Burki, F., K. Shalchian-Tabrizi y J. Pawlowski (2008). Phylogenomics reveals a new 'megagroup' including most photosynthetic eukaryotes. *Biology Letters*. 4, 366-369.

- Cab-Guillén, Y.A (2012). Efecto del ácido salicílico en suspensiones celulares de *coffea arabica* L. y *Capsicum chinense* Jacq. en respuesta a la toxicidad por aluminio. Tesis de Licenciatura. Oxkutzcab, Yucatán. pp. 99.
- Campion, C., B. Vian, M. Nicole y F. Rouxel (1998). A comparative study of carrot root tissue colonization and cell wall degradation by *Pythium violae* and *Pythium ultimum*, two pathogens responsible for cavity spot. Canadian Journal of Microbiology. 44, 221–230.
- Castro-Concha, L.A., R.M., Escobedo, M de L., Miranda-Ham (2006). Measurement of cell viability in in vitro cultures. Methods in Molecular Biology. 318, 71-6.
- Catinot, J., A. Buchala, E. Abou-Mansour y J.P. Métraux (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. FEBS Letters. 582, 473-478.
- Chen, Z., Z. Zheng, Huang J., Lai Z y Fan B (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. Plant Signaling and Behavior. 4, 493-496.
- Chen, Z., J.W Ricigliano y D.F Klessig (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences. 90, 9533-9537.
- Chérif, M., N. Benhamou y R.R. Bélanger (1991). Ultrastructural and cytochemical studies of fungal development and host reactions in cucumber plants infected by *Pythium ultimum*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 39, 353–375.

- Dean, J.V., L.A. Mohammed y T. Fitzpatrick (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*. 221, 287-296.
- DeWitt, D y P. Bosland (1993). *The Pepper Garden, From the Sweetest bell to the Hottest Habanero*. Ten Speed Press, Berkeley California, US. pp. 23-220.
- Dong, X. y S.Yan (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current Opinion in Plant Biology*. 20, 64-69.
- Durrant, W.E. y X. Dong (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathol.* 42, 185-209.
- Eberhard, S., N. Doubrava, V. Marta, D. Mohnen, A. Southwick, A.I. Darviel y P. Albersheim (1989). Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. *Plant Cell*. 1, 747-755.
- Enyedi, A.J., N. Yalpani, P. Silverman e I. Raskin (1992). Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 89, 2480-2484.
- Francis, DM., A. Dina y S.T. Clair (1993). Outcrossing in the homothallic oomycete, *Pythium ultimum*, detected with molecular markers. *Current Genetics*. 24, 100-106.
- Fry, W (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*. 9, 385-402.

- Fu, Z.Q., S. Yan, A. Saleh, W. Wang, J. Ruble, N. Oka, R. Mohan, S.H. Spoel, Tada N. Zheng y X. Dong (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. 486, 228-232.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez, V. Santiago y Á. Montero (2004). Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, el Verde, Puebla. *Agrociencia*. 38, 653-661.
- Greenleaf, W.H (1986). Pepper Breeding. In: M.J Bassett (ed). *Breeding Vegetable*. AVI Publishing Co., Westpot, CT. pp. 67-134.
- Gutiérrez, M. G (2006). Estudios de la síntesis de capsaicina en cultivos in vitro de *C. chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 45.
- Howe, G.A y G. Jander (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 41-66.
- Humphreys, J.M. y C. Chapple (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 224-229.
- Jaramillo, S. y D. Rojas (2003). Aspectos Bioquímicos de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) al ataque del hongo *Phytophthora infestans*. *Revista Papa*. Grupo de Biotecnología- Universidad Nacional, Medellín.
- Jones, J.D. y J.L. Dangl (2006). The plant immune system. *Nature*. 444, 323-329.

-
- Kamoun, S., O. Furzer, J.D.G. Jones, H.S. Judelson, G.S. Ali, R.J.D. Dalio, S.G. Roy, L. Schena, A. Zambounis y F. Panabières (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 18, 413-34.
- Kato, K., T. Matsumoto, S. Koiwai, S. Mizusaki, K. Nishida, M. Nogushi y E. Tamaki (1972). Liquid suspension culture of tobacco cells. In: Terui G, editor. *Ferment technology today*. Osaka: Society of Fermentation Technology. pp. 689-95.
- Ko, W. (1998) Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* and *Pythium*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 39, 81-86.
- Koike, S.T., K.V. Subbarao, R.M. Davis y T.A Turini (2003). *Vegetable diseases caused by soilborne pathogens*. University of California., ANR Publications. 8099.
- Kulkarni, A.P., A. Mitra, J. Chaudhuri, J.Z. Byczkowski y I. Richards (1990). Hydrogen peroxide: a potent activator of dioxygenase activity of soybean lipoxygenase. *Biochemical Biophysical Res Commun*. 166, 417-421.
- Lamb, C., y R.A Dixon (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48, 251-275.
- Le Henanff, G, T., P. Heitz, J. Mestre, B. Mutterer, J. Walter y Chong (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol*. 9, 54.
- Lévesque, C.A., H. Brouwer, L. Cano, J. P Hamilton, C. Holt, E.R Huitema, S. Raffaele, G.P. Robideau, M. Thines, J. Win, M.M. Zerillo, G.W. Beakes, J.L. Boore, D. Busam, B. Dumas, S. Ferriera, S.I. Fuerstenberg, C.M.M Gachon, E. Gaulin, F. Govers, L. Grenville-Briggs, N. Horner, J. Hostetler, R.H.Y Jiang, J. Johnson, T. Krajaejun, H.

- Lin, H.J.G. Meijer, B. Moore, P. Morris, V. Phuntmart, D. Puiu, J. Shetty, J.E. Stajich, S. Tripathy, S. Wawra, P. van West, B.R. Whitty, P. M Coutinho, B. Henrissat, F. Martin, P. D Thomas, B. M Tyler, R.P. De Vries, S. Kamoun, M. Yandell, N. Tisserat y C. R. Buell (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biology*. 11, R73.
- Levine, A., R. Pennell, R. Palmer y C.J. Lamb (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*. 6, 427-437.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon y C.J. Lamb (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. 79, 583-593.
- Liu, Y., M. Schiff, R. Marathe y S.P. Dinesh-kumar (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant Journal*. 30, 415-429.
- Loake, G. y M. Grant (2007). Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. 10, 466-472.
- Long-Solís, Janet (1998). *Capsicum y cultura: La historia del chilli*/Janet Long-Solís—2^a ed. México: FCE. pp 203.
- Macías R. H., E. Romero Fierro y J. Martínez Saldaña. (2003). *Invernaderos de Plástico*. INIFAP. 131-163.

-
- Malnoy, M., Q. Jin E.E. Borejsza-Wysocka, S.Y. He and H.S. Aldwinckle (2007). Overexpression of the Apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Molecular plant-microbe interaction*. 20, 1568-1580.
- Martin, F. (2009). *Pythium* Genetics, *In: oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools*. Lamour, K. and Kamoun, S. (eds.). Wiley Blackwell. Estados Unidos de América. pp. 213-239.
- Montillet, J.L., S. Chamnongpol, C. Rusterucci, J. Dat, B. van de Cotte, J.P. Agnel, C. Battesti, D. Inze, F. Van Breusegem y C. Triantaphyllides (2005). Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*. 138, 516-1526.
- Moroz, N., K.R. Fritch, M.J. Marcec, D. Tripathi, A. Smertenko y K. Tanaka (2017). Extracellular alkalization as a defense response in potato cells. *Frontiers in Plant Science*. 8, 32.
- Mou, Z., Fan W. y Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113, 935-944.
- Murashige T. y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15, 608-612.
- Naton, B., K., Hahlbrock y E. Schmelzer (1996). Correlation of Rapid Cell Death with Metabolic Changes in Fungus-Infected, Cultured Parsley Cells. *Plant Physiology*. 112, 433-444.
- Nuez, F., R. Gil y J. Costa (1996). *El cultivo de pimientos chiles y Ajís*. Editorial S.A. Mundi-Prensa, Madrid, ES. Pp. 606.

-
- Ochoa-Alejo, N. y R. Ramírez-Malagón (2001). In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biolgy Plant*. 37, 701-729.
- Pech-Kú, R., J. A. Muñoz-Sánchez, M. Monforte-González, F. Vázquez-Flota, B. A. Rodas-Junco y S. M. Hernández-Sotomayor (2018). Caffeine Extraction, Enzymatic Activity and Gene Expression of Caffeine Synthase from Plant Cell Suspensions. *Journal of Visualized Experiments*. 10, 3791-58166.
- Pieterse, C. M., C. Zamioudis, R.L. Berendsen, D.M. Weller, S.C. Van Wees y P.A. Bakker (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology*. 52, 347-375.
- Pitzschke, A., A Schikora y H. Hirt (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*. 12, 421-426.
- Ramírez, J.G., S. Góngora, G.L.A. Pérez, M.R. Dzib, E.R.C. Leyva, M. y I.R. Islas (2005). Síntesis de oportunidades e información estratégica para fijar prioridades de investigación y transferencia de tecnología en Chile habanero (*C. chinense* Jacq). En: Estudio estratégico de la Cadena Agroindustrial: Chile habanero. INIFAP, SAGARPA, ASERCA, CIATEJ, UNACH, CICY, OTRAS. Mérida, Yucatán, México. pp 23.
- Ramírez, S.C., J.J. Armesto y C. Valdovinos (2005). Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile. Editorial Universitaria.
- Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 43, 439-463.

- Richards, T.A., J.B. Dacks, J.M. Jenkinson, C.R. Thornton y N.J. Talbot (2006). Evolution of filamentous plant pathogens: gene exchange across eukaryotic kingdoms. *Current Biology*.16, 1857-1864.
- Rios-Velasco, C., M.F. Ruiz-Cisneros, D.I. Berlanga-Reyes, J.J. Ornelas-Paz, C.H. Acosta-Muñiz, A. Romo-Chacón, P.B. Zamudio-Flores, D.A. Pérez-Corral, M.Á. Salas-Marina, J.E. Ibarra-Rendón, S.P. Fernández-Pavía (2017). Incidence and causal agents of root diseases and its antagonists in apple orchards of Chihuahua. *Mexican Journal of Phytopathology*. 35, 437-462.
- Rodríguez, D (2001). Sexual compatibility, reaction to metalaxyl, and aggressiveness of Venezuelan isolates of *Phytophthora infestans*. *Fitopatología venezolana*. 14,13-18.
- Romero-Cova, S. (1993). Honos Fitopatóenos. Universidad autónoma de Capino. pp. 42-52.
- Ruiz, N., F. Medina y M. Martínez (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Revista Ciencia*. pp.70-77.
- Salazar-Olivo, L. A. y C.O. Silva-Ortega (2004). Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. *Biología Scripta*. 1, 7-14.
- Santén, K., S. Marttila, E. Lijjjeröth y T. Bryngelsson (2005). Immunocytochemical localization of the pathogenesis-related PR-1 protein in barley leaves after infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66, 45-54.

- Schoina C., K. Bouwmeester y F. Govers (2017). Infection of a tomato cell culture by *Phytophthora infestans*; a versatile tool to study *Phytophthora*-host interactions. *Plant Methods*. 13-88.
- Schulze-Lefert, P., y R. Panstruga (2011). A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends in Plant Science*. 16, 117-25.
- Seyfferth, C. y K. Tsuda (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in Plant Science*. 5, 697.
- SIAP-SAGARAPA (2007 y 2012). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación. www.siap.gob.mx/.
- Soria-Fregoso, M., J.A. Trejo-Rivero, J.M. Tun-Suárez y R. Terán-Saldivar (2002). Paquete tecnológico para la producción de chile habanero. SEP. DGETA. ITA-2. Conkal, Yucatán, México.
- Stone, A.G., S.J Traina y H.A.J. Hoitink (2001). Particulate organic matter composition and *Pythium* damping-off of cucumber. *Soil Science Society American Journal* 65, 761-770.
- Suarez-Rodriguez, M. C., L. Adams-Phillips, Y. Liu, H. Wang, S.H. Su, P.J. Jester, S. Zhang, A.F. Bent y P.J. Krysan (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology*. 143, 661-669.

Sutherland, M.W (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 39, 79-93.

Tiffin, P. y D.A. Moeller (2006). Molecular evolution of plant immune system genes. *CellPress*. 22, 662-670.

Tiryaki, I. y H. Tunaz (2004). Systemic acquired resistance: Characterization of genes associated with plant defence response. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 3, 9-14.

Tornero, P., J. Gadea, V. Conejero y P. Vera (1997). Two PR-1 Genes from Tomato Are Differentially Regulated and Reveal a Novel Mode of Expression for a Pathogenesis-Related Gene During the Hypersensitive Response and Development. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 10, 624-634.

Tornero, P., J., Gadea, V., Conejero y P. Vera (1997). Two PR-1 Genes from Tomato Are Differentially Regulated and Reveal a Novel Mode of Expression for a Pathogenesis-Related Gene During the Hypersensitive Response and Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 10, 624-634.

Torres, M.A., J.D.G. Jones y J.L. Dangi (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol*. 14, 373-8.

Torto-Alalibo, T., CW Collmer y M. Gwinn-Giglio (2009). The Plant-Associated Microbe Gene Ontology (PAMGO) Consortium: Community development of new Gene Ontology terms describing biological processes involved in microbe-host interactions. *BMC Microbiology*. 9,1186-1471.

- Tzeng, D.D y J.E. De Vay (1993). Role of oxygen radicals in plant disease development. *Advances Plant Pathology*. 10, 1-34.
- Uppalapati, S.R., Y.I. Wangdi, T. Kunkel, B.N. Anand, A.K. Mysore y C.L. Bender (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 955-965.
- Uvalle, G.C. (1985). Técnicas de producción de cultivo de chile habanero en la zona henequenera. Tesina de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario (ITA) No.2 Conkal, Yucatán. pp. 43.
- Val, F., S. Desender, K. Bernard, P. Potin, G. Hamelin y D. Andrivon (2008). A culture filtrate of *Phytophthora infestans* primes defense reaction in potato cell suspensions. *Phytopathology*. 98, 653-8.
- van Loon, L.C., M. Rep y C.M. Pieterse (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44,135-162.
- Van West, P., A.J. de Jong, H.S. Judelson, A.M.C. Emons y F. Govers (1998). The ipiO gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fungal Genet Biology*. 23,126-38.
- Verberne, M.C., R. Verpoorte., J.F. Bol, J. Mercado-Blanco y H.J. Linthorst (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. 18, 779-783.
- Vidales, F.J.A y R.J.J. Alcantar (1989). Ataque de la virosis durante la floración y su efecto sobre la producción de melón (*Cucumis melo* L.). *Memorias del XVI Congreso*

Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Xalapa, Veracruz, México. Resumen. pp 67.

Villa, N.O., K. Kageyama, T. Asano y H. Suga (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia*. 98, 410-422.

Villa-Castorena, M., E.A. Catalán-Valencia, M. A. Inzunza-Ibarra, A.I Román-López, H. Macías-Rodríguez y D. Cabrera-Rodarte (2014). PRODUCCIÓN HIDROPÓNICA DE CHILE HABANERO EN INVERNADERO. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Vlot, A.C., D.M.A. Dempsey y D.F. Klessig (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47, 177-206.

Wang, W., X. Yang, S. Tangchaiburana, R. Ndeh, J.E. Markham, Y. Tsegaye y D. Morrissey (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 20, 3163-3179.

Waterhouse, G.M. (1963). Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*. 92,1-22.

Wick Robert, L., (2003). Soil-borne Diseases of veetable Crops. *Vegetable Notes*. 13, 23.

Wildermuth, M.C., J. Dewdney, G. Wu y F.M. Ausubel (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*. 414, 562-565.

Wu, Y., D. Zhang, J. Yan Chu, P. Boyle, Y. Wang, I.D. Brindle, V. De Luca y C. Despre (2012). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*. 1, 639-647.

Yan, S. y X. Dong (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Plant Biology*. 20, 64-68.

Zamioudis, C., y C.M.J. Pieterse (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25,139-150.

Zang, Y., Y.T. Cheng, N. Qu, Q. Zhao, D. Bi y X. Li (2006). Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 Paralogs. *Plant Journal*. 48, 647-656.

Zhao, J.T., X. Huang, Y.P. Chen, Y.F. Chen y X.L. Huang (2009). Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan Dajiao (*Mussa spp. ABB*). *Plant and Molecular Biology*. 27, 243-249.

Zipfel, C. y Felix, G (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology*. 8, 353-360.