

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS**

**Efectos del etileno sobre la expresión génica en
Capsicum chinense durante la interacción planta-
patógeno**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias presenta:**

M. en C. Rosalía Núñez Pastrana

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2011



Mérida, Yucatán, México; a 02 de Agosto de 2011

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen 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 desarrollo, 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.



Rosalía Núñez Pastrana

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Efectos del etileno sobre la expresión génica en *Capsicum chinense* durante la interacción planta-patógeno” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, dentro de la Opción Doctorado después de maestría, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

RECONOCIMIENTO

Al CONACyT por el financiamiento otorgado al proyecto P48831 y por la beca 208245, otorgada a RNP.

La cepa de *Fusarium oxysporum* utilizada en este trabajo fue donada amablemente por el Dr. Ignacio Islas Flores de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar el haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto bajo su tutoría, por el apoyo que me brindó durante su realización, por sus enseñanzas y por su amistad.

A los integrantes de mi comité tutorial y revisores de Tesis: Dr. Oscar Moreno Valenzuela, Dra. María de Lourdes Miranda Ham, Dr. Jorge Vázquez Ramos, Dra. Leticia Arena Ortíz, Dr. Luis Sáenz Carbonell y Dr. Ignacio Islas Flores, por sus valiosas críticas y sugerencias.

Al M. C. Ramón Souza Perera y al M. C. Adolfo Guzmán Antonio por el apoyo técnico durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Felipe Barahona Pérez por el apoyo en la cuantificación de etileno.

A Ángela Kú González por el apoyo técnico en la obtención de las micrografías en el microscopio electrónico de barrido.

Al M. C. Javier García Villalobos por el apoyo técnico en la realización del RT-PCR en tiempo real.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Goretty, Adolfo, Fabi, Yumi, David, Nallely y Marthita por brindarme su amistad y por compartir conmigo muchos momentos agradables.

A mi familia y a la familia Cruz Cruz por todo el apoyo que nos han brindado para realizar este sueño.

A mi esposo Carlos por todo su cariño y sus valiosos comentarios. Por estar emocionalmente conmigo, aún estando espacialmente tan lejos.

DEDICATORIA

A mis padres Gloria y Arturo por su cariño, confianza y apoyo incondicional.

A mis hermanas Fabiola y Gloria, por quienes siento un inmenso cariño y admiración.

A mis hermosas sobrinas Pame y Nati, que desde hace 11 años llegaron a nuestras vidas a brindarnos una inmensa alegría.

A mi esposo Carlos, por todo su amor y comprensión.

Ya saben que los quiero MUCHO

ÍNDICE GENERAL	Pág.
DECLARACIÓN DE PROPIEDAD	iii
RECONOCIMIENTO	v
AGRADECIMIENTOS	vii
DEDICATORIA	ix
ABREVIATURAS	xxiii
RESUMEN	xxv
ABSTRACT	xxix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	3
1.1 Interacción planta-patógeno	3
1.1.1 Mecanismos de ataque de los microorganismos fitopatógenos	4
1.1.2 Reconocimiento del patógeno por parte de la planta	6
1.1.3 Mecanismos de defensa de la planta	9
1.1.4 La respuesta de hipersensibilidad	12
1.1.5 La resistencia sistémica adquirida	13
1.1.6 La resistencia sistémica inducida	15
1.1.7 Las cascadas de MAPK durante la interacción planta-patógeno	17
1.1.8 Papel de las fitohormonas durante la interacción planta-patógeno	21

ÍNDICE GENERAL	Pág.
1.2 El etileno	24
1.2.1 Biosíntesis del etileno	24
1.2.2 Percepción y señalización del etileno en la célula	27
1.2.3 El papel del etileno en el mecanismo de defensa de las plantas	31
1.3 El chile habanero	32
1.3.1 Organismos patogénicos que atacan al género <i>Capsicum</i>	34
1.3.2 <i>Fusarium oxysporum</i> y la marchitez vascular	35
1.3.3 El género <i>Phytophthora</i>	39
1.3.3.1 El ciclo de vida asexual de <i>Phytophthora</i>	42
1.3.3.2 <i>Phytophthora capsici</i>	46
1.4 Referencias	47
1.5 Justificación	61
1.6 Hipótesis	63
1.8 Objetivo general	63
1.9 Objetivos específicos	63
CAPÍTULO 2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETILENO EN LA INTERACCIÓN <i>Capsicum chinense-Fusarium oxysporum</i>	65
2.1 Introducción	65
2.2 Materiales y métodos	68
2.2.1 Cultivo y mantenimiento de <i>Fusarium oxysporum</i>	68

ÍNDICE GENERAL	Pág.
2.2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i>	68
2.2.3 Tratamiento de <i>C. chinense</i> con etefón	69
2.2.4 Inoculación de <i>C. chinense</i> con <i>F. oxysporum</i>	69
2.2.5 Cuantificación de etileno en plántulas inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	70
2.2.6 Evaluación del efecto del etefón en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i>	70
2.2.7 Análisis de la expresión génica diferencial mediante hibridación de arreglos tipo dot blot	70
2.2.7.1 Extracción de ARN	71
2.2.7.2 Síntesis de ADNc	71
2.2.7.3 Amplificación de los ADNc correspondientes a los 21 genes analizados	71
2.2.7.4 Fijación de los ADNc	72
2.2.7.5 Hibridación (Church & Gilbert, 1984)	72
2.3 Resultados	74
2.3.1 Efecto del etileno en el proceso de infección de plántulas de chile habanero inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	74
2.3.2 Producción de etileno en plántulas de chile habanero inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	76
2.3.3 Evaluación del efecto del etefón en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>F. oxysporum</i>	77
2.3.4 Efecto del etileno en la expresión de genes de chile habanero durante la inoculación con <i>F. oxysporum</i>	79

ÍNDICE GENERAL	Pág.
2.4 Discusión	84
2.5 Conclusiones	90
2.6 Referencias	92
CAPÍTULO 3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETILENO EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE <i>Capsicum chinense-Phytophthora capsici</i>	97
3.1 Introducción	97
3.2 Efecto del etileno en la expresión de un grupo de genes de <i>Capsicum chinense</i> durante su interacción con <i>Phytophthora capsici</i>	98
3.2.1 Metodología	98
3.2.2 Resultados	98
3.2.3 Discusión	100
3.2.4 Conclusiones	102
3.2.5 Referencias	103
3.3 Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against <i>Phytophthora capsici</i> in Habanero pepper	104
3.3.1 Abstract	105
3.3.2 Introduction	106
3.3.3 Materials and methods	108
3.3.3.1 <i>In vitro</i> culture of Habanero pepper	108
3.3.3.2 Chemical treatments	109

ÍNDICE GENERAL	Pág.
3.3.3.3 <i>In vitro</i> culture of <i>Phytophthora capsici</i> and inoculation of Habanero pepper	109
3.3.3.4 ET measurements	109
3.3.3.5 Scanning Electron Microscopy	110
3.3.3.6 RNA extraction and gene expression analysis	110
3.3.4 Results	112
3.3.4.1 Exogenous application of ET prevented <i>Phytophthora capsici</i> infections of susceptible Habanero pepper seedlings	112
3.3.4.2 Endogenous ET did not accumulate during the progress of <i>Phytophthora</i> blight <i>in vitro</i>	117
3.3.4.3 Toxic effects of ethephon or silver nitrate were not responsible for the inhibition of the mycelium growth <i>in planta</i>	119
3.3.4.4 The ethephon treatment modified the expression of defence-related genes in Habanero pepper seedlings	120
3.3.5 Discussion	123
3.3.6 Acknowledgements	127
3.3.7 References	128
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN GENERAL	131
4.1 Modelos propuestos de los patosistemas <i>C. chinense-F. oxysporum</i> y <i>C. chinense-P. capsici</i>	135
4.2 Referencias	139

INDICE GENERAL	Pág.
CAPÍTULO 5 PERSPECTIVAS	141
Datos complementarios	143
Curva de calibración de etileno	143
Determinación de la concentración apropiada de etefón y nitrato de plata para incrementar los niveles de etileno e inhibir su percepción, en plántulas de chile habanero	144

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Figura 1.1	Regulación de la actividad de NPR1 (modificado de Pieterse y Van Loon, 2004)	15
Figura 1.2	Señalización fitohormonal de las respuestas sistémicas (modificado de Pieterse <i>et al.</i> , 2009)	17
Figura 1.3	Vías de señalización mediadas por fitohormonas (modificado de Kunkel & Brooks, 2002)	22
Figura 1.4	El ciclo de la metionina (modificado de Yang & Hoffman, 1984)	26
Figura 1.5	Modelo esquemático de la vía de señalización del etileno (modificado de Broekaert <i>et al.</i> , 2006)	30
Figura 2.1	Efecto del etileno sobre la susceptibilidad del chile habanero contra <i>F. oxysporum</i>	74
Figura 2.2	Producción de etileno en plántulas de chile habanero inoculadas con <i>F. oxysporum</i>	76
Figura 2.3	Efecto directo del etefón en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Fusarium oxysporum</i>	78
Figura 2.4	Análisis de los efectos del etileno y la infección con <i>F. oxysporum</i> sobre la expresión génica en plántulas de chile habanero	81
Figura 3.1	Análisis de los efectos del etileno y la infección con <i>P. capsici</i> sobre la expresión génica en plántulas de chile habanero	100
Figure 3.2	Effect of ethylene in the pepper resistance against <i>Phytophthora capsici</i>	115

INDICE DE FIGURAS		Pág.
Figure 3.3	Effect of ethylene in the growth of <i>Phytophthora capsici</i> on the Habanero pepper leaves	116
Figure 3.4	Accumulation of ethylene in Habanero pepper seedlings inoculated <i>in vitro</i> with <i>Phytophthora capsici</i>	118
Figure 3.5	Effect of AgNO ₃ and ethephon on the <i>Phytophthora capsici</i> growth <i>in vitro</i>	120
Figure 3.6	Effect of ethylene in the gene expression of defence molecular markers	122
Figura 4.1	Modelo propuesto de la interacción <i>C. chinense</i> - <i>F. oxysporum</i>	136
Figura 4.2	Modelo propuesto de la interacción <i>C. chinense</i> - <i>P. capsici</i>	138
Figura C1	Curva de calibración de etileno	143
Figura C2	El etefón induce la abscisión de hojas y el nitrato de plata la inhibe en plántulas de chile habanero	145

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 2.1	Identidad de los ADNc analizados en un arreglo tipo dot blot	67
Cuadro 2.2	Proceso de desinfestación de las semillas de chile habanero	68
Cuadro 2.3	Identidad de los genes de chile habanero en el mini-arreglo	80
Cuadro 2.4	Cambios en la expresión de un grupo de genes de chile habanero tratado con etefón y/o inoculado con <i>Fusarium oxysporum</i>	83

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.1	Familias reconocidas de proteínas relacionadas con la patogénesis (modificado de Van Loon <i>et al.</i> , 2006)	11
Table 3.1	Oligonucleotide sequence of the primers used in the real-time RT-PCR assays	112
Table 3.2	Effect of the exogenous application of ethylene in the severity of Phytophthora blight in Habanero pepper	113

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACO	ACC oxidasa
ACS	ACC sintasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AOA	Ácido aminooxiacético
ARN	Ácido ribonucleico
APD	Agar papa dextrosa
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BRs	Brasinosteroides
CTR1	Constitutive triple response 1
Cyt c	Citocromo c
DEPC	Dietil pirocarbonato
EDS1	Enhanced disease susceptibility
ET	Etileno
GAs	Giberelinas
ISR	Induced systemic resistance (resistencia sistémica inducida)
JA	Jasmonic acid (ácido jasmónico)
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MAPK	Mitogen activated protein kinase

MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MeJA	Methyl jasmonate (jasmonato de metilo)
MS	Murashige y Skoog
NPR1	Non-expressor of pathogenesis-related genes1
PAD2/3	Phytoalexin deficient 2/3
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns (patrones moleculares asociados a patógenos)
PCD	Muerte celular programada
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PRRs	Pattern recognition receptors (receptores de reconocimiento del patrón)
RH	Respuesta de hipersensibilidad
ROS	Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
SA	Salicylic acid (ácido salicílico)
SAM	S-adenosilmetionina
SAR	Systemic acquired resistance (resistencia sistémica adquirida)
TA	Temperatura ambiente

RESUMEN

Durante la interacción entre una planta y un microorganismo patogénico se activan diversos mecanismos en ambos organismos. El patógeno utiliza distintas estrategias de ataque, mientras que la planta depende de la inducción de un grupo de respuestas de defensa, cuya magnitud y prontitud suelen ser determinantes para mantenerse sana o desarrollar la enfermedad.

Existen dos respuestas de defensa en las plantas que se presentan a nivel sistémico; una de ellas es la respuesta sistémica adquirida (SAR) y la otra es la respuesta sistémica inducida (ISR). Estas rutas de señalización comparten una característica en común: tienen como orquestadores funcionales a un grupo de fitohormonas. En el caso de la SAR es el ácido salicílico (SA), mientras que en la ISR son el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA). Además, en ambas respuestas participa el regulador transcripcional NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes 1).

En este trabajo se estudió la interacción compatible entre el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y el oomiceto *Phytophthora capsici* L. Debido a que la mayoría de las especies del género *Capsicum* son susceptibles a este oomiceto, se ha propuesto que el oomiceto bloquea las respuestas de defensa del hospedante. Con base en esta hipótesis, se decidió investigar si la vía de señalización inducida por el ET podría ser un blanco de esta inhibición. Como parámetro de comparación, se evaluó el papel del ET en la interacción entre *C. chinense* y *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hans., considerando que el chile habanero presenta resistencia contra la cepa del hongo utilizada en este trabajo.

La estrategia experimental consistió en modificar exógenamente la concentración de ET y estudiar su efecto en el desarrollo de la enfermedad. Para incrementar los niveles de la fitohormona en la planta, se utilizó el

compuesto liberador de ET, etefón, y para inhibir su percepción, se utilizó nitrato de plata (AgNO_3), un inhibidor del receptor de ET.

La concentración adecuada de etefón para liberar ET fisiológicamente activo se determinó mediante un ensayo de abscisión de hojas en plántulas de chile habanero. Mediante este ensayo se determinó que la concentración de etefón para liberar niveles adecuados de ET era 5 mM y la concentración mínima de AgNO_3 necesaria para inhibir la percepción de la fitohormona, 300 μM .

Los resultados demostraron que las plántulas asperjadas con etefón adquirieron cierto nivel de resistencia contra el oomiceto, hecho que se vio reflejado en la disminución de los síntomas observados, así como en el retraso en su aparición. El uso del inhibidor (AgNO_3) permitió determinar que la inducción de la resistencia fue una respuesta mediada específicamente por el ET. De manera contraria, se observó que en la interacción entre *C. chinense* y *F. oxysporum*, el aumento en los niveles de ET en la planta favoreció el proceso de infección por el hongo.

Al analizar la expresión de un grupo de genes homólogos de chile habanero bajo diferentes condiciones experimentales, en un primer escrutinio se pudo observar que el tratamiento con etefón reprimió la expresión de dos MAPKs, efecto que se presentó cuando la planta adquirió resistencia contra *P. capsici* y susceptibilidad frente a *F. oxysporum*. La expresión de NPR1, una esterasa y una proteína relacionada con la patogénesis 10 (PR10), se reprimió por la inoculación con *P. capsici*, mientras que el tratamiento con etefón indujo su expresión, o no la modificó.

Se evaluó la participación de genes marcadores finales de las rutas de señalización mediadas por el ET, el JA y el SA, mediante el análisis de los niveles de transcritos, por medio de una transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (q-RT-PCR). Como gen marcador de la ruta mediada por el ET, se utilizó a la ACC oxidasa, en el de las

rutas mediadas por ET-JA, una defensina de plantas (PDF1.2), y finalmente, para la ruta mediada por el SA, la expresión de NPR1 y PR1.

Los resultados mostraron que la expresión de la ACC oxidasa se modificó en concordancia con los niveles de ET percibidos en las plántulas. La expresión de NPR1 no estuvo regulada por el ET bajo las condiciones analizadas, mientras que la de PR1 fue específicamente inducida por el ET en los tiempos tardíos de la interacción (48 y 72 h post inoculación), al parecer de manera independiente a la expresión de NPR1. La expresión de PDF1.2 mostró un patrón inespecífico de respuesta al ET, ya que ésta se indujo también en las plántulas que tenían inhibida la percepción de ET, sugiriendo que su participación no es determinante, o al menos, no es específica en la resistencia inducida por el ET en las plántulas, a diferencia de PR1, cuya inducción señalaría que tiene un papel en la defensa en este patosistema.

ABSTRACT

During the interaction between a plant and a pathogenic microorganism diverse responses are activated in both organisms. The pathogen uses different attack strategies, while the plant depends on the induction of a group of defence responses, which magnitude and promptitude tend to determine between remain health or diseased.

There are two defence responses in plants presented in a systemic level, one of them is the systemic acquired resistance (SAR) and the other is the induced systemic resistance (ISR). Signalling pathways controlling these events share a common characteristic: they use a group of phytohormones as functional orchestrators, in case of SAR the modulator is salicylic acid (SA), whilst for ISR are ethylene (ET) and jasmonic acid (JA). Furthermore, in both responses the transcriptional regulator NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes1) is involved.

In this work, the compatible interaction between habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) and the oomycete *Phytophthora capsici* L. was studied. Since most species of the *Capsicum* genus are susceptible to this oomycete, it has been suggested that the oomycete blocks the host defence responses. According to this hypothesis, it was investigated if the signaling pathway induced by ET could be a target of this inhibition. As a comparative parameter, the interaction between *C. chinense* and *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Syd.& Hans., was evaluated, considering that habanero pepper possesses resistance against the fungus strain used in this work.

The experimental approach consisted in modifying exogenously the ET concentration and studying its effect in the development of the disease. To increase the ET levels in the plant, ethephon, an ET releasing compound was employed, while to inhibit the phytohormone perception, silver nitrate (AgNO₃) was used.

The appropriate ethephon concentration to release physiologically active ET was determined using a leaf-abscission assay in habanero pepper seedlings. The ethephon concentration used to release appropriate ET levels was 5 mM and the minimum AgNO₃ concentration necessary to inhibit its perception was 300 μM.

The results showed that the seedlings sprayed with ethephon acquired a certain resistance level against the oomycete, which could be observed by a reduction of the symptoms, as well as in a delay in their apparition. The use of the inhibitor allowed to determine that the induction in resistance was a specific response specifically mediated by ET. In contrast, in the interaction between *C. chinense* and *F. oxysporum*, an increase in exogenous-ET levels favoured the infection process by the fungus.

When analyzing the expression of a set of habanero pepper-homologue genes under the different experimental conditions, it could be observed that the ethephon treatment downregulated the expression of two MAPK. The expression of NPR1, an esterase and PR10 (pathogenesis related protein 10), was also downregulated after *P. capsici* inoculation, while ethephon treatment resulted in the induction of their expression or no modification.

Marker genes from the signaling pathways mediated by ET, JA and SA were evaluated, by analyzing their transcript levels with RT-PCR (reverse transcription coupled to the real time polymerase chain reaction). In the case of the pathway mediated by ET, ACC oxidase was used as a marker, for the pathways mediated by ET-JA, a plant defensin was used (PDF1.2), and for SA-mediated pathway NPR1 and PR1 expression was recorded.

The results showed that ACC oxidase expression was modified as a consequence of the ET perceived by the seedlings. NPR1 expression was not regulated by ET under the analyzed conditions, while PR1 expression was specifically induced by ET at the late stages of interaction (48 and 72 h post

inoculation), apparently in an independent manner from NPR1 expression. PDF1.2 expression showed an unspecific pattern in response to ET, since its expression was also induced in the seedlings with ET-perception inhibited, suggesting that its participation is not determinant, or at least, it is unspecific in the resistance induced by ET in the habanero pepper seedlings, in contrast to PR1, which induction would play a defense role in this pathosystem.

INTRODUCCIÓN

Se considera que el estudio sistemático de la interacción de las plantas con sus patógenos surgió a partir de la muerte de millones de personas en Irlanda y la migración de otras hacia América debido a la hambruna ocasionada por la escasez de papa, originada por el oomiceto *Phytophthora infestans* entre 1845 y 1850 (Anbinder, 2001). Los microorganismos fitopatógenos compiten directamente con el hombre por el alimento; por ello, es importante conocer los procesos que se llevan a cabo durante su interacción con las plantas para poder diseñar estrategias que permitan controlar en cierto nivel los daños ocasionados por éstos.

Como sucede con otras especies del género *Capsicum*, el chile habanero es atacado por *Phytophthora capsici*. Ya que los oomicetos liberan moléculas efectoras que tienen la capacidad de manipular el funcionamiento celular del hospedante para poder infectarlo, se sugiere que esta estrategia es utilizada por *P. capsici* para infectar diversas especies del género *Capsicum* (Kamoun, 2006).

P. capsici provoca la enfermedad conocida como marchitez del chile. La infección de las plántulas se caracteriza por una marchitez severa y se presenta la necrosis del tejido vegetal, resultando finalmente en la muerte de la planta (Ristaino *et al.*, 1993).

En las plantas, las fitohormonas desempeñan papeles importantes en las rutas de señalización que son inducidas durante su interacción con los patógenos, de tal manera que forman redes de señalización con niveles importantes de interacción que determinan las respuestas de la planta frente a los patógenos. Entre las fitohormonas más estudiadas se encuentran el etileno (ET), el ácido salicílico (SA) y el ácido jasmónico (JA) (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

Se sabe que el ET, además de llevar a cabo diversas funciones durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas, se acumula cuando la planta está

sometida a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico (Abeles *et al.*, 1992). Un hecho interesante es que dependiendo del patosistema, el ET puede actuar como modulador positivo en el establecimiento de los mecanismos de defensa, o bien puede actuar como regulador negativo favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Broekaert *et al.*, 2006).

El objetivo de este trabajo consistió en determinar si el ET induce una respuesta de defensa en el chile habanero previo a su inoculación con *P. capsici*, utilizando como patosistema comparativo el del chile habanero con *F. oxysporum*.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas en su ambiente natural se encuentran sometidas a continuo estrés de tipo biótico y abiótico. Las plantas se enfrentan al ataque ocasionado por una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos, oomicetos, virus, nematodos e insectos. Al ser organismos sésiles, las plantas dependen de la rápida detección de patógenos y de la adecuada activación de vías de transducción de señales que le permitan responder y defenderse frente a estos ataques (Spoel *et al.*, 2007).

Los patógenos de plantas, de forma general se pueden dividir en tres categorías: biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos (Glazebrook, 2005; Perfect & Green, 2001). Los primeros son patógenos que penetran o establecen contactos cercanos con las células del hospedante para crecer y reproducirse durante su ciclo de vida, se consideran microorganismos obligados, poseen haustorios, causan un daño mínimo a la planta, y en general los síntomas se presentan como resultado de una disminución de nutrientes en el tejido vegetal, pueden secretar cantidades limitadas de enzimas líticas, tienen un rango angosto de hospedantes y se considera que son controlados por las vías de defensa dependientes del SA (Oliver & Ipcho, 2004). Los necrotróficos, en contraste, son microorganismos no obligados que dependen del tejido muerto del hospedante para adquirir nutrientes y reproducirse. Éstos a menudo secretan enzimas y toxinas que degradan y matan a las células del hospedante para tener acceso a los nutrientes, tienen un rango amplio de hospedantes y se considera que son controlados por las vías de defensa dependientes de ET y JA (Oliver & Ipcho, 2004). Los hemibiotróficos exhiben una fase biotrófica asintomática, estableciéndose en las células del hospedante y eludiendo la detección por parte del mismo, posteriormente durante el proceso de infección

éstos patógenos se dispersan rápidamente, se presenta el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y el patógeno mata activamente las células del hospedante, dentro de este último grupo se encuentran importantes patógenos de plantas como *P. infestans*, *P. capsici*, *F. oxysporum* y las especies del género *Colletotrichum* (Lee & Rose, 2010; Münch *et al.*, 2008; Qutob *et al.*, 2002).

Durante los millones de años de coevolución entre las plantas y sus patógenos, ha habido una serie de adaptaciones que les han permitido lograr su objetivo, sobrevivir. Para lograrlo, tanto las plantas como los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos de defensa, de ataque y de contra-ataque.

1.1.1 MECANISMOS DE ATAQUE DE LOS MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS

Los microorganismos fitopatógenos cuentan con un arsenal que les permite colonizar efectivamente a una planta determinada y en ciertos casos, contrarrestar sus respuestas de defensa. Tanto los hongos como los oomicetos tienen la capacidad de producir y secretar enzimas degradadoras de la pared celular (poligalacturonasas, pectato liasas, xilanasas y proteasas, entre otras), así como también, la capacidad de desarrollar estructuras especializadas para llevar a cabo la infección como el apresorio, la hifa de infección y el haustorio (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

Algunos fitopatógenos producen fitotoxinas que contribuyen a su virulencia, como los hongos y las bacterias. No se han reportado toxinas producidas por los oomicetos (Michielse & Rep, 2009). Las fitotoxinas son metabolitos secundarios de baja masa molecular, capaces de interferir con alguna actividad vital desempeñada por la célula vegetal, o causar su muerte a concentraciones inferiores a 10 mM (Berestetskiy, 2008).

Los efectos que presentan las toxinas en las plantas son diversos, por ejemplo, algunas especies del género *Cercospora* producen la toxina perilenoquinona (la cercosporina), la cual induce la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés), particularmente el oxígeno singulete, el cual destruye las membranas celulares de las plantas hospedantes, asegurando la provisión de nutrientes para el patógeno (Daub & Ehrenshaft, 2000). El efecto de las fitotoxinas en las plantas se caracteriza por la aparición de ciertos síntomas como la marchitez, la supresión general del crecimiento, la clorosis y la necrosis; en algunos casos, las fitotoxinas son fundamentales para que se presente la patogénesis (Berestetskiy, 2008).

Los patógenos de plantas, particularmente los oomicetos, secretan moléculas efectoras tanto en el apoplasto como en el citoplasma para facilitar la colonización y suprimir las defensas del hospedante (Chisholm *et al.*, 2006; Kamoun, 2006).

Algunos microorganismos patogénicos poseen la capacidad de inhibir los mecanismos de defensa de las plantas. Un ejemplo de ello ocurre en la interacción *Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum*, en la que las plantas de jitomate producen un compuesto antifúngico llamado tomatina, capaz de formar complejos con los esteroides de las membranas fúngicas, provocando la formación de poros y por tanto, una fuga del contenido celular. Una forma específica de este hongo puede secretar una enzima, conocida como tomatinasa, que degrada a la tomatina. El análisis del genoma de *F. oxysporum* reveló que éste contiene cinco genes putativos de tomatinasa (Michielse & Rep, 2009).

Los patógenos también cuentan con otro mecanismo para tolerar los compuestos antimicrobianos producidos por la planta, basado en la secreción activa de éstos mediante los transportadores ABC, los cuales permiten el movimiento de una amplia variedad de compuestos a través de la membrana plasmática (Latijnhouwers *et al.*, 2003).

1.1.2 RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO POR PARTE DE LA PLANTA

Para que durante la interacción entre una planta y un patógeno, la primera pueda responder a dicha amenaza, es necesario que cuente con un mecanismo que le permita percibir la presencia del patógeno. Durante la evolución, las plantas han adquirido la habilidad de sintetizar moléculas que pueden percibir sustancias extrañas y activan consecuentemente la inmunidad innata. Este reconocimiento le permite a la planta identificar a un patógeno a través de receptores que pueden localizarse en las superficies celulares o en el citosol (Monaghan & Li, 2008). Estos receptores se activan después de la percepción directa o indirecta, de estructuras propias o extrañas, actuando como interruptores moleculares que regulan vías de transducción de señales (Shen & Schulze-Lefert, 2007).

Aunque pueden no existir diferencias estructurales entre ellos, los receptores que las plantas poseen para detectar moléculas extrañas pueden dividirse en dos clases funcionales.

La primera consiste en receptores que reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) denominados receptores del reconocimiento del patrón (PRRs, por sus siglas en inglés). Los PRRs reconocen a los denominados elicitores generales, cuyas estructuras evolutivamente conservadas se encuentran en una amplia gama de microorganismos, e incluyen los lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas, los péptidos pequeños derivados de la flagelina bacteriana o el factor de elongación Tu, y la quitina y el ergosterol de los hongos (Zipfel & Felix, 2005). Dentro de este primer tipo de receptores se encuentran el FLS2 (Flagellin Sensitive2) y el EFR (EF-Tu Receptor), los cuales son cinasas tipo receptor localizadas en la membrana plasmática, que reconocen a los péptidos flg22 y elf18, derivados de la flagelina y del factor de elongación Tu, respectivamente (Gomez-Gomez & Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006; Shen & Schulze-Lefert, 2007). Las transglutaminasas de la pared celular de varios miembros del género

Phytophthora, poseen un dominio conservado denominado Pep13, que es reconocido por un PRR, una proteína integral de la membrana plasmática, identificada por primera vez en el perejil (Nennstiel *et al.*, 1998; Brunner *et al.*, 2002). Este reconocimiento induce la activación transcripcional de genes relacionados con la defensa y la producción de fitoalexinas (Nürnberg *et al.*, 1994). La inmunidad disparada por los PAMPs se considera la primera línea de defensa inducible contra diversos microbios patogénicos (Zhou & Chai, 2008).

La otra clase de receptores está constituida por las proteínas de resistencia (R). Estas proteínas, codificadas por los denominados genes *R*, permiten el reconocimiento de un patógeno mediante la unión directa o indirecta de los productos moleculares específicos de un patógeno particular. El genoma de las plantas puede codificar cientos de proteínas R (Spoel *et al.*, 2007), las cuales permiten el reconocimiento rápido del patógeno mediante la detección de una proteína de avirulencia (Avr) secretada por éste. Este reconocimiento conduce a la resistencia mediante la inducción de una serie de respuestas como la Respuesta de Hipersensibilidad (RH), la Muerte Celular Programada (PCD) y la expresión de genes relacionados con la patogénesis. Con base en su estructura, los genes *R* se agrupan en seis clases. La primera clase consiste en proteínas cinasa citosólicas, y hasta el momento sólo incluye a la proteína Pto. La segunda clase comprende a las proteínas con dominio de unión a nucleótidos y regiones ricas en leucina (NBS-LRR, por sus siglas en inglés), así como un dominio de hélice enrollada (coiled coil, CC) hacia el extremo carboxilo; ésta agrupa a la mayoría de los genes R descritos a la fecha. La tercera clase es similar a la segunda, pero presenta un dominio TIR (Toll-like and interleukin region, por sus siglas en inglés) en el extremo carboxilo. La clase cuatro incluye un solo miembro reportado a la fecha, que tiene un dominio extracelular con regiones ricas en leucina (LRR), un dominio transmembranal, y carece de un dominio citosólico con función aparente. La clase cinco contiene también un solo miembro reportado, a la cinasa tipo receptor Xa21 del arroz.

Finalmente, aquellas proteínas R que no poseen dominios conservados se agrupan en la clase seis.

Las bacterias Gram-negativas secretan una variedad de proteínas al medio extracelular a través de sistemas que están diseñados específicamente para transportar macromoléculas entre dos membranas biológicas. Se han descrito por lo menos seis mecanismos distintos y se denominan del tipo I al VI (Filloux *et al.*, 2008). Las moléculas excretadas por el mecanismo de secreción III ó sistema de secreción tipo III (T3SS, por sus siglas en inglés) han sido las mayormente descritas en la interacción planta-bacteria patogénica. Las proteínas secretadas por el T3SS son referidas como efectores del tipo III y tienen un rango amplio de funciones, incluyendo la citotoxicidad, la proteólisis, la fosforilación y la desfosforilación de proteínas en la célula hospedante (Grant *et al.*, 2006). El T3SS a menudo sólo funciona cuando la bacteria está íntimamente asociada con un hospedante para transportar proteínas; considerándose como dependiente del contacto.

En el caso de los patógenos bacterianos, muchos de los genes *Avr* codifican efectores del tipo III y posiblemente contribuyen a la virulencia en los hospedantes que carecen de los genes *R* apropiados (Abramovitch & Martin, 2004).

Los productos de los genes *R* pueden no unirse directamente a los productos de los genes *Avr*, sino que pueden detectar alteraciones en las proteínas del hospedante causadas por los productos génicos del patógeno. Esta interacción se conoce como el modelo del guardián (Van der Biezen & Jones, 1998).

Se considera que el reconocimiento mediado por la interacción proteína R-proteína *Avr* induce respuestas de defensa de mayor magnitud respecto al inducido por el reconocimiento de los PAMPs (Chisholm *et al.*, 2006).

1.1.3 MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PLANTA

Las plantas cuentan con diferentes niveles de mecanismos protectores que forman parte de una red de defensa que comprende barreras constitutivas y respuestas inducibles. La primera línea de defensa de una planta contra un patógeno es su superficie, a la cual el patógeno debe adherirse y penetrar para causar una infección (Agrios, 2005). Las capas cerosas que cubren a las células epidermales, a los estomas y a los tricomas constituyen un tipo de barrera física preformada, al igual que las paredes celulares (Nürnbergger *et al.*, 2004; Samuels *et al.*, 2008). Estas paredes hacen que la penetración directa por hongos patógenos sea difícil o imposible (Agrios, 2005).

La cantidad y las características de la cera y la cutícula que cubren a las células epidermales, así como el tamaño, la localización y la forma de los estomas y las lenticelas, y la presencia de tejidos conformados por células con pared celular gruesa, son factores que dificultan el avance del patógeno en la planta (Agrios, 2005).

Muchos hongos y bacterias patogénicos entran a las plantas únicamente a través de los estomas. Aunque la mayoría de los patógenos pueden forzar su entrada a través de estomas cerrados, otros como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* que ocasiona la roya del tallo en trigo, sólo puede entrar cuando los estomas están abiertos (Agrios, 2005).

En cuanto a los compuestos de defensa químicos pre-existentes, denominados fitoanticipinas, generalmente son de estructura química sencilla y son efectivos contra un amplio rango de patógenos. Estos compuestos incluyen fenoles, flavonas, terpenoides y saponinas, entre otros. Los factores de resistencia preformados deben ser más tóxicos para el patógeno que para la planta, o deben encontrarse confinados físicamente, o unidos de manera covalente a otros, para que el compuesto no dañe a los tejidos de la planta (Manners, 1993). En general, estos compuestos se encuentran secuestrados en la

vacuola, en otros organelos, o en las capas celulares externas del tejido vegetal. Algunos de los factores de resistencia preformados pueden almacenarse como precursores inactivos que son convertidos a sus formas activas por las enzimas del hospedante como respuesta al ataque por patógenos, o cuando el tejido es dañado (Manners, 1993; Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Las respuestas de defensa inducibles también pueden ser físicas y químicas. Varios tipos de barreras mecánicas se producen como una reacción a la infección, y el tipo de barrera formada depende de la naturaleza tanto de la planta como del patógeno. Un ejemplo es la síntesis de callosa, un glucano que se liga por enlaces β -1,3. Este polisacárido queda depositado en la pared celular, reforzándola (Hématy *et al.*, 2009). La lignificación es otra respuesta de defensa, en donde se presenta la desrepresión de la vía de los fenilpropanoides para sintetizar los alcoholes coumarílico, coniferílico y sinapílico, los cuales se polimerizan mediante la acción de peroxidasas que utilizan como aceptor de electrones al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), para formar una estructura muy compleja y resistente (Strange, 2003).

Entre las respuestas inducibles más tempranas, se encuentra la generación de ROS y de óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Cuando la planta está sometida a algún tipo de estrés (biótico o abiótico) una fuente potencial de ROS son las NADPH oxidasas, las amino oxidasas y las peroxidasas unidas a la pared celular. Las ROS, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), son tóxicas de forma directa tanto para los microorganismos como para la planta (Apel & Hirt, 2004). La sobreacumulación de ROS puede resultar en muerte celular, debido a diversos procesos oxidativos como la peroxidación de lípidos de membrana, la oxidación de proteínas y el daño ocasionado al ADN y al ARN. Al igual que las ROS, el NO participa activamente en la inducción de la muerte celular programada que se presenta durante la RH (Mittler, 2002; Vítceek *et al.*, 2007).

Otra de las respuestas de defensa inducibles es el aumento en la expresión de genes que codifican las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Las PRs forman parte de 17 familias distintas (Van Loon & Pieterse, 2006), con funciones diversas (Fig. 1.1). Entre las PRs se encuentran las glucanasas y las quitinasas, las cuales degradan la pared celular de hongos, las tioniinas, que se cree que inducen la formación de poros en las membranas celulares de los patógenos ocasionando la entrada de agua, seguido de la ruptura celular debido al choque osmótico, y las ribonucleasas, las cuales degradan el ARN (Van Loon & Van Strien, 1999; Hoffman- Sommergruber, 2002).

Tabla 1.1 Familias reconocidas de proteínas relacionadas con la patogénesis (modificado de Van Loon *et al.*, 2006)

Familia	Miembro	Propiedades	Símbolos del gen
PR-1	Tabaco, PR-1a	Desconocida	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tabaco, PR-2	β -1,3-glucanasa	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tabaco, P, Q	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR-4	Tabaco, 'R'	Quitinasa tipo I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR-5	Tabaco, S	Tipo taumatina	<i>Ypr5</i>
PR-6	Jitomate, Inhibidor I	Inhibidor de proteinasa	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Jitomate, P ₉₉	Endoproteinasa	<i>Ypr7</i>
PR-8	Pepino, quitinasa	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>
PR-9	Tabaco, "peroxidasa formadora de lignina"	Peroxidasa	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Perejil, "PR1"	Tipo ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tabaco, quitinasa "clase V"	Quitinasa, tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Rábano, Rs-AFP3	Defensina	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis, THI2.1	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Cebada, LTP4	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Cebada, OxOa (germina)	Oxalato oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR-16	Cebada, OxOLP	Tipo oxalato oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tabaco PRp27	Desconocida	<i>Ypr17</i>

1.1.4 LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD

La RH es el mecanismo de resistencia más eficiente e inmediato que presenta una planta frente al ataque por patógenos. La RH se caracteriza por la muerte rápida de las células que se encuentran en contacto directo, o en proximidad con el patógeno. Como resultado de la RH, el patógeno es confinado impidiendo su dispersión del sitio donde intenta penetrar; además, se disparan señales locales y sistémicas para la activación de las defensas en las células no infectadas. La RH incluye la PCD, cuya iniciación requiere del metabolismo activo de la planta y puede ser inducida por diversos elicitores de distintos orígenes (bacterianos, fúngicos o de oomicetos), así como por los productos de los genes *Avr* (Balagué *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

La mitocondria desempeña un papel clave durante la regulación de la PCD. En estos organelos se detectan varias respuestas del metabolismo celular y convergen cascadas de transducción de señales, se procesa la información, se decide el destino celular, y en su caso, la ejecución de la sentencia de muerte (Yao *et al.*, 2004). Existen patrones celulares característicos de la PCD, como son la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y el rompimiento endonucleolítico del ADN (Yao *et al.*, 2004).

La PCD es una respuesta común al ataque por patógenos en ambos tipos de interacción: compatible e incompatible. La inducción de la PCD depende en gran parte del ciclo de vida del patógeno. La PCD impide la dispersión de patógenos biotróficos como los virus, pero puede favorecer el desarrollo de los necrotróficos, los cuales requieren de las células muertas para poder adquirir nutrientes. Algunos de estos fitopatógenos poseen la capacidad de inducir o inhibir la PCD de la planta para su beneficio (Greenberg & Yao, 2004; Yao *et al.*, 2004).

La RH está sujeta a un control genético en el que participan diversos factores que actúan como reguladores positivos o negativos. La morfología de las

células que presentan RH se ve modificada, las membranas celulares sufren daño y se vuelven disfuncionales (Bennett *et al.*, 1996). La mitocondria sufre una transición en su permeabilidad, lo que influye en la liberación del citocromo C (Cyt *c*) al citoplasma. El Cyt *c* induce entonces la activación de complejos proteicos en los que participan las metacaspasas, un grupo de proteasas necesarias para la degradación de proteínas durante la PCD (Yao *et al.*, 2004).

Otro mecanismo de eliminación celular es la autofagia, la cual desempeña un papel de gran importancia durante la RH. Durante este proceso altamente regulado, el material citoplasmático es encerrado en vesículas de doble membrana para posteriormente ser trasladado a la vacuola o a los lisosomas para su degradación (Liu *et al.*, 2005).

Típicamente, la RH precede a los cambios en los flujos iónicos, en la producción de ROS y de NO, en el reforzamiento de la pared celular y en la activación de genes relacionados con la defensa (Greenberg & Yao, 2003; Liu *et al.*, 2005).

1.1.5 LA RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA

La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) es un mecanismo de defensa inducido, el cual le confiere a la planta protección de larga duración contra un amplio espectro de microorganismos (Tiryaki & Tunaz, 2004). La SAR se caracteriza por la acumulación tanto de SA como de PRs. La acumulación de SA se presenta localmente, y en menor grado a nivel sistémico. De manera reciente, se ha propuesto que el éster metilado del SA, el salicilato de metilo, desempeña funciones importantes en el establecimiento de la SAR (Park *et al.*, 2008). La aplicación exógena de SA también induce la SAR en varias especies vegetales.

Algunas de las PRs inducidas en esta respuesta de defensa son la PR1, la PR5, las β -1,3-glucanasas y las quitinasas. La asociación de éstas con la SAR

sugiere una contribución importante a la capacidad de defensa de los tejidos inducidos (Van Loon *et al.*, 1998).

En la vía de señalización mediada por el SA se ha demostrado la participación de un componente clave, la proteína NPR1 (non-expressor of pathogenesis-related genes1). NPR1 se mantiene en el citoplasma como un oligómero, el cual se forma a través de puentes disulfuro intermoleculares.

La nitrosilación de NPR1 mediante el S-nitrosoglutatión en la cisteína-156 facilita su oligomerización y mantiene la homeostasis de NPR1 después de la inducción con el SA. La desoligomerización de NPR1 conduce a su activación, lo cual ocurre por cambios en el estado redox de la célula durante la respuesta inmune de varios organismos y está catalizada por tioredoxinas (Tada *et al.*, 2008). Después de su activación, NPR1 es translocada al núcleo donde interactúa con factores de transcripción tipo TGA para inducir la expresión de genes de defensa involucrados en la activación de la SAR (Fig. 1.1) (Pieterse & Van Loon, 2004; Durrant & Dong, 2004).

Los factores de transcripción TGA pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (por sus siglas en inglés, basic región/leucine zipper motif), que en plantas regulan procesos que incluyen la defensa contra patógenos, la señalización por estrés y luz, la maduración de semillas y el desarrollo de las flores (Jakoby *et al.*, 2002). El grupo TGA está compuesto por 10 miembros en *Arabidopsis* (Jakoby *et al.*, 2002), los miembros presentan una interacción diferencial con NPR1 (Zhou *et al.*, 2000; Kesarwani *et al.*, 2007). Los factores de transcripción TGA2 y TGA3 de *Arabidopsis* muestran una fuerte afinidad por NPR1, además de que ambos se unen al elemento de respuesta al SA (elemento as-1) en el promotor de *PR1* (Zhou *et al.*, 2000).

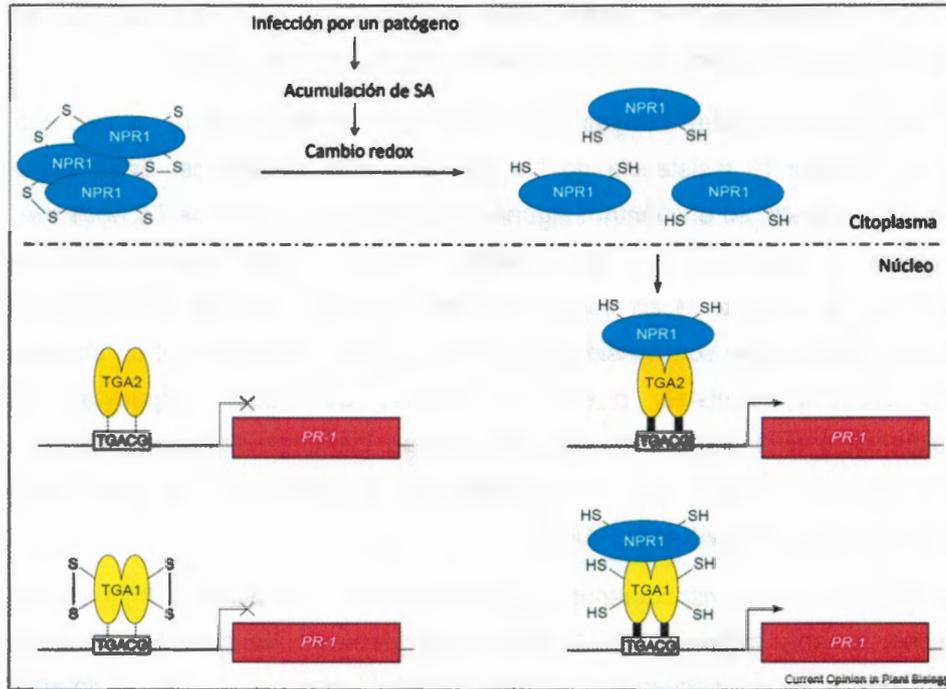


Figura 1.1. Regulación de la actividad de NPR1 (modificado de Pieterse & Van Loon, 2004).

1.1.6 LA RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA

La resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) es una respuesta que se caracterizó en plantas colonizadas por bacterias no patógenas presentes en la rizósfera, de las cuales, algunas tienen la capacidad de promover el crecimiento de la planta. Al igual que la SAR, la ISR es de amplio espectro ya que protege a la planta de un posterior ataque de varios tipos diferentes de patógenos (hongos, oomicetos, bacterias, virus y nematodos). La ISR se ha observado en varias especies vegetales, además diferentes especies bacterianas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* la pueden activar en diferentes sistemas (Bostock, 2005). *P. fluorescens*, *P.*

putida, *P. aeruginosa* y *P. aureofaciens* se encuentran entre las rizobacterias más efectivas en reducir las enfermedades (Van Loon *et al.*, 1998).

Adicionalmente, existen hongos no patogénicos colonizadores de la raíz que pueden inducir la resistencia de las plantas contra patógenos. Entre estos microorganismos, se encuentran algunas especies de los géneros *Trichoderma*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y del oomiceto *Pythium*. Estos microorganismos colonizan la mayoría de los suelos en todo el mundo. Algunos miembros del género *Trichoderma* son considerados como agentes de biocontrol en algunas enfermedades vegetales, pues son capaces de inducir respuestas de resistencia a nivel local y sistémico; sin embargo, los mecanismos de inducción, así como las señales que se encienden en la planta son en gran parte desconocidos (Djonović *et al.*, 2007).

La ISR mediada por rizobacterias se ha observado en *A. thaliana*, frijol, clavel, pepino, rábano, tabaco y tomate bajo condiciones en las cuales la bacteria inductora y el subsecuente patógeno retardador permanecen espacialmente separados. En general, las rizobacterias inductoras no causan síntomas visibles en el hospedante, aumentando el crecimiento de la planta. Después de la inoculación con el microorganismo patogénico, las respuestas de resistencia se presentan de forma rápida y aumentada. Además, la ISR generalmente no se asocia con la inducción de las PRs (Van Loon *et al.*, 1998).

En algunos casos, la ISR, está regulada por el JA y el ET y no por el SA, pero a diferencia de la SAR, ésta no parece estar asociada con muchos de los cambios en la expresión génica (Verhagen *et al.*, 2004). Algunos microorganismos del suelo producen ciertos compuestos volátiles como la acetofina y el butanediol, los cuales pueden inducir esta respuesta de defensa (Bostock, 2005), de manera independiente al JA y el ET.

En la Figura 1.2 se muestra un esquema sobre el papel de las fitohormonas en la SAR y la ISR en plantas.

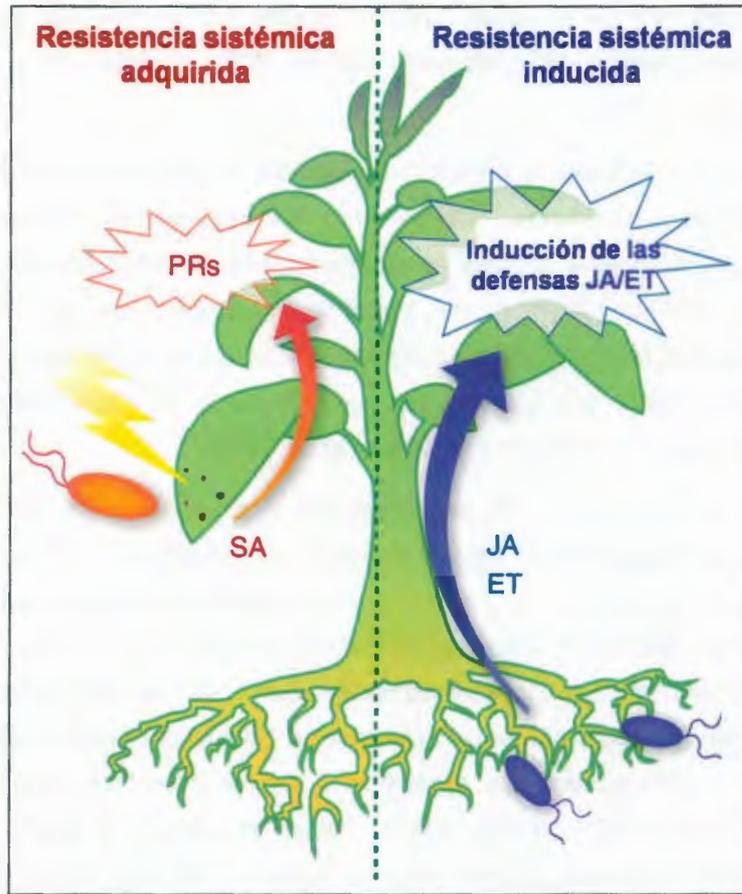


Figura 1.2. Señalización fitohormonal de las respuestas sistémicas (modificado de Pieterse et al., 2009).

1.1.7 LAS CASCADAS DE MAPK DURANTE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

La cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) es una ruta de transducción de señales altamente conservada en todos los organismos eucariontes. En las plantas, estas proteínas modulares regulan diferentes tipos de respuestas durante diversos procesos celulares, que incluyen el crecimiento, el desarrollo, la muerte celular, la señalización hormonal y frente a diversos

tipos de estrés, como frío, calor, luz UV, sequía, inundación, alta salinidad, ROS, heridas y ataque por patógenos (Morris, 2001; Ichimura *et al.*, 2002; Colcombet & Hirt, 2008).

Por medio de un mecanismo de fosfotransferencia, la cascada de MAPKs liga fisiológicamente a receptores corriente arriba con blancos corriente abajo. La cascada está compuesta por tres componentes: una MAPKKK (MAPK cinasa cinasa), una MAPKK (MAPK cinasa) y una MAPK (Widmann *et al.*, 1999). La activación de una MAPKKK puede presentarse a través de su interacción física y/o su fosforilación por un receptor, por factores intermediarios o por MAPKKKs interconectoras (Cvetkovska *et al.*, 2005).

Las MAPKKKs son cinasas de serina/treonina que activan a las MAPKKs a través de la fosforilación de dos residuos de serina/treonina en un motivo conservado S/T-X3-5-S/T. Por el contrario, las MAPKKs son cinasas duales que fosforilan a las MAPKs en los residuos treonina y tirosina en el motivo T-X-Y. Las MAPKs son cinasas de serina/treonina que fosforilan una variedad de sustratos que incluyen factores de transcripción, proteínas cinasas y proteínas asociadas al citoesqueleto. La especificidad de las diferentes cascadas de MAPKs que funcionan en una misma célula se genera a través de su agrupación en complejos de andamiaje mediante la presencia de dominios de anclaje encontrados en ambas proteínas. La expresión específica de los distintos componentes que forman parte del módulo es importante como control regulatorio (Morrison & Davis, 2003; Nakagami *et al.*, 2005; Pitzschke *et al.*, 2009).

El genoma de *Arabidopsis* contiene alrededor de 110 genes que codifican para miembros putativos de las vías de MAPK: más de 80 MAPKKKs, 10 MAPKKs y 20 MAPKs (Ichimura *et al.* 2002).

La señalización mediada por las cascadas de MAPKs se ha relacionado con las respuestas de defensa de la planta. El reconocimiento de PAMPs, así como el

de proteínas Avr, puede inducir estas cascadas. Por ejemplo, el reconocimiento del péptido flg22, el cual forma parte de la flagelina, a través de la cinasa tipo receptor FLS2, dispara una activación fuerte y rápida de las MAPKs MPK3, MPK4 y MPK6, seguido de la inducción de genes *PR* (Zipfel *et al.*, 2004; Pitzschke *et al.*, 2009).

El factor de elongación Tu (EF-Tu) también induce una cascada de MAPK en las hojas de *Arabidopsis*, dentro de su parte N-terminal, el péptido N-acetilado de 18 aminoácidos (elf18) es esencial para inducir un pico oxidativo en la planta y la biosíntesis de ET, disparando la resistencia a una infección posterior de bacterias patogénicas (Kunze *et al.*, 2004).

Cuando la planta de jitomate (*Solanum lycopersicum*) es retada con la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, se presenta un reconocimiento gen a gen, pues la proteína Pto (una cinasa de Ser/Thr), producto de un gen de resistencia, interactúa con los productos de los genes de avirulencia *AvrPto* y *AvrPtoB*. Este reconocimiento activa muchas respuestas de defensa, que incluyen un pico oxidativo, cambios rápidos en la expresión de cerca de 400 genes y la muerte celular localizada. Al realizar el silenciamiento mediado por virus de los genes que codifican dos MAPKKs (MEK1 y MEK2) y dos MAPK (NTF6 y WIPK), se observó que la resistencia de la planta se veía comprometida (Ekengren *et al.*, 2003).

En plantas, las MAPKs MPK3, MPK4 y MPK6 de *A. thaliana* son las mejor caracterizadas y son activadas por una diversidad de estímulos (Bush & Krysan, 2007).

La síntesis de camalexina (3-tiazol-2-il-indol), la principal fitoalexina de *Arabidopsis*, es inducida por el patógeno *Botrytis cinerea* y está regulada positivamente por la cascada MAPKKK/MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6. Mediante análisis genéticos, se logró determinar que esta cascada se encuentra corriente arriba y regulando positivamente la expresión de los genes

biosintéticos de la camalexina, *PAD2* y *PAD3* (Phytoalexin deficient 2 y 3) (Ren *et al.*, 2008).

Además de la participación de MPK3 y MPK6 durante la inducción de la síntesis de camalexina en *Arabidopsis*, se ha reportado que la MPK4 se encuentra formando un complejo nuclear con el factor de transcripción WRKY33. El reto con *P. syringae* o con la flagelina provoca la activación de la MPK4 y la fosforilación de su sustrato MKS1; subsecuentemente, MKS1 y WRKY33 son liberados del complejo que formaban con MPK4, y WRKY33 se une al promotor de *PAD3* (Qiu *et al.*, 2008).

Además de la participación de las MAPKs en el establecimiento de la defensa, algunas de estas proteínas regulan de manera negativa esta respuesta en la planta, como en el caso de la MPK4 de *A. thaliana*. La MPK4 puede tener un papel dual; es decir, puede regular tanto negativamente la defensa contra cierto tipo de patógenos, como positivamente contra un grupo distinto. La inactivación de la MPK4 (*mpk4*) por medio de transposones produjo una SAR constitutiva, con niveles elevados de SA, aumento en la resistencia a los patógenos virulentos *P. syringae* pv *tomato* y *Peronospora parasitica*, y la expresión constitutiva de genes relacionados con la patogénesis, demostrando que la actividad de la MPK4 se requiere para reprimir la SAR (Petersen *et al.*, 2000). Sin embargo, por otro lado, la mutante *mpk4* mostró una represión en la inducción mediada por el JA de los genes de defensa PDF1.2 (plant defensin 1.2) y THI2.1, sugiriendo que la MPK4 se requiere para inducir la expresión de genes de respuesta al JA (Brodersen *et al.*, 2006). La mutante *mpk4* también es deficiente en inducir genes de respuesta al ET, por lo que la planta mutante es más susceptible que la silvestre a *Alternaria brassicicola*, patógeno que induce las vías de defensa mediadas por ET/JA. También se ha logrado determinar la participación clave de las proteínas EDS1 (Enhanced Disease Susceptibility 1) y *PAD4*, involucradas en el antagonismo entre el SA y ET/JA, al ser activadores

de las defensas mediadas por el SA y represores de las defensas mediadas por ET/JA (Petersen *et al.*, 2000; Wiermer *et al.*, 2005).

Algunos microorganismos patógenos de plantas poseen la capacidad de manipular e inactivar las respuestas de defensa mediadas por las MAPK. Un ejemplo de ello es *P. syringae*, el cual libera los efectores AvrPto y AvrPtoB, que tienen la capacidad de interactuar con el receptor de la flagelina, FLS2. AvrPtoB cataliza la poliubiquitinación de FLS2 ocasionando su degradación por el proteosoma, interrumpiendo la señalización al módulo de MAPKs corriente abajo (Pitzschke *et al.*, 2009).

1.1.8 PAPEL DE LAS FITOHORMONAS DURANTE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

El papel de las fitohormonas durante la interacción planta-patógeno ha sido ampliamente estudiado, principalmente el del SA (Loake & Grant, 2007), del JA (Browse, 2009) y del ET (Broekaert *et al.*, 2006), los cuales son considerados fitohormonas de defensa. Existen además otras evidencias que demuestran que otras fitohormonas, como las auxinas (Kazan & Manners, 2009), el ácido abscísico (ABA) (Mauch-Mani & Mauch, 2005), las giberelinas (GAs), los brasinosteroides (BRs) (Nakashita *et al.*, 2003) y otras de carácter proteico (Matsubayashi & Sakagami, 2006), también desempeñan funciones importantes durante esta interacción.

Un punto importante en las rutas de señalización mediadas por fitohormonas es el nivel de intercomunicación que existe entre ellas (Fig. 1.3), presentándose interacciones tanto antagonicas como sinérgicas. Existen diferentes proteínas que actúan como puntos de convergencia entre ellas, siendo éstas tanto citoplasmáticas como nucleares. Existen genes de defensa que tienen en sus regiones promotoras elementos de respuesta a más de una fitohormona.

El ABA, las auxinas, las GAs y los BRs influyen en la respuesta de la planta a través de un efecto directo en las rutas de señalización mediadas por el JA y el SA (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

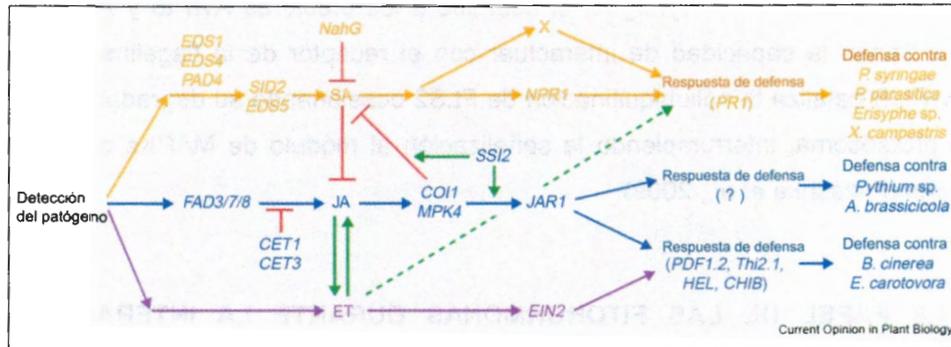


Figura 1.3. Vías de señalización mediadas por fitohormonas. Se muestra el nivel de intercomunicación entre las rutas del ácido salicílico (SA), del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET) en *Arabidopsis thaliana*, así como el grupo de genes de defensa que cada una regula y que son específicos dependiendo del patógeno percibido (modificado de Kunkel & Brooks, 2002).

En una amplia variedad de patosistemas, se ha observado que la ruta mediada por el JA y el ET son agonistas, y éstas suelen ser antagónicas con la del SA; así como son antagonistas las mediadas por el ABA y el SA (Audenaert *et al.*, 2002) y las auxinas-SA. En contraste, las rutas mediadas por las auxinas y el JA comparten muchas similitudes (Kazan & Manners, 2009).

De manera general las respuestas de defensa que involucran la participación de una determinada fitohormona suelen ser efectivas contra un grupo específico de patógenos; es decir, en varios patosistemas, el SA induce los mecanismos de defensa de la planta contra microorganismos biotróficos, mientras que el JA, el ET y las auxinas participan en la inducción de éstos frente a los necrotrofos (Spoel *et al.*, 2007; Kazan & Manners, 2009). Sin embargo, existen excepciones

en esta respuesta y la concentración de cada fitohormona suele ser determinante para dirigir la respuesta final de la planta.

El SA se ha identificado como un componente esencial en el establecimiento de la SAR y la inducción de la expresión del gen de defensa *PR1* (pathogenesis-related 1).

En el caso del ET y el JA, ambos participan en las vías de señalización que inducen la expresión de genes de defensa como PDF1.2 y CHI-B (chitinase B), además de mediar la ISR (Van Loon *et al.*, 1998).

El antagonismo que se presenta entre algunas rutas de señalización mediadas por fitohormonas puede ser aprovechado por los microorganismos patogénicos para promover la enfermedad. Algunas bacterias patogénicas pueden liberar moléculas efectoras a través del sistema de secreción tipo III en la célula hospedante que tienen la capacidad de inducir respuestas mediadas por algunas fitohormonas, como la proteína AvrBs3 secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, la cual induce la expresión de genes de respuesta a auxinas (Marois *et al.*, 2002).

Otro ejemplo es el de la bacteria *Pseudomonas syringae* que secreta efectores cuyos blancos son proteínas de la vía de señalización del ABA en *A. thaliana*. Las plantas inoculadas con este patógeno presentaban niveles más altos de ABA, que se correlacionaron con la susceptibilidad de éstas. La expresión del efector AvrPtoB en la planta modificó la señalización del ABA en el hospedante, sugiriendo que una de las principales estrategias de virulencia de algunos microorganismos patógenos es la manipulación de la homeostasis de fitohormonas por medio de efectores, lo que ocasiona la supresión de las respuestas de defensa en la planta (de Torres-Zabala *et al.*, 2007).

1.2 EL ETILENO

El ET (C_2H_4) es un gas en condiciones de presión y temperatura estándares (1 atm y 25 °C). Esta fitohormona regula diversos procesos fisiológicos durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas, desde la germinación de las semillas hasta la senescencia de órganos (Abeles *et al.*, 1992; Bleecker & Kende, 2000). Se ha demostrado que el ET tiene influencia en el crecimiento y la diferenciación de raíces y brotes, en la formación de raíces adventicias y en la inducción de la floración en algunas plantas (Arshad & Frankenberger, 2002).

La producción de ET en las plantas varía durante su desarrollo, así como se pueden observar cambios en las tasas de producción entre diferentes órganos. Las tasas más altas están relacionadas con el tejido meristemático, la germinación de las semillas, la maduración de los frutos, la senescencia y la abscisión de hojas y flores. En general, la producción de ET en tejidos vegetativos es baja ($0.01 \mu L \cdot L^{-1}$), mientras que durante la maduración de frutos, como el mango y la pera puede ser de 3 y $500 \mu L \cdot L^{-1}$, respectivamente (Abeles *et al.*, 1992).

La producción de ET también se induce como respuesta a un amplio rango de condiciones ambientales adversas, tanto de tipo biótico como abiótico, como la anaerobiosis, la sequía, la inundación, la invasión por patógenos o por heridas (Kim *et al.*, 1998). Después de que la planta es herida o atacada por un patógeno, se estimula la producción de ET en los tejidos afectados, de donde se difunde a las capas celulares circundantes antes de escapar a la atmósfera (Knoester *et al.*, 1998).

1.2.1 BIOSÍNTESIS DEL ETILENO

La ruta de biosíntesis del ET se caracterizó en gran parte gracias al trabajo realizado por el taiwanés Shang Fa Yang. Los logros de su investigación

incluyen la identificación de los pasos clave de la ruta de biosíntesis del ET (Adams & Yang, 1977; Adams & Yang 1979) (Fig. 1.4).

El ET se sintetiza a partir de la metionina, deriva de los carbonos C-3 y C-4 de este aminoácido (Lieberman & Kunishi, 1965). En la primera etapa, la metionina es convertida a S-adenosilmetionina (SAM) por la enzima S-adenosilmetionina sintasa (S-AdoMet sintasa, EC 2.5.1.6). La SAM es convertida por la enzima ácido 1-aminociclopropano carboxílico sintasa (ACC sintasa, EC 4.4.1.14) en ACC y en 5'-metiltioadenosina (MTA), la cual es reconvertida en metionina vía el "ciclo de Yang" o "ciclo de la metionina" (Miyazaki & Yang, 1987). Finalmente el ACC es oxidado por la ACC oxidasa (EC 1.14.17.4) para formar ET, cianuro de hidrógeno y dióxido de carbono (Fig. 1.4) (Arshad & Frankenberger, 2002; Wang *et al.*, 2002).

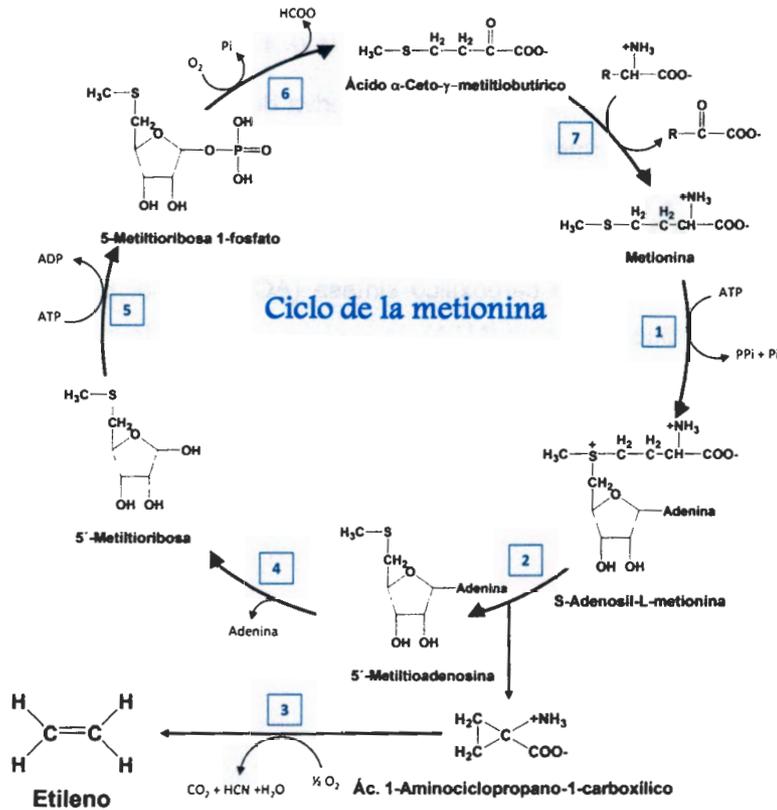


Figura 1.4. El ciclo de la metionina. El etileno es producido a partir de SAM, un intermediario producido a partir de la metionina. Las enzimas que participan en el ciclo de la metionina son: (1) SAM sintetasa, (2) ACC sintetasa, (3) ACC oxidasa, (4) MTA nucleosidasa, (5) MTR cinasa, (6) reacción espontánea, (7) transaminasa (modificado de Yang & Hoffman, 1984).

Existen diferentes niveles de regulación en la síntesis y percepción del ET. Éstos se ponen de manifiesto inhibiendo la síntesis y/o la actividad de la ACS y la ACO, así como de la actividad del ET lo que impide que éste sea percibido por la célula a través de su receptor. Inicialmente, se consideraba de manera general que la ACO estaba presente de forma constitutiva y la ACS se

consideraba entonces como el paso limitante en la biosíntesis del ET (Kim *et al.*, 1998). Conforme se fueron aislando numerosas clonas de ADNc de la ACO se observó que este gen, al igual que la ACS, forma parte de una familia multigénica y que los miembros de esta familia se expresaban diferencialmente durante el desarrollo de la planta o como respuesta a ataque por patógenos y por estrés abiótico, como heridas, inundación o exposición a ozono (Arshad & Frankenberger, 2002).

1.2.2 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DEL ETILENO EN LA CÉLULA

En estudios realizados en su mayoría en *A. thaliana* se han aislado varios componentes de la vía de transducción de señales del ET, incluyendo sus receptores y factores de transcripción corriente abajo (Fig. 1.5). En esta planta se ha demostrado que el ET puede ser percibido por una familia de cinco receptores (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4), los cuales se encuentran en el retículo endoplásmico y presentan similitud a los sensores bacterianos de dos componentes denominados histidina-cinasa (Gamble *et al.*, 1998). La unión del ET a su receptor es facilitada por el ión cobre como cofactor, que a su vez es liberado por la proteína RAN1 (Hirayama *et al.*, 1999). Los receptores de ET se han dividido en dos subfamilias basándose en su secuencia. La 1 incluye a ETR1 y ERS1 (su dominio N-terminal consta de 3 regiones transmembranales), y la 2, a ETR2, a ERS2 y a EIN4 (su dominio N-terminal consta de 4 regiones transmembranales). Las mutantes de estos genes conducen a una respuesta fenotípica constitutiva al ET, lo que demuestra su función como reguladores negativos de su señalización (Adams-Phillips *et al.*, 2004; Broekaert *et al.*, 2006).

Actuando corriente abajo de los receptores, y posiblemente formando parte de un complejo con el receptor, se encuentra CTR1 (constitutive triple response 1), el cual también actúa como regulador negativo. Su dominio C-terminal posee una actividad intrínseca de cinasa de serina/treonina y se ha demostrado que el

dominio N-terminal se asocia a ambas subfamilias de receptores (Adams-Phillips *et al.*, 2004). Estudios de localización indican que CTR1 se asocia primariamente con el retículo endoplásmico, con base en su interacción con los receptores ahí localizados (Broekaert *et al.*, 2006). Se cree que cuando el ET se une al receptor, el cual a su vez tiene interacción directa con CTR1, éste sufre un cambio conformacional en su extremo N-terminal, que podría autoinhibir su actividad de cinasa de Ser/Thr C-terminal.

Se ha propuesto que una cascada de MAPKs funciona en la señalización por ET; sin embargo, aún existe un debate sobre si la cascada de MAPK se encuentra funcionando únicamente arriba de la percepción del ET, modulando su síntesis, o debajo transduciendo la señal de éste (Xu *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008; Hahn & Harter, 2009).

En la ruta de señalización por ET, EIN2 (ethylene insensitivity 2) se encuentra entre CTR1 y el factor de transcripción EIN3. EIN2 consta de dos dominios bien definidos: el C-terminal hidrofílico que posee motivos típicos relacionados con interacciones proteína-proteína y el N-terminal hidrofóbico que contiene 12 hélices transmembranales. Esta proteína se considera como el primer regulador positivo de la respuesta a ET (Broekaert *et al.*, 2006).

La señal del ET llega al núcleo a través de la desrepresión de EIN2 por parte de CTR1, lo que origina la activación de los factores de transcripción EIN3 y EIL (EIN3-like transcription factor). En *A. thaliana* existen seis miembros de la familia EIN3 (EIN3 y EIL1/2/3/4/5), de los cuales, EIN3 y EIL1 son las proteínas más estrechamente relacionadas y las más importantes para la sensibilidad a ET. Es probable que el resto de los miembros de la familia participen en tejidos específicos, o incluso puedan funcionar en diferentes vías de señalización independientes del ET. Al parecer, en ausencia del ET, las proteínas EIN3/EIL1 son degradadas continuamente por la vía dirigida por AtEBF1/2 (proteínas de caja-F de *A. thaliana*), mediada por el proteosoma, evitando así la activación de sus blancos transcripcionales. En presencia del ET, se suprime la degradación

de EIN3, permitiendo que sus niveles se incrementen y promuevan los eventos corriente abajo. Aún cuando el mecanismo no está muy claro, se cree que probablemente EIN3 es fosforilado cuando se percibe la señal del ET, y que esta modificación inhibe su asociación con AtEBF1/2, evitando su degradación. Lo que si está claro es que las proteínas EIN3/EIL son "interruptores" esenciales del ET, en el sentido de que pequeños cambios en sus niveles controlan el flujo de señales hacia los eventos nucleares corriente abajo (Broekaert *et al.*, 2006).

El homodímero del factor de transcripción EIN3 reconoce su ADN blanco, denominado el "sitio de unión a EIN3", en los promotores de los genes de proteínas de unión al elemento de respuesta a ET (EREBP) (Binder *et al.*, 2007).

Los ERFs se han identificado en varias especies vegetales como proteínas que se unen a la caja-GCC presente en los promotores de varios genes inducibles por ET, por ejemplo, algunas proteínas PR y las enzimas que participan en la biosíntesis de ET, la ACS y la ACO (Broekaert *et al.*, 2006; Choudhury *et al.*, 2008).

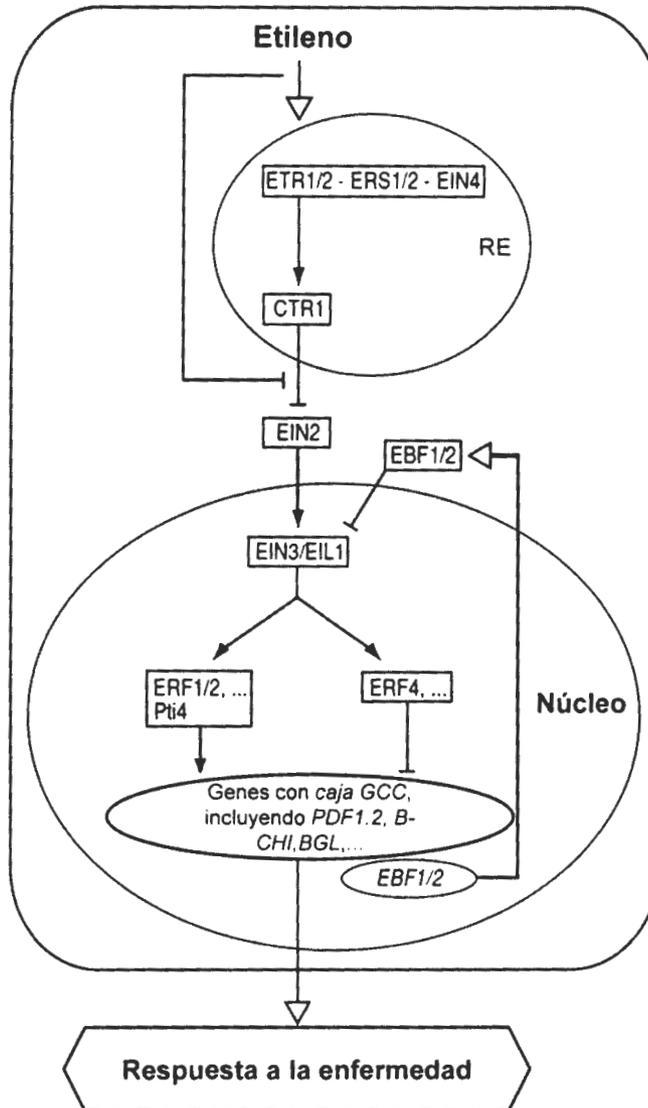


Figura 1.5. Modelo esquemático de la vía de señalización del etileno. Las flechas y las líneas interrumpidas muestran regulación positiva y negativa, respectivamente. Los genes y las proteínas están representados en óvalos y cajas, respectivamente (modificado de Broekaert et al., 2006).

1.2.3 EL PAPEL DEL ETILENO EN EL MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS

La producción acelerada de ET en plantas es inducida por varios factores abióticos (herida, frío, daño mecánico, exposición a químicos) y bióticos (enfermedad y daño por insectos), así como durante procesos específicos del desarrollo, como la maduración de los frutos, la abscisión y la senescencia de flores, frutos y hojas. La síntesis de ET en la planta a menudo se incrementa significativamente durante la infección por patógenos o por tratamientos con inductores derivados de los mismos. Se ha propuesto que el ET actúa como un mensajero durante las interacciones planta-patógeno. Dependiendo del modelo, durante la patogénesis, el ET puede ser un estímulo para las respuestas de defensa que dirigen la resistencia, o de manera contraria, puede tener un papel en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y en la susceptibilidad endógena (Arshad & Frankenberger, 2002). Así, el ET puede ser capaz de promover ya sea la resistencia a la enfermedad o la susceptibilidad, dependiendo de la combinación particular planta-patógeno (Chen *et al.*, 2003).

En hojas de tabaco, se observó una acumulación localizada de ET, así como un incremento en la actividad de la ACC sintasa y la ACC oxidasa, en el tejido clorótico que rodeaba directamente las lesiones primarias de la hoja, en respuesta a la inoculación con el virus del mosaico del tabaco y la infección con *Phytophthora infestans*. La localización de ambas actividades enzimáticas en los tejidos que rodean las lesiones primarias sugiere que la producción de ET por parte del hospedante puede ser parte de la respuesta de muerte celular que ocurre durante la formación de las lesiones primarias (Lund *et al.*, 1998).

La gran estimulación de la producción de ET es una característica común en las reacciones de hipersensibilidad que resultan de la combinación incompatible de un patógeno avirulento y su hospedante resistente, en donde el patógeno es rápidamente restringido debido a la necrosis del tejido, en el sitio de penetración.

Con relación a sus efectos sobre la transcripción, el ET producido después del ataque por patógenos estimula las respuestas de defensa regulando la expresión de un amplio rango de genes relacionados con la defensa, incluyendo a aquellos que codifican proteínas PR, como quitinasas y osmotinas (Chen *et al.*, 2003), β -1,3-glucanasas y PR1. Interesantemente, los promotores de cada uno de estos genes contienen un elemento denominado la "caja GCC" (Deikman, 1997). Además, dependiendo de la especie, el ET puede inducir la síntesis o estimular la actividad de enzimas de la biosíntesis de compuestos volátiles, necesarias para la producción de fitoalexinas isoflavonoidales y la lignificación, así como para promover la síntesis de proteínas PRs (Knoester *et al.*, 1998).

En el género *Capsicum*, principalmente en la especie *C. annuum*, se han identificado algunos genes relacionados con la defensa inducidos por el ET, entre los que están los que codifican las β -1,3-glucanasas y las quitinasas, cuya síntesis y acumulación fue inducida por una infección con *Phytophthora capsici* en el tejido del tallo (Kim & Hwang, 1994). Con relación a la PR1, su ADNc fue aislado de hojas de chile infectadas con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y la expresión de PR1 fue inducida por ET (Kim & Hwang, 2000).

También se ha identificado al factor de transcripción CaWRKY2 en *C. annuum*, el cual es inducible por patógenos, y que probablemente tiene una función en las respuestas tempranas de defensa de la planta a factores adversos de tipo abiótico y biótico (Oh *et al.*, 2006).

1.3 EL CHILE HABANERO

Los chiles pertenecen al género *Capsicum*, de la familia *Solanaceae*. Existen 27 especies, de las cuales solo cinco están domesticadas y se cultivan actualmente: *C. annuum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C.*

frutescens Linné y *C. pubescens* Ruiz y Pavón (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001).

De manera general se cree que el chile habanero proviene de las tierras bajas de la cuenca amazónica, específicamente en Bolivia; sin embargo, su centro de domesticación y patrón de dispersión no están bien determinados, pero se sugiere que inicialmente se domesticó en las tierras bajas del norte del Amazonas (Eshbaugh, 1993; Perry *et al.*, 2007). La Península de Yucatán se considera centro de diversidad genética de esta especie, debido a la gran variedad de formas, tamaños, colores, sabores, aromas y picor de sus cultivares (Trujillo-Aguirre, 2002). El fruto del chile habanero es una baya hueca en forma de trompo, poco carnosa. En su interior, se encuentra la placenta que es el lugar donde se sintetizan los capsaicinoides, principalmente la capsaicina y la dihidrocapsaicina. El fruto se considera uno de los más picantes del mundo; al analizar los frutos de diversas accesiones de un banco de germoplasma de chile habanero de variedades criollas de la Península de Yucatán, se determinó un contenido de capsaicinoides de 59.51 mg·g⁻¹ (892.719 Unidades Scoville) en el pericarpio, mientras que en la placenta se detectaron 307.78 mg·g⁻¹ (4,616,628 Unidades Scoville) (Canto-Flick *et al.*, 2008).

El color del fruto antes de alcanzar la madurez generalmente es verde, y al madurar puede ser de color amarillo, naranja, rojo, morado o café (González *et al.*, 2006).

Debido a la diversidad de forma, color, sabor, picor y aroma, los frutos de chile son importante materia prima en diferentes partes del mundo para la elaboración de diferentes platillos. Los frutos de chile se encuentran entre los productos hortícolas de mayor comercialización en los trópicos, colocándose sólo después del jitomate. En 2008, México ocupó el segundo lugar mundial entre los principales países productores de chile (FAOSTAT, 2008). En la República Mexicana, el Estado de Yucatán es el principal productor de chile

habanero, reportándose en el año 2009 un volumen de producción de 2904.1 Ton (SIAP, 2009).

El valor nutritivo de los frutos del género *Capsicum* se basa en su contenido significativo de nutrientes esenciales y sus altos niveles de vitaminas C y A. También es una buena fuente de vitaminas del complejo B. Los frutos exhiben propiedades antimicrobianas y tienen efectos farmacológicos (Soetarno *et al.*, 1997). El picor es aparentemente la única propiedad farmacológica que los denomina como medicina, solamente los más pungentes y no los chiles dulces, actúan como agentes terapéuticos. Los capsaicinoides son los compuestos que le brindan el picor al chile. Estos compuestos se utilizan ampliamente para la elaboración de salsas picantes a nivel industrial, así como en la elaboración de diferentes productos farmacéuticos, incluyendo almohadillas para disminuir el dolor muscular y productos para aliviar el dolor de enfermedades como la artritis, entre otras (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001).

Recientemente, se ha reportado que la capsaicina promueve la muerte celular e inhibe el crecimiento de varios tipos de células tumorigénicas al inducir la apoptosis, por lo que se estudia su uso potencial como inhibidor de la carcinogénesis (Sánchez *et al.*, 2006).

1.3.1 ORGANISMOS PATOGENICOS QUE ATACAN AL GÉNERO CAPSICUM

El cultivo del chile es afectado por diferentes organismos que reducen en forma considerable la producción y la calidad del fruto. Entre ellos destacan los patógenos que tienen su origen en el suelo, por lo que generalmente infectan las raíces y las bases de los tallos. Su dispersión y estados de sobrevivencia se dan básicamente en el suelo; además, muchos de estos patógenos producen esporas que se dispersan por medio del aire o del agua, lo que les permite propagarse a grandes distancias. Existen varios tipos de patógenos que atacan al género *Capsicum*, como los hongos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp,

Sclerotium rolfsii, *Verticillium* sp., *Colletotrichum capsici*, *Alternaria* sp., *Macrophomina* sp, *Ralstonia solanacearum*, *Aphanomyces* sp y *Sclerotinia sclerotiorum*; las bacterias *Xanthomonas* sp, y *Erwinia* sp, y los oomicetos *Phytophthora* sp., *Pythium aphanidermatum*, *P. debaryanum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum*, *P. ultimum*, y *P. vexans* (Chung *et al.*, 2004; Vázquez-López *et al.*, 2004; Escalona *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004; González-Pérez *et al.*, 2004).

En la Península de Yucatán los virus reportados que atacan al chile habanero son: el virus huasteco del chile, el virus mosaico dorado del chile, el virus mosaico dorado del frijol y el virus del enrollamiento de la hoja del tomate (Díaz-Plaza *et al.*, 2005).

Los nematodos también infectan al género *Capsicum* y entre los más frecuentes están *Meloidogyne* sp, *Ditylenchus* sp, *Helicotylenchus* sp, *Pratylenchus* sp, *Tylenchorhynchus* sp, *Xiphinema* sp, *Rotylenchus* sp, *Tylenchus* sp, *Meloidodera* sp y *Globodera virginiae* (Velásquez *et al.*, 2005).

Entre las enfermedades que provocan estos patógenos predominan la marchitez, que va desde una ligera pérdida de turgencia hasta la pérdida de hojas, la pudrición de la corona y la raíz, el daño aéreo de las hojas, el tallo y los frutos, la formación de agallas y manchas, la antracnosis, la clorosis, la necrosis y el rizamiento de las hojas. Todas estas enfermedades resultan en una marcada reducción en la producción de las plantas de chile (Chae *et al.*, 2006; Luna-Ruiz & Moreno-Rico, 2005).

1.3.2 *Fusarium oxysporum* Y LA MARCHITEZ VASCULAR

Fusarium es uno de los cuatro géneros de hongos que provocan marchitez (además de *Ceratocystis*, *Ophiostoma* y *Verticillium*), siendo *F. oxysporum* el agente más frecuente (Agrios, 2005). Las cepas patogénicas y no patogénicas de *F. oxysporum* se encuentran en los suelos agrícolas en todo el mundo, así como también existen poblaciones sustanciales en muchas comunidades de

plantas nativas en suelos que jamás han sido cultivados (Gordon & Martyn, 1997).

Diferentes plantas hospedantes son atacadas por formas especiales o razas del hongo: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ataca al jitomate (*Solanum lycopersicum*) y a diferentes especies del género *Capsicum*, como *C. annuum* y *C. chinense* (Agrios, 2005). Este hongo, que se denomina imperfecto al presentar únicamente estructuras asexuales, produce tres tipos de esporas asexuales: los microconidios, que poseen una o dos células, son las esporas más frecuentes y abundantes bajo cualquier condición, incluso dentro de los vasos de la planta infectada; los macroconidios, que son las esporas típicas de *Fusarium*; presentan de tres a cinco células, tienen extremos gradualmente curvados y aparecen en grupos tipo esporodóquio en la superficie de las plantas muertas, y finalmente, las clamidosporas, esporas redondas de una o dos células con pared celular gruesa que se producen dentro o en el extremo de micelio maduro o en macroconidios. Los tres tipos de esporas se producen en los cultivos del hongo, y probablemente en el suelo, aunque sólo las clamidosporas pueden sobrevivir en este medio por periodos largos, y los macroconidios, en la superficie de plantas infectadas (Agrios, 2005; Berrocal-Lobo & Molina, 2007).

Los diferentes tipos de marchitez vascular están ampliamente distribuidos, son muy destructivos y pueden ocasionar la muerte completa de la planta en cuestión de semanas, aunque en el caso de algunas plantas perennes, la muerte se puede presentar después de varios meses o años. La marchitez ocurre como resultado de la presencia y la actividad del patógeno en el xilema de la planta. Mientras la planta infectada permanezca viva, el hongo permanece en los tejidos vasculares, y en unas cuantas células alrededor; sólo cuando la planta muere, éstos se mueven a otros tejidos y esporulan en o cerca de la superficie de la planta muerta (Agrios, 2005).

Todos los tipos de marchitez vascular tienen características en común: las hojas de las plantas infectadas pierden turgencia, se vuelven flácidas, se inclinan, se

marchitan, y adquieren una coloración amarilla, después café, para luego morir. En secciones transversales de los tallos y ramas infectados, se observan áreas café como un anillo que consiste de tejidos vasculares decolorados (Vakalounakis, 1996; Agrios, 2005). En el xilema de los tallos y las raíces infectados pueden estar presentes las esporas o el micelio del hongo causal, e incluso algunos de los vasos pueden estar obstruidos con micelio, esporas, o polisacáridos producidos por el hongo. Esta obstrucción se incrementa por geles y gomas productos de la acumulación y la oxidación de productos hidrolizados de las células vegetales al ser atacadas por las enzimas fúngicas. Estos procesos son también responsables de la coloración café de los tejidos vasculares afectados. A menudo, las células del parénquima que rodean los vasos del xilema son estimuladas por secreciones del patógeno y se dividen excesivamente, que combinado con cierta debilidad de las paredes de los vasos (debido a una inhibición en el crecimiento de las células del xilema por la presencia del patógeno), resulta en una reducción del diámetro, o bien del colapso completo de los vasos. En algunos hospedantes, las células del parénquima adjuntas al xilema producen tilosas, cuya estructura redonda protrude en los vasos y contribuye a su obstrucción (Agrios, 2005).

Las toxinas generadas por el patógeno son secretadas en los vasos y trasladadas a las hojas, en donde reducen la síntesis de clorofila a lo largo de las venas y reducen la fotosíntesis, perturban la permeabilidad de las membranas celulares de la hoja y su habilidad para controlar la pérdida de agua a través de la transpiración, y por lo tanto, resulta en epinastia de las hojas, marchitez, necrosis intervenal, oscurecimiento y muerte (Agrios, 2005).

Los diferentes tipos de marchitez ocasionados por *Fusarium* tienen ciclos infecciosos característicos, y se desarrollan de manera similar a la marchitez causada en jitomate por *F. oxysporum* sp *lycopersici*. Esta enfermedad es más destructiva en regiones con climas cálidos. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecen como un aclaramiento ligero de las venas en las hojas

jóvenes de la planta y luego, las hojas de mayor edad muestran epinastia, producto de una inclinación de los peciolo. Por lo general, las plantas infectadas en el estadio de plántula se marchitan y mueren rápidamente. La fruta puede infectarse, podrirse y entonces caerse, y las raíces también se pueden infectar; observándose que después de un periodo inicial de latencia las raíces más pequeñas se pudren (Agrios, 2005).

Cuando plantas sanas crecen en un suelo contaminado, el tubo germinativo de las esporas o el micelio penetra las puntas de las raíces directamente o a través de una herida o en el punto donde se forman las raíces laterales. El micelio avanza intercelularmente a través del córtex de la raíz y cuando alcanza los vasos del xilema, entra en ellos. El micelio entonces permanece en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente hacia arriba, esto es, hacia el tallo y la corona de la planta. Mientras tanto en los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidios, los cuales se separan y son transportados hacia arriba a través de la corriente de la savia. Los microconidios germinan en el punto donde se detiene su movimiento ascendente y, el micelio penetra la pared superior del vaso, donde más microconidios se producen en el siguiente vaso. El micelio también avanza lateralmente hacia los vasos adyacentes, penetrándolos a través de los hoyos. Una combinación de los procesos discutidos con anterioridad, esto es la obstrucción de los vasos por el micelio, las esporas, los geles, las gomas y las tilosas aplastando los haces vasculares por la proliferación de células del parénquima, da lugar al desequilibrio hídrico de la planta infectada. Cuando las hojas transpiran más agua de la que las raíces y el tallo puede transportar hacia ellas, los estomas se cierran, las hojas se marchitan y mueren, y finalmente, la planta entera sucumbe. El hongo invade todos los tejidos de la planta, alcanza la superficie de la planta muerta y ahí esporula profusamente. Las esporas se diseminan a otras plantas o áreas por medio del viento y el agua (Agrios, 2005).

El patógeno es un habitante del suelo, que entre los periodos de cultivo sobrevive en los campos de plantas infectadas como micelio y en todas sus formas de esporas, aunque de manera más común, y sobre todo en las regiones con temperaturas más frías, como clamidosporas. Se dispersa distancias cortas por medio del agua o de equipo agrícola contaminado, y a distancias mayores principalmente en trasplantes infectados y/o en el suelo que los acompaña. En general, una vez que un área se infesta con *Fusarium* permanece así indefinidamente.

Algunas veces, cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura relativamente baja, las plantas infectadas suelen producir buenos rendimientos; sin embargo, en tales casos, el hongo puede alcanzar los frutos y penetrar o contaminar la semilla. Generalmente, los frutos infectados mueren y caen; si son cosechados, las semillas contaminadas son tan ligeras que son eliminadas en los procedimientos de extracción y limpieza de la semilla, y por lo tanto, no tiene un papel importante en la dispersión del hongo (Agrios, 2005).

De manera destacada, la variedad de chile habanero naranja que se utiliza en este trabajo es resistente a la cepa de *Fusarium oxysporum* disponible. Debido a que esta cepa se aisló de plantas de chile habanero enfermo de "marchitez" (Dr. Ignacio Islas comunicación personal), es muy probable que la cepa de *F. oxysporum* no sea virulenta contra esta variedad, y que haya desarrollado un comportamiento oportunista.

1.3.3 EL GÉNERO PHYTOPHTHORA

Las diferentes especies del género *Phytophthora* son oomicetos, al igual que las especies de *Pythium*, los mohos vellosos y los hongos "polvo blanco". Los oomicetos son un grupo de organismos heterotróficos cuya morfología y fisiología se asemeja a la de los hongos. No obstante, los análisis bioquímicos modernos así como los análisis filogenéticos basados en las secuencias de

genes ribosomales y mitocondriales demuestran que los oomicetos comparten poca afinidad taxonómica con los hongos filamentosos, y que están más relacionados con las algas doradas-café. Los oomicetos pertenecen al grupo de los estramenófilos (Kamoun, 2006; Tyler, 2002).

Entre los oomicetos, se podría considerar a *Phytophthora infestans* como su miembro más notable y un organismo modelo; es el patógeno más destructivo del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) que provocó la devastadora enfermedad conocida como tizón tardío, la cual entre 1845 y 1860 dio lugar a una hambruna en Irlanda y que representó la muerte de alrededor de un millón de personas, así como la migración de otro millón y medio principalmente a la costa este de los Estados Unidos. Además de *P. infestans*, existen otras especies relacionadas que causan daños severos a cultivos de importancia industrial y ecológica. *Phytophthora sojae* ocasiona pérdidas de millones de dólares cada año en el cultivo de la soya y *Phytophthora ramorum* provoca la enfermedad conocida como "muerte repentina del roble", la cual tiene efectos significativos en el balance de los ecosistemas que albergan al roble, afectando a otras especies vegetales como el laurel (Rizzo *et al.*, 2005).

Los genomas de *P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum* han sido secuenciados (Haas *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2006). Estos estudios revelaron que *P. infestans* posee familias expandidas de genes efectores de la enfermedad, las cuales incluyen genes que son inducidos durante la infección o que se ha hipotetizado que tienen actividades que alteran la fisiología del hospedante (Hass *et al.*, 2009).

Las tierras altas del centro de México se consideran centro de diversidad genética de *P. infestans*, así como de diversas especies del género *Solanum* (Flier *et al.*, 2003; Grünwald & Flier, 2005). *P. infestans* es heterotálica y produce oosporas cuando las cepas compatibles de los tipos opuestos de apareamiento A1 y A2 interactúan (Galindo & Gallegly, 1960). En esta región de

México, las oosporas se forman de manera abundante en el campo y son infectivas hasta por dos años (Niederhauser, 1991).

P. infestans tiene un rango amplio de hospedantes, representado por otras especies de Solanáceas como *S. lycopersicum*, *S. sarrachoides*, *S. triflorum*, *S. dulcamara*, *S. sisymbriifolium* y *Nicotiana benthamiana* (Bectell *et al.*, 2006; Dandurand *et al.*, 2006). *Solanum nigrum* es una maleza que crece predominantemente entre los cultivos de Solanáceas, como el jitomate y la papa. Ha sido ampliamente estudiada, pues presenta resistencia contra *P. infestans*, por lo que se le considera como un no-hospedante (Lebecka, 2008).

P. infestans es un patógeno hemibiotrófico: las plantas de papa susceptibles son infectadas por medio de la penetración de las células epidermales, o por la entrada directa del patógeno en las hojas a través de los estomas. La fase biotrófica se caracteriza por la formación de estructuras de alimentación tipo haustorio dentro de las células infectadas, mientras que el crecimiento intercelular del patógeno así como la muerte activa de las células del hospedante durante la fase necrotrófica resultan en la rápida destrucción de los tejidos y eventualmente de la planta completa. Los cultivos que no se protegen y que están en condiciones favorables climáticas, así como en presencia de una fuente de inóculo pueden ser destruidos en 10 a 14 días (Govers, 2005). Las respuestas de defensa basal se activan en las plantas susceptibles; sin embargo, no son suficientes para detener el crecimiento del patógeno (Halim *et al.*, 2007).

Una característica importante durante la patogénesis de los oomicetos es que éstos pueden lograr la colonización de una planta reprogramando el circuito de defensa de las células del hospedante a través de un grupo de proteínas efectoras de la enfermedad. Dichas proteínas tienen como blanco distintos sitios en la planta, ya sea en el apoplasto o en el citoplasma. Algunos efectores pueden facilitar la colonización de la planta (factores de virulencia y toxinas),

pero otros pueden activar sus sistemas de defensa (factores de avirulencia o elicitores) (Kamoun, 2006).

Un gran número de especies de *Phytophthora* son patógenos destructivos que causan pudrición de las raíces, las coronas, los tallos, las hojas y los frutos de una amplia variedad de plantas con importancia agrícola, ornamental, así como en plantas nativas (Tyler, 2002). Algunas especies atacan cientos de especies hospedantes, como es el caso de *P. cinnamomi*, *P. parasitica* y *P. cactorum*, a diferencia de otras que infectan a sólo unas cuantas. Debido a los grandes daños que ocasionan estos patógenos, éstos redundan en pérdidas de gran importancia económica (Tyler, 2002).

Las especies de *Phytophthora* crecen generalmente como una hifa cenocítica o con pocas septas. Comúnmente producen tres tipos de esporas de manera asexual: los esporangios, las zoosporas y las clamidosporas.

Las esporas sexuales u oosporas se forman cuando la estructura masculina, el anteridio, se asocia con la femenina que posee el huevo (oogonio). Algunas especies de *Phytophthora* son autofértiles (homotálicas), mientras que otras son heterotálicas. Las especies heterotálicas se dividen de acuerdo al tipo de gameto en A1 y A2, y la cruce se presenta cuando estos dos tipos de gametos están en contacto (Ristaino & Johnston, 1999).

1.3.3.1 EL CICLO DE VIDA ASEXUAL DE *PHYTOPHTHORA*

En los oomicetos la reproducción asexual comprende dos fases principales: la formación de esporangios multinucleados (esporangiogénesis) y la formación de zoosporas uninucleadas móviles (zoosporogénesis). Los esporangios asexuales y las zoosporas son los principales agentes de dispersión, y los principales medios para iniciar la infección en el hospedante (Hardham, 2009).

Cuando se induce la reproducción asexual, generalmente por una baja disponibilidad de nutrientes, el micelio produce esporangios de manera directa de los ápices de la hifa somática, o indirecta, a través de la producción de un esporangióforo, en el cual el esporangio se desarrolla (Alexopoulos *et al.*, 1996). Dependiendo de la especie y las condiciones ambientales, el esporangio multinucleado germina directamente formando una hifa, o indirectamente formando zoosporas biflageladas (Hardham, 2009).

La zoosporogénesis se presenta de manera muy rápida (entre 10 a 15 min en algunas especies de *Phytophthora*). El rompimiento del esporangio maduro se favorece en condiciones húmedas y frías (Hyde *et al.*, 1991). El esporangio maduro de la mayoría de los oomicetos posee una papila apical a través de la cual se descargan las zoosporas (entre 10 y 30 zoosporas), que entonces se liberan en una vesícula evanescente derivada del material de la pared celular papilar (Webster & Dennis, 1967). La ruptura de la papila y el movimiento de la mayoría de las zoosporas fuera del esporangio están regulados por la presión hidrostática que se forma dentro del esporangio (Hoch & Mitchell, 1973).

Las zoosporas son acuáticas, de vida corta (horas) (Tyler, 2002), y tienen forma ovoide con dos flagelos que emergen del centro de un surco que recorre la superficie ventral. La movilidad biflagelada tiene un papel importante al aumentar la oportunidad del organismo de encontrar una fuente adecuada de nutrimentos. Los dos flagelos difieren en su longitud y la morfología de su superficie. El flagelo anterior (tinsel) es el más corto y posee dos filas de pelos denominados mastigonemos, mientras que el posterior (látigo) se proyecta detrás de la zoospora, proveyéndola de direccionalidad (Cahil *et al.*, 1996).

Las zoosporas son atraídas a la superficie de un hospedante potencial a través de la detección de gradientes químicos y eléctricos. En las especies fitopatógenas, estas respuestas tácticas generalmente no son específicas, ya que guían a las zoosporas tanto a hospedantes como a no hospedantes (Tyler, 2002). Las zoosporas de *Phytophthora* nadan a lo largo de una trayectoria

helicoidal a velocidades de $100\text{-}200\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, dependiendo de la temperatura y la especie (Carlile, 1983). En condiciones de escasos nutrientes y bajas concentraciones de Ca^{2+} , las zoosporas enquistadas, a menudo, se diferencian en un esporangio, el cual libera una sola espora nueva, llamada zoospora secundaria. Este proceso se puede repetir un número de veces, con el resultado de que una sola zoospora móvil puede avanzar una distancia sustancial por medio de estas encarnaciones repetidas. La movilidad de las zoosporas también aumenta enormemente la distancia que pueden ser acarreadas por un flujo de agua a través de una matriz particulada como el suelo (Carlile, 1983; Tyler, 2002).

Las zoosporas de la mayoría de las especies de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* muestran una atracción no específica a ciertos aminoácidos como el aspartato, el glutamato, la asparagina, la glutamina, la arginina y la metionina. La mayoría también son atraídas por el etanol (0.2-20 mM), el cual puede promover la infección de raíces inundadas. La atracción a estos compuestos puede representar una de tipo no específico de muchas zoosporas de *Phytophthora* y *Pythium* a los exudados de las raíces; sin embargo, algunas especies de estos dos géneros, especialmente aquellas con rangos de hospedantes restringidos, parecen exhibir mayor especificidad en su atracción por los exudados de las raíces. El ejemplo mejor caracterizado es la atracción de zoosporas de *P. sojae* a las isoflavonas daidzeína y genisteína, las cuales están presentes en semillas de soya y son exudadas por la raíz. Las zoosporas de *P. sojae* son atraídas por concentraciones menores de 0.1 nM, mientras que las zoosporas de otras seis especies de *Phytophthora* y una de *Pythium* no modificaron su comportamiento aún a concentraciones de 30 μM (Tyler, 2002).

Una vez que la zoospora alcanza un sitio adecuado para iniciar la infección, ésta se enquista. Algunas especies ajustan su patrón de nado, de tal manera que la superficie ventral quede de frente al hospedante potencial. Durante el enquistamiento, la zoospora se separa de los dos flagelos, se redondea, se

secretan materiales adhesivos y de ser una célula sin pared celular, se convierte en un quiste esférico con pared. Típicamente después de 30 min a 1 h, el quiste germina formando un tubo germinativo que emerge del centro de la superficie ventral del lado que se encuentra el hospedante, y crece quimiotrópicamente hacia un sitio de penetración adecuado (Hardham, 2009).

Conforme el tubo germinativo penetra la superficie de la planta, se puede desarrollar una estructura tipo apresorio, en la que factores como la topografía de la superficie y la hidrofobicidad inducen la formación de esta estructura, la cual está especializada en ejercer una presión que facilita la penetración de la superficie de la planta (Bircher & Hohl, 1997). Además de la formación de la estructura tipo apresorio, los oomicetos (al igual que los hongos) sintetizan y secretan enzimas que degradan los componentes de la pared celular como la pectina, la celulosa y los xiloglucanos (Boudjeko *et al.*, 2006). También secretan proteínas (inhibidores de proteasas y glucanasas) que protegen al patógeno de las moléculas de defensas de la planta (Boudjeko *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2005).

Después de penetrar la epidermis, la hifa se ramifica a través de los tejidos subyacentes del hospedante, creciendo inter e intracelularmente. En las especies hemibiotróficas, durante la etapa biotrófica, el contacto de la hifa con una célula adecuada del parénquima dispara la formación del haustorio, el cual le permite tomar los nutrimentos de la célula viva, y además, deben ser capaces de orquestar cambios extensos en la organización y el metabolismo de la célula hospedante.

La colonización exitosa culmina con la esporulación. Entre el primer y el tercer día, se forman los esporangios en la superficie de la planta y el ciclo de vida del patógeno comienza de nuevo (Hardham, 2009).

1.3.3.2 *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici Leonian es el agente causal de la enfermedad de la marchitez del chile, una de las más importantes en esta especie en todo el mundo. Este patógeno provoca la marchitez, ya sea en una sola planta o en grupos de ellas en el campo, sobre todo en suelos saturados con agua después de la irrigación, o durante la temporada de lluvia. En los estadios tempranos, las primeras señales de enfermedad se presentan como áreas necróticas de color café en la raíz y en la corona de las plantas, después la enfermedad se desarrolla rápidamente, hasta la marchitez y la muerte de las plantas. *P. capsici* puede infectar virtualmente cada parte de la planta; pues este patógeno forma lesiones negras distintivas en el tallo y puede infectar las hojas. Las lesiones en hojas y tallos son comunes cuando el inóculo se dispersa por salpicaduras del suelo a las porciones bajas de la planta. El patógeno también puede infectar la fruta, dando lugar a lesiones que están típicamente cubiertas con esporangio blanco. *P. capsici* también infecta a algunas Cucurbitáceas, como el pepino, la calabaza y el melón (Ristaino & Johnston, 1999), así como otras Solanáceas, como el jitomate y la berenjena (Kreutzer *et al.*, 1940).

P. capsici se reproduce de manera asexual y sexual, ya que produce los dos tipos de gametos, A1 y A2. Cada tipo produce hormonas que son responsables de la diferenciación de los gametángios en el tipo de gameto opuesto. Ambos tipos han sido identificados en una sola planta. En la gametangia, se presenta la meiosis, la plasmogamia y la cariogamia, las cuales resultan en la formación de oosporas, que son el resultado de la reproducción sexual y que sirven como inóculo. Las oosporas pueden germinar directamente a través de un tubo germinativo, o de manera indirecta vía la formación de un esporangio (Ristaino & Johnston, 1999).

1.4 REFERENCIAS

- Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltveit (1992). *Ethylene in plant biology*. Academic Press, 2nd edition, San Diego, California. pp. 1-119.
- Abramovitch, R. and G. B. Martin (2004). *Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses*. Current Opinion in Plant Biology, 7, 356-364.
- Adams, D. O. and S. F. Yang (1977). *Methionine metabolism in apple tissue—implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in conversion of methionine to ethylene*. Plant Physiology, 60, 892-896.
- Adams, D. O. and S. F. Yang (1979). *Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 170-174.
- Adams-Phillips, L., C. Barry, P. Kannan, J. Leclercq, M. Bouzayen and J. Giovannoni (2004). *Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features*. Plant Molecular Biology, 54, 387-404.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology, 5th edition Elsevier. pp. 522-523.
- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims and M. Blackwell (1996). Introductory mycology. John Wiley & Sons, New York. pp. 867.
- Anbinder, T. (2001). *Lord Palmerston and the Irish Famine Emigration*. The Historical Journal, 44(2), 441-469.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). *Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annual Review of Plant Biology, 55, 373-99.
- Arshad, M. and W. T. Frankenberger (2002). *Ethylene Agricultural Sources and Applications*. Kluwer Academia/Plenum Publishers. pp. 241.
- Audenaert, K., G. B. De Meyer and M. M. Höfte (2002). *Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms*. Plant Physiology, 128(2), 491-501.
- Balagué, C., B. Lin, C. Alcon, G. Flottes, S. Malmström, C. Köhler, G. Neuhaus, G. Pelletier, F. Gaymard and D. Roby (2003). *HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic nucleotide-gated channel ion channel family*. The Plant Cell, 15, 365-379.
- Bectell, M. C., C. D. Smart, C. H. Haney and W. E. Fry (2006). *Host-pathogen interactions between Phytophthora infestans and the solanaceous hosts*

- Calibrachoa x hybridus*, *Petunia x hybrida*, and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Disease*, 90, 24–32.
- Bennett, M., M. Gallagher, J. Fagg, C. Bestwick, T. Paul, M. Beale and J. Mansfield (1996). *The hypersensitive reaction, membrane damage and accumulation of autofluorescent phenolics in lettuce cells challenged by Bremia lactucae*. *The Plant Journal*, 9(6), 851-865.
- Berestetskiy, A. O. (2008). *A review of fungal phytotoxins: from basic studies to practical use*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(5), 453-465.
- Berrocal-Lobo, M, and A. Molina (2007). *Arabidopsis defense response against Fusarium oxysporum*. *Trends in Plant Science*, 13(3), 145-150.
- Binder, B. M., J.M. Walker, J.M. Gagne, T.J. Emborg, G. Hemmann, A.B. Bleecker and R.D. Vierstra (2007). *The Arabidopsis EIN3 Binding F-Box Proteins EBF1 and EBF2 Have Distinct but Overlapping Roles in Ethylene Signaling*. *The Plant Cell*, 19, 509–523.
- Bircher, U. and H. R. Hohl (1997). *Environmental signaling during induction of appressorium formation in Phytophthora*. *Mycol Res*, 101, 395-402.
- Bleecker, A. B. and H. Kende (2000). *Ethylene: A gaseous signal molecule in plants*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 1-18.
- Bostock, R. M. (2005). *Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit*. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 545-580.
- Boudjeko, T., C. Andème-Onzighi, M. Vicré, A. P. Balangé, D. O. Ndoumou and A. Driouch (2006). *Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by Pythium myriotylum*. *Planta*, 223, 271-282.
- Brodersen, P., M. Petersen, H. B. Nielsen, S. Zhu, M. A. Newman, K. M. Shokat, S. Rietz, J. Parker and J. Mundy (2006). *Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4*. *The Plant Journal*, 47, 532-546.
- Broekaert, W. F., S. L. Delauré, M. F. C. De Bolle and B. P. A. Cammue (2006). *The role of ethylene in host-pathogen interactions*. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 393-416.
- Browse, J. (2009). *Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone*. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
- Brunner, F., S. Rosahl, J. Lee, J. J. Rudd, C. Geiler, S. Scheel and T. Nürnberger (2002). *Pep-13, a plant defense-inducing pathogen associated pattern from Phytophthora transglutaminases*. *The EMBO Journal*, 21, 6681-6688.

- Bush, S. M. and P. J. Krysan (2007). *Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development*. Journal of Experimental Botany, 58, 2181-2191.
- Cahil, D. M., M. Cope and A. R. Hardham (1996). *Thrust reversal by tubular mastigonemes: immunological evidence for a role of mastigonemes in forward motion of zoospores of Phytophthora cinnamomi*. Protoplasma, 194, 18-28.
- Canto-Flick, A., E. Balam-Uc, J. J. Bello-Bello, C. Lecona-Guzmán, D. Solís-Marroquín, S. Avilés-Viñas, E. Gómez-Uc, G. López-Puc, L. G. Iglesias-Andreu and N. Santana-Buzzy (2008). *Capsaicinoids content in Habanero pepper (Capsicum chinense Jacq.): hottest known cultivars*. HortScience, 43(5), 1344-1349.
- Carlile, M. J. (1983). "Motility, taxis and tropism in Phytophthora", in *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. Erwin, D. C., S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao (ed). American Phytopathological Society, St Paul. pp. 95-107.
- Chae, D. H., R. D. Jin, H. Hwangbo, Y. W. Kim, Y. C. Kim, R. D. Park, H. B. Krishnan and K. Y. Kim (2006). *Control of late blight (Phytophthora capsici) in pepper plant with a compost containing multitude of chitinase-producing bacteria*. BioControl, 51, 339-351.
- Chen, N., P. H. Goodwin and T. Hsiang (2003). *The role of ethylene during the infection of Nicotiana tabacum by Colletotrichum destructivum*. Journal of Experimental Botany, 54(392), 2449-2456.
- Chisholm, S. T., G. Coaker, B. Day and B. J. Staskawicz (2006). *Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response*. Cell, 124, 803-814.
- Choudhury, R. S., S. Roy, P. P. Saha, S. K. Singh and D. N. Sengupta (2008). *Characterization of differential ripening pattern in association with ethylene biosynthesis in the fruits of five naturally occurring banana cultivars and detection of a GCC-box-specific DNA-binding protein*. Plant Cell Reports, 27, 1235-1249.
- Chung, E., J. M. Park, S. K. Oh, Y. H. Joung, S. Lee and D. Choi (2004). *Molecular and biochemical characterization of the Capsicum annum calcium-dependent protein kinase 3 (CaCDPK3) gene induced by abiotic and biotic stresses*. Planta, 220, 286-295.
- Colcombet, J. and H. Hirt (2008). *Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes*. Biochemical Journal, 413, 217-226.

- Cvetkovska, M., C. Rampitsch, N. Bykova and T. Xing (2005). *Genomic analysis of MAP kinase cascades in Arabidopsis defense responses*. Plant Molecular Biology Reporter, 23, 331-343.
- Dandurand, L. M., G. R. Knudsen and C. V. Eberlein (2006). *Susceptibility of five nightshade (Solanum) species to Phytophthora infestans*. American Journal of Potato Research, 83, 205-210.
- Daub, M. E. and M. Ehrenshaft (2000). *The photoactivated Cercospora toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology*. Annual Review of Phytopathology, 38, 461-490.
- De Torres-Zabala M., W. Truman, M. H. Bennett, G. Lafforgue, J. W. Mansfield, P. Rodriguez-Egea, L. Bøgre and M. Grant (2007). *Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease*. The EMBO Journal, 26, 1434-1443.
- Deikman, J. (1997). *Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription*. Physiologia Plantarum, 100, 561-566.
- Díaz-Plaza, R., W. Avilés-Baeza and J. Trujillo-Aguirre (2005). *Resistencia a geminivirus en colectas de chile habanero en Yucatán*. Segunda Convención Mundial del Chile, 2005, 25-30.
- Djonović, S., W. A. Vargas, M. V. Kolomiets, M. Horndeski, A. Wiest and C. M. Kenerley (2007). *A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus Trichoderma viridis is required for induced systemic resistance in maize*. Plant Physiology, 145, 875-889.
- Durrant, W. E. and X. Dong (2004). *Systemic acquired resistance*. Annual Review of Phytopathology, 42, 185-209.
- Ekgren, S. K., Y. Liu, M. Schiff, S. P. Dinesh-Kumar and G. B. Martin (2003). *Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato*. The Plant Journal, 36, 905-917.
- Escalona, Y., D. Rodríguez, N. Contreras and N. Jiménez (2006). *Patógenos del suelo en el cultivo de pimentón en la zona baja del Municipio Jiménez, Estado Lara, Venezuela*. Bioagro, 18(1), 3-13.
- Eshbaugh, W.H. (1993). "History and exploitation of a serendipitous new crop discovery", in *New crops*, Janick, J. and J.E. Simon (eds). Wiley, New York. pp. 132-139.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). Retrieved July 7th, 2011 from <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.
- Flier, W.G., N. J. Grünwald, L. P. N. M. Kroon, A. K. Sturbaum, T. B. M van den Bosch, E. Garay-Serrano, H. Lozoya-Saldaña, W. E. Fry and L. J.

- Turkensteen (2003). *The population structure of Phytophthora infestans from the Toluca valley in central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild Solanum species*. *Phytopathology*, 93, 382–90.
- Filloux, A., A. Hachani and S. Bleves (2008). *The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes*. *Microbiology*, 154, 1570–1583.
- Galindo, A. J. and M. E. Gallegly (1960). *The nature of sexuality in Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 50, 123–128.
- Gamble R. L., M. L. Coonfield and G. E. Schaller. (1998). *Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 7825–7829.
- Glazebrook, J. (2005). *Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens*. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 205–227.
- Gomez-Gomez, L. and T. Boller (2000) *FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5, 1003–1011.
- González, E. T., P. L. Gutiérrez and M. F. Contreras (2006). *El chile habanero de Yucatán*. *Ciencia y Desarrollo*, 32(195), 9–15.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, V. Santiago-Santiago and A. Montero-Pineda (2004). *Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla*. *Agrociencia*, 38, 653–661.
- Gordon, T. R. and R. D. Martyn (1997). *The Evolutionary Biology of Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 111–128.
- Govers, F. (2005). "Late blight: The perspective from the pathogen", in *Potato in progress: Science meets practice*. A. J. Havenkort and P.C. Struik (ed). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. pp. 245–254.
- Grant, S. R., E. J. Fisher, J. H. Chang, B. M. Mole and J. L. Dangl (2006). *Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria*. *Annual Review of Microbiology*, 60, 425–449.
- Greenberg, J. T. and N. Yao (2004). *The role and regulation of programmed cell death in plant–pathogen interactions*. *Cellular Microbiology*, 6(3), 201–211.
- Grünwald, N. J. and W. G. Flier (2005). *The biology of Phytophthora infestans at its center of origin*. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 171–190.
- Haas, B. J. et al. (2009) *Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen Phytophthora infestans*. *Nature*, 461, 393–398.

- Hahn A. and K. Harter (2008). *Mitogen-activated protein kinase cascades and ethylene: signaling, biosynthesis, or both?* Plant Physiology, 149, 1207-1210.
- Halim, V. A., L. Eschen-Lippold, S. Altmann, M. Birschwilks, D. Scheel and S. Rosahl (2007). *Salicylic acid is important for basal defense of Solanum tuberosum against Phytophthora infestans.* Molecular Plant Microbe Interactions, 20, 1346–1352.
- Hammond-Kosack, K. and J. D. G. Jones (2000). "Responses to plant pathogens", in *Biochemistry and molecular biology of plants*, B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones (ed). American society of plant physiologists, Rockville Maryland, USA. pp.1102-1156.
- Hardham, A. R. (2009). "The asexual life cycle", in *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools*, Lamour, K. and S. Kamoun (ed). Wiley-Blackwell. pp. 93-119.
- Hirayama, T., J. J. Kieber, N. Hirayama, M. Kogan, P. Guzman, S. Nourizadeh, J. M. Alonso, W. P. Dailey, A. Dancis and J. R. Ecker (1999). *Responsive-to-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis.* Cell, 97, 383-393.
- Hoch, H. C. and J. E. Mitchel (1973). *The effects of osmotic water potentials on Aphanomyces euteiches during zoosporogenesis.* Canadian Journal of Botany, 51, 413-420.
- Hoffman-Sommergruber, K. (2002). *Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens.* Biochemical Society Transactions, 20, 930-935.
- Hyde, G. J., S. Lancelle, P. K. Hepler and A. R. Hardham (1991). *Freeze substitution reveals a new model for sporangial cleavage in Phytophthora, a result with implications for cytokinesis in other eukaryotes.* Journal of Cell Science, 100, 735-746.
- Ichimura, K., K. Shinozaki, G. Tena, J. Sheen, Y. Henry, A. Champion, M. Kreis, S. Zhang, H. Hirt, C. Wilson, E. Heberle-Bors, B. E. Ellis, P. C. Morris, R. W. Innes, J. R. Ecker, D. Scheel, D. F. Klessig, Y. Machida, J. Mundy, Y. Ohashi and J. C. Walker (2002). *Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature.* Trends in Plant Science, 7, 301-308.
- Jakoby, M., B. Weisshaar, W. Droge-Laser, J. Vicente-Carbajosa, J. Tiedemann, T. Kroj and F. Parcy (2002). *bZIP transcription factors in Arabidopsis.* Trends in Plant Science, 7, 106–111.
- Kamoun, S. (2006) *A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes.* Annual Review of Phytopathology, 44, 41-60.

- Kazan, K. and J. M. Manners (2009). *Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions*. Trends in Plant Science, 14, 373-382.
- Kesarwani, M., J. Yoo and X. Dong (2007). *Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis*. Plant Physiology, 144, 336-346.
- Kim, S. H., J. K. Hong, S. C. Lee, K. H. Sohn, H. W. Jung and B. K. Hwang (2004). *CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in Capsicum annuum*. Plant Molecular Biology, 55, 883-904.
- Kim, Y. J. and B. K. Hwang (1994). *Differential accumulation of beta-1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of Phytophthora capsici*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 45(3), 195-209.
- Kim, Y. J. and B. K. Hwang (2000). *Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible*. Physiologia Plantarum, 108, 51-60.
- Kim, Y. S., D. Choi, M. M. Lee, S. H. Lee and W. T. Kim (1998). *Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in Nicotiana glutinosa L.* Plant and Cell Physiology, 39(6), 565-573.
- Knoester, M., L. C. V. Loon, J. V. D. Heuvel, J. Hennig, J. F. Bol and H. J. M. Linthorst (1998). *Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95, 1933-1937.
- Kreutzer, W. A., E. W. Bodine and L. W. Durrell (1940). *Cucurbit diseases and rot of tomato fruit caused by Phytophthora capsici*. Phytopathology, 30, 972-975.
- Kunkel, B. N. and D. M. Brooks (2002). *Cross talk between signaling pathways in pathogen defense*. Current Opinion in Plant Biology, 5, 325-331.
- Kunze, G., C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller and G. Felix (2004). *The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants*. Plant Cell, 16, 3496-3507.
- Latijnhouwers, M., P. J. G. M. De Wit and F. Govers (2003). *Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants*. Trends in Microbiology, 11(10), 462-469.
- Lebecka, R. (2008). *Host-pathogen interaction between Phytophthora infestans and Solanum nigrum, S. villosum, and S. scabrum*. European Journal of Plant Pathology, 120, 233-240.

- Lee, S. J. and J. K. C. Rose (2010). *Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins*. *Plant Signaling and Behavior* 5, 769-772.
- Lieberman, M. and A. T. Kunishi (1965). *Ethylene production from methionine*. *Biochemical Journal*, 97, 449-459.
- Liu, Y., M. Schiff, K. Czymmek, Z. Tallóczy, B. Levine and S. P. Dinesh-Kumar (2005). *Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response*. *Cell*, 121, 567-577.
- Loake, G. and M. Grant (2007). *Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists*. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 466-472.
- Luna-Ruiz, J. J. and O. Moreno-Rico (2005). *Selección y evaluación de colectas regionales de Chile (Capsicum annum L.) para resistencia genética a la marchitez por Phytophthora capsici en el centro de México*. Segunda Convención Mundial del Chile, 20-25.
- Lund, S. T., R. E. Stall and H. J. Klee (1998). *Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato*. *Plant Cell*, 10, 371-382.
- Manners, J. G. (1993). "Mechanical resistance to entry and spread" in *Principles of plant pathology*, 2nd edition Cambridge, New York. pp. 102-116.
- Marois, E., G. Van den Ackerveken and U. Bonas (2002). *The Xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 15, 637-646.
- Matsubayashi, Y. and Y. Sakagami (2006). *Peptide hormones in plants*. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 649-674.
- Mauch-Mani, B. and F. Mauch (2005). *The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions*. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 409-414.
- Michielse, C. B. and M. Rep (2009). *Pathogen profile update: Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311-324.
- Mittler, R. (2002). *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance*. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Miyazaki, J. H. and S. F. Yang (1987). *The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis*. *Physiologia Plantarum*, 69, 366-370.
- Monaghan, J. and X. Li (2008). *R protein activation: another player revealed*. *Cell Host and Microbe*, 3, 9-10.
- Morris, P. C. (2001). *MAP kinase signal transduction pathways in plants*. *New Phytologist*, 151, 67-89.

- Morrison, D.K. and R.J. Davis (2003). *Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 19, 91-118.
- Münch, S., U. Lingner, D. S. Floss, N. Ludwig, N. Sauer and H. B. Deising (2008). *The hemibiotrophic lifestyle of Colletotrichum species*. Journal of Plant Physiology, 165, 41-51.
- Nakagami, H., A. Pitzschke and H. Hirt (2005). *Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling*. Trends in Plant Science, 10, 339-346.
- Nakashita, H., M. Yasuda, T. Nitta, T. Asami, S. Fujioka, Y. Arai, K. Sekimata, S. Takatsuto, I. Yamaguchi and S. Yoshida (2003). *Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice*. The Plant Journal, 33, 887-898.
- Nennstiel, D., D. Scheel and T. Nuernberger (1998). Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). FEBS Letters, 431, 405-410.
- Niederhauser, J. S. (1991). "Phytophthora infestans: the Mexican connection" in *Phytophthora*, Lucas, J. A., R. C. Shattock, D. S. Shaw, L. R. Cooke (ed). Cambridge University Press, United Kingdom. pp. 25-45.
- Nuernberger, T., D. Nennstiel, T. Jabs, W. R. Sacks, K. Hahlbrock and D. Scheel (1994). *High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses*. Cell, 78(3), 449-460.
- Nuernberger, T., F. Brunner, B. Kemmerling, L. Piater (2004). *Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences*. Immunological Reviews, 198, 249-266.
- Ochoa-Alejo, N. and R. Ramirez-Malagon (2001). *In vitro chili pepper biotechnology*. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 37, 701-729.
- Oh, S. K., S. Y. Yi, S. H. Yu, J. S. Moon, J. M. Park and D. Choi (2006). *CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens*. Molecules and Cells, 22(1), 58-64.
- Park, S. W., E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher and D. F. Klessig (2008). *Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance*. Science, 318, 113-116.
- Perfect, S. E. and J. R. Green (2001). *Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens*. Molecular Plant Pathology, 2, 101-108.

- Perry, L., R. Dickau, S. Zarrillo, I. Holst, D. M. Pearsall, D. R. Piperno, M. J. Berman, R. G. Cooke, K. Rademaker, A. J. Ranere, J. S. Raymond, D. H. Sandweiss, F. Scaramelli, K. Tarble, J. A. Zeidler (2007). *Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (Capsicum spp. L.) in the Americas*. *Science*, 315, 986-988.
- Petersen, M., P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H. B. Nielsen, M. Lacy, M. J. Austin, J. E. Parker, S. B. Sharma, D. F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A. B. Jensen and J. Mundy (2000). *Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*. *Cell*, 103, 1111-1120.
- Pieterse, C. M. J. and L. C. Van Loon (2004). *NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways*. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 456-464.
- Pieterse, C. M. J., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent and S. C. M. Van Wees (2009). *Networking by small-molecule hormones in plant immunity*. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308-316.
- Pitzschke, A., A. Schikora and H. Hirt (2009). *MAPK cascade signalling networks in plant defence*. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 1-6.
- Qiu, J. L., B. K. Füll, K. Petersen, H. B. Nielsen, C. J. Botanga, S. Thorgrimsen, K. Palma, M. C. Suarez-Rodriguez, S. Sandbech-Clausen, J. Lichota, P. Brodersen, K. D. Grasser, O. Mattsson, J. Glazebrook, J. Mundy and M. Petersen (2008). *Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus*. *The EMBO Journal*, 27, 2214-2221.
- Qutob, D., S. Kamoun and M. Gijzen (2002). *Expression of a Phytophthora sojae necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy*. *The Plant Journal*, 32, 361-373.
- Ren, D., Y. Liu, K. Y. Yang, L. Han, G. Mao, J. Glazebrook and S. Zhang (2008). *A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 105, 5638-5643.
- Ristaino, J. B., R. P. Larkin and C. L. Campbell (1993). *Spatial and temporal dynamics of Phytophthora epidemics in commercial bell pepper fields*. *Phytopathology*, 83, 1312-20.
- Ristaino, J. B. and S. A. Johnston (1999). *Ecologically based approaches to management of Phytophthora Blight on Bell Pepper*. *Plant Disease*, 83(12), 1080-1089.
- Rizzo, D. M., M. Garbelotto and E. M. Hansen (2005) *Phytophthora ramorum: integrative research and management of an emerging pathogen in*

- California and Oregon forests*. Annual Review of Phytopathology, 43, 309-335.
- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari and J. D. G Jones (2007) *Pathological hormone imbalances*. Current Opinion in Plant Biology, 10, 372-379.
- Samuels, L., L. Kunst and R. Jetter (2008). *Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells*. Annual Review of Plant Biology, 59, 683-707.
- Sánchez, A. M., M. G. Sánchez, S. Malagarie-Cazenave, N. Olea and I. Díaz-Laviada (2006). *Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin*. Apoptosis, 11, 89-99.
- Shen Q. H. and P. Schulze-Lefert (2007). *Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors*. The EMBO Journal, 26(20), 4293-4301.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2009). "Chile habanero de la Península de Yucatán". Retrieved July 7th, 2011 from http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=306:chile-habanero-de-la-peninsula-de-yucatan&catid=72:infogramas&Itemid=422
- Soetarno, S., Sukrasno, E. Yulinah and Sylvia (1997). *Antimicrobial activities of the ethanol extracts of Capsicum fruits with different levels of pungency*. JMS, 2(2), 57-63.
- Spoel, S. H., J. S. Johnson and X. Dong (2007). *Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 104(47), 18842-18847.
- Strange, R. (2003). "The plant fights back-active defence mechanisms" in *Introduction to plant pathology*. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex, England. pp. 293-331.
- Tada, Y., S. H. Spoel, K. Pajerowska-Mukhtar, Z. Mou, J. Song, C. Wang, J. Zuo and X. Dong (2008). *Plant immunity requires conformational charges of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins*. Science, 321, 952-956.
- Tian, M., B. Benedetti and S. Kamoun (2005). *A second kazal-like protease inhibitor from Phytophthora infestans inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69-B of tomato*. Plant Physiology, 138, 1785-1793.
- Tiryaki, İ. and H. Tunaz (2004). *Systemic acquired resistance: characterization of genes associated with plant defence response*. Journal of Cell and Molecular Biology, 3, 9-14.

- Trujillo-Aguirre J.J.G. (2002). *Genetic diversity of the Habanero chile (Capsicum chinense jaq.) in Yucatan Rescue of genetic diversity*. Proceedings of the 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, Mexico. November 10–12.
- Tyler, B. M. (2002). *Molecular basis of recognition between Phytophthora pathogens and their hosts*. Annual Review of Phytopathology, 40, 137-67.
- Tyler, B. M. et al. (2006) *Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis*. Science, 313, 1261-1266.
- Vakalounakis, D. J. (1996). *Root and stem rot of cucumber caused by Fusarium oxysporum f. sp. radicis-cucumerinum f. sp. nov.* Plant Disease, 80(3), 313-316.
- Van der Biezen E. A. and J. D. G. Jones (1998) *Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept*. Trends in Biochemical Sciences, 23, 454-456.
- Van Loon, L. C. and E. A. Van Strien (1999). *The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 55(2), 85-97.
- Van Loon, L. C., M. Rep and C. M. J. Pieterse (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology, 44, 135-162.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker and C. M. J. Pieterse (1998). *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*. Annual Review of Phytopathology, 36, 453-483.
- Vázquez-López, A., B. Tlapal-Bolaños, M. J. Yañez-Morales and M. Quintos-Escalante (2004). *Etiología de la marchitez del chile de agua (Capsicum annum L.) en tres localidades de los Valles Centrales de Oaxaca, México*. Misceláneos, Primera Convención Mundial del Chile 2004, 337-339.
- Velásquez, V. R., A. M. M. Medina and V. F. Lara (2005). *Exploración nematológica de chile (Capsicum annum L.) en Aguascalientes y Zacatecas*. Segunda Convención Mundial del Chile 2005, 34-38.
- Verhagen, B. W. M., J. Glazebrook, T. Zhu, H. S. Chang, L. C. Van Loon, C. M. J. Pieterse (2004). *The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17, 895-908.
- Víteček, J., A. Wünschová, J. Petřek, V. Adam, R. Kizek and L. Havel (2007). *Cell death induced by sodium nitroprusside and hydrogen peroxide in tobacco BY-2 cell suspension*. Biologia Plantarum, 51(3), 472-479.

- Wang, K. L. C., H. Li and J. R. Ecker (2002). *Ethylene biosynthesis and signaling networks*. Plant Cell, Supplement 2002, S131-S151.
- Webster, J. and C. Dennis (1967). *The mechanism of sporangial discharge in Pythium middletonii*. New Phytology, 66, 307-313.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson (1999). *Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human*. Physiological Reviews, 79(1), 143-180.
- Wiermer, M., B. J. Feys and J. E. Parker (2005). *Plant immunity: the EDS1 regulatory node*. Current Opinion in Plant Biology, 8, 383-389.
- Xu, J., Y. Li, H. Liu, L. Lei, H. Yang, G. Liu and D. Ren (2008). *Activation of MAP KINASE KINASE 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis, and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry, 283, 26996-27006.
- Yao, N., B. J. Eisfelder, J. Marvin and J. T. Greenberg (2004). *The mitochondrion-an organelle commonly involved in programmed cell death in Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 40, 596-610.
- Yang, S. F. and N. E. Hoffman (1984). *Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants*. Annual Review of Plant Physiology, 35, 155-189.
- Yoo, S. D., Y. H. Cho, G. Tena, Y. Xiong and J. Sheen (2008). *Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signaling*. Nature, 451, 789-795.
- Zhou, J. M. and J. Chai (2008). *Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses*. Current Opinion in Microbiology, 11, 179-185.
- Zhou, J. M., Y. Trifa, H. Silva, D. Pontier, E. Lam, J. Shah and D. F. Klessig (2000). *NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid*. Molecular Plant Microbe Interactions, 13(2), 191-202.
- Zipfel, C. and G. Felix (2005) *Plants and animals: different taste for microbes?* Current Opinion in Plant Biology, 8, 353-360.
- Zipfel, C., D. Chinchilla, A. Caniard, J.D.G. Jones, T. Boller and G. Felix (2006) *Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation*. Cell, 125, 749-760.
- Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. G. Jones, G. Felix and T. Boller (2004). *Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception*. Nature, 428, 764-767.

1.5 JUSTIFICACIÓN

El oomiceto *Phytophthora capsici* causa pérdidas devastadoras en los cultivos de chile de todo el mundo. Actualmente existen reportadas dos especies del género *Capsicum* resistentes a este patógeno.

Con el fin de estudiar los mecanismos de respuesta de la defensa sistémica, se han utilizado diversos compuestos inductores en un gran número de especies, incluyendo al chile. Sin embargo, a la fecha, el mecanismo exacto de resistencia continúa sin ser conocido.

Puesto que el ET es una molécula señalizadora que participa en el establecimiento de la resistencia sistémica inducida, para la realización de este trabajo se consideró la importancia de evaluar su función durante la interacción del chile habanero con *P. capsici* y su posible capacidad para encender una respuesta de defensa en la planta antes de ser inoculada con el oomiceto, utilizando como modelo comparativo, la interacción del chile habanero con el hongo *Fusarium oxysporum*.

La evaluación del efecto que tiene el ET en la expresión de un grupo de genes del chile permitirá asociar genes regulados por esta molécula con la respuesta de defensa del chile habanero contra ambos microorganismos patógenos, lo que podrá ayudar a comprender mejor las bases de la susceptibilidad de la mayoría de los miembros del género *Capsicum* al marchitamiento foliar causado por *P. capsici*.

1.6 HIPÓTESIS

Si el etileno participa en el establecimiento de la defensa sistémica durante la interacción planta-patógeno en *Capsicum chinense*, la modificación exógena de los niveles de esta fitohormona previa a la inoculación con patógenos compatibles e incompatibles modificará diferencialmente la respuesta de defensa, a nivel de la expresión de genes relacionados con ésta.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del etileno en la respuesta fenotípica de plántulas de *C. chinense* inoculadas con *P. capsici*, y su posible participación en la regulación de la expresión de genes de defensa del hospedante.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.8.1 Manipular los niveles de etileno y su percepción en plántulas de chile habanero.
 - 1.8.1.1 Incrementar los niveles de etileno mediante el uso de etefón.
 - 1.8.1.2 Inhibir la percepción de etileno mediante el uso de nitrato de plata.
- 1.8.2 Caracterizar el papel del etileno en la interacción del chile habanero con *F. oxysporum*.
 - 1.8.2.1 Evaluar la sintomatología de las plántulas inoculadas.
 - 1.8.2.2 Cuantificar los niveles endógenos de etileno durante la interacción planta-patógeno.
 - 1.8.2.3 Analizar el efecto del etileno sobre la expresión de un grupo de genes que participan en la defensa en las plántulas inoculadas.
- 1.8.3 Caracterizar el papel del etileno en la interacción del chile habanero con *P. capsici*.
 - 1.8.3.1 Evaluar la sintomatología de las plántulas inoculadas.
 - 1.8.3.2 Cuantificar los niveles endógenos de etileno durante la interacción planta-patógeno.

- 1.8.3.3 Analizar el efecto del etileno sobre la expresión de un grupo de genes de defensa en las plántulas inoculadas.
- 1.8.3.4 Analizar el efecto del etileno sobre la expresión de genes marcadores de las vías de señalización mediadas por el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno.

Capítulo 2

Evaluación del efecto del etileno en la interacción *Capsicum chinense*- *Fusarium oxysporum*

2.1 INTRODUCCIÓN

Fusarium oxysporum es la especie más común del género *Fusarium*, el cual alberga un gran número de fitopatógenos de suelo con distribución mundial. *F. oxysporum* es el agente causal de la pudrición de la raíz y de otras enfermedades que ocasionan marchitez en varias especies vegetales, incluyendo al jitomate (*Solanum lycopersicum*), el plátano (*Musa sapientum*), el espárrago (*Asparagus officinalis*) y el chile (*Capsicum* spp) (Jarvis, 1988; Ploetz, 2006; Cohen & Heald, 1941; Mushtaq & Hashmi, 1997). Esta especie se ha dividido en más de 120 formas especiales, de acuerdo a su rango de hospedantes (Armstrong & Armstrong, 1981).

La colonización de las plantas por *F. oxysporum* ocasiona necrosis en los tejidos infectados, un colapso de los vasos vasculares y el decaimiento general de la planta (Berrocal-Lobo & Molina, 2007).

Se ha reportado que *F. oxysporum* puede ocasionar marchitez temporal o permanente en las plantas de chile (*C. annuum*) cultivadas en invernadero, desempeñando un papel oportunista al penetrar al tejido del tallo a través de las heridas en la epidermis (Jovicich *et al.*, 2003).

Las rutas de señalización mediadas por el ET y el JA pueden ser relevantes para la resistencia de las plantas contra hongos de suelo y oomicetos que infectan a las plantas a través de la raíz provocando la necrosis del tallo (Berrocal-Lobo & Molina, 2004).

Es importante evaluar la interacción del chile habanero con *F. oxysporum* e identificar los efectos que tiene el ET en esta interacción, así como determinar

la capacidad infectiva que tiene el hongo en las plántulas de chile habanero. Los resultados constituirán una base comparativa para determinar si esta interacción tiene características comunes con la observada en el patosistema chile habanero-*P. capsici*.

En este capítulo, se presentan los síntomas de la infección, así como la producción de ET que mostraron las plántulas de chile habanero al ser inoculadas con *F. oxysporum*, y el papel que desempeña el ET en la expresión de 21 genes relacionados con la defensa durante la interacción planta-patógeno.

Los genes analizados forman parte de una biblioteca de ADNc obtenida a partir de ARN extraído de hojas de chile habanero infectadas con geminivirus y células en suspensión tratadas con homogenizados de pared celular de *P. capsici* (Nakazawa-Ueji, 2010).

Los ADNc representan genes que codifican proteínas con diversas funciones celulares. La mayoría de ellos están relacionados con la defensa, mientras que otros intervienen en la comunicación celular, la localización subcelular y respuestas al ambiente. En el cuadro 2.1 se muestra la identidad de los ADNc analizados, así como su categoría funcional según Ruepp *et al.* (2004).

Cuadro 2.1. Identidad de los ADNc analizados en un arreglo tipo dot blot.

No	Clave EMBL	Nombre de la proteína	Categoría
1	AJ879069	Omega-6 desaturasa	01, 32
2	AJ879071	Omega-6 desaturasa 2	01, 32
3	AJ879117	ACC oxidasa	01, 36
4	AJ879118	Ubiquitina	14
5	AM040274	Proteína dedo de zinc putativa	16
6	AJ879936	Posible receptor	30
7	AJ608158	MAPK1	30, 36
8	AJ698159	MAPK2	30, 36
9	AJ698160	MAPK3	30, 36
10	AJ879119	Esterasa	32
11	AJ879063	Metalotioneína	32
12	AJ879066	Peroxidasa aniónica	32
13	AJ879121	GST1	32
14	AJ973135	Glutati6n peroxidasa	32
15	AM040271	GST12	32
16	---	PR10 (3)	32
17	---	PR10 (4)	32
18	AJ879062	Proteína de pared celular (1)	32, 70
19	---	WRKY	
20	---	NPR1	
21	AM168448	Actina	70

Categoría funcional según Ruepp *et al.*, 2004: (01) metabolismo, (14) destino protéico, (16) proteína con función de unión, (30) comunicación celular, (32) defensa y virulencia, (36) interacción con el ambiente y (70) localización subcelular.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE *Fusarium oxysporum*

La cepa de *F. oxysporum* fue donada por el Dr. Ignacio Islas Flores (Centro de Investigación Científica de Yucatán), quien la identificó morfológicamente. La cepa se cultivó y se mantuvo en agar papa dextrosa (APD) a temperatura ambiente (TA) y a 4 °C, respectivamente. La cepa se resembró cada mes y se mantuvo por un periodo más prolongado en glicerol al 40% a -80 °C.

2.2.2 CULTIVO *in vitro* de *Capsicum chinense*

Se utilizaron semillas de chile habanero variedad Seminis®, las cuales se almacenaron en oscuridad a 4 °C. Las semillas se desinfestaron de acuerdo a la metodología mostrada en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Proceso de desinfestación de las semillas de chile habanero.

Paso	Procedimiento	Tiempo
1	Lavado de las semillas con etanol al 80%	5 min
2	Enjuague con agua destilada estéril (3 veces)	1 min c/u
3	Lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 1.6%*	15 min
4	Enjuague con agua destilada estéril (3 veces)	1 min c/u

* Se utilizó Clorox® que contiene 5.25% de hipoclorito de sodio.

Las semillas de chile habanero desinfestadas se colocaron en una caja de petri con algodón y agua (15 mL), en condiciones asépticas durante 6 días en

oscuridad hasta su germinación. Posteriormente, cada semilla se colocó en una caja Magenta que contenía 35 mL de medio Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con tiamina ($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), mio-inositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), cisteína ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y gelrite® ($2.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), a pH 5.6. Las tapas de las cajas Magenta estaban perforadas y el agujero estaba cerrado con una esponja para permitir el intercambio gaseoso de manera aséptica. Las cajas se colocaron en un cuarto de cultivo en fotoperiodo (18 h luz/6 h oscuridad) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las plántulas de chile habanero se cultivaron hasta que desarrollaran cuatro hojas verdaderas (30-35 días de edad), y entonces se utilizaron para realizar los siguientes análisis.

2.2.3 TRATAMIENTO DE *C. chinense* CON ETEFÓN

Las plántulas de chile habanero de 30-35 días de edad fueron asperjadas con 1 mL de etefón 5 mM ó con 1 mL de agua (plántulas testigo) y las cajas Magenta se taparon herméticamente. Un día después, las plántulas se inocularon con el hongo como se describe posteriormente y las cajas Magenta fueron tapadas con aquellas tapas que incluían una esponja. Después de la inoculación, las plántulas se colocaron en un cuarto de cultivo en fotoperiodo (18 h luz/6 h oscuridad) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y durante 10 días se analizó el desarrollo de la sintomatología.

2.2.4 INOCULACIÓN DE *C. chinense* CON *F. oxysporum*

Se inocularon la tercera y la cuarta hojas verdaderas de cada plántula, cada una con un disco de micelio de *F. oxysporum* cultivado durante 6 días en medio APD. El área de los discos fue de 0.2 cm^2 . A las plántulas testigo se les colocaron dos discos de APD del mismo tamaño.

2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE ETILENO EN PLÁNTULAS INOCULADAS CON *F. oxysporum*

Cinco plántulas inoculadas con *F. oxysporum* y 5 plántulas testigo se mantuvieron en recipientes herméticos durante 40 días, y se cuantificó el ET por cromatografía de gases cada 24 h a partir del día de la inoculación (la determinación se detalla en el Capítulo 3). La cuantificación de ET se realizó utilizando una curva estándar (Datos complementarios).

2.2.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETEFÓN EN EL CRECIMIENTO *in vitro* DE *F. oxysporum*

Para determinar el efecto directo que tiene el etefón sobre el crecimiento del hongo, éste se cultivó en APD que contenía 5 mM de etefón. Después de 24 h de haberse preparado las placas de APD con el etefón, se colocó en cada una un inóculo cuadrado de micelio de *F. oxysporum* y se monitoreó su crecimiento durante 6 días a TA.

2.2.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL MEDIANTE HIBRIDACIÓN DE ARREGLOS TIPO DOT BLOT

Se realizó el análisis en las plántulas de chile habanero que fueron asperjadas con etefón 5 mM, ó con agua y que además fueron inoculadas con *F. oxysporum*.

Después de la inoculación, se cortaron las hojas que no fueron inoculadas directamente en diferentes tiempos: 0, 0.5, 2 y 4 h. Una vez tomado el tejido, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta ser utilizado.

La localización de los 21 ADNc en el arreglo se muestra en el cuadro 2.4. Para realizar el análisis de la expresión diferencial, se obtuvo una mezcla de los ARN totales de los tiempos 0-4 h post inoculación.

2.2.7.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Se pulverizó 0.1 g de tejido de hoja con un mortero y pistilo utilizando nitrógeno líquido, posteriormente se añadieron 2 mL de TRizol, se homogenizó y se dejó incubar a TA 2 min. La mezcla anterior se transfirió a dos tubos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó 15 min a 14, 000 xg a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y se le adicionaron 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1), se agitó de manera manual y vigorosa. Se dejó incubar durante 2 min a TA. Se centrifugaron las muestras a 12, 000 xg por 15 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, se le adicionaron 0.5 mL de isopropanol. Se incubaron las muestras de 2-4 h a 4 °C. Se centrifugaron a 14, 000 xg durante 15 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%, centrifugando después de cada lavado a 14, 000 xg durante 15 min a 4 °C. Se realizó un último lavado con 1 mL de etanol absoluto y se dejó secar la pastilla a TA. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 20-30 µL de agua tratada con DEPC.

La integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en agarosa al 1.5 % y se cuantificó su concentración por espectrofotometría a 260 nm.

2.2.7.2 SÍNTESIS DE ADNc

A partir de 2 µg de ARN total se sintetizó la primera cadena de ADNc utilizando una transcriptasa reversa (Super Script III Reverse Transcriptase, Invitrogen®) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La sonda utilizada para la hibridación fue marcada con digoxigenina (DIG-11-dUTP, Roche®).

2.2.7.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A LOS 21 GENES ANALIZADOS

Los ADNc correspondientes a los 21 genes en estudio fueron amplificados por PCR, utilizando dos programas de amplificación, ya que los ADNc se

encuentran clonados en dos plásmidos distintos. Se utilizó, en ambos casos, la Taq Polimerasa (Invitrogen®).

La concentración de los componentes de la reacción fue: dNTP's 0.2 mM, Mg²⁺ 1.5 mM, Taq Pol 2.5 U, cebador directo y reverso 1 nM, y 0.5 µg de ADN plasmídico.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 94 °C por 3 min; 94 °C por 30 seg, 55 ó 68 °C por 2 min, 72 °C por 2 min (30 ciclos); y 72 °C por 10 min.

2.2.7.4 FIJACIÓN DE LOS ADNc

Los ADNc amplificados por PCR se desnaturalizaron añadiéndoles NaOH y EDTA a una concentración final de 0.4 M y 10 mM, respectivamente. La mezcla se calentó a 100 °C durante 10 min. Las muestras permanecieron en hielo mientras se colocaba cada una en el "vacuum manifold" de Millipore® para ser fijada a una membrana de nylon Zeta-Probe® utilizando vacío para acelerar el proceso de fijación. Después se realizó el proceso de hibridación utilizando como sondas el ADNc marcado con digoxigenina obtenido a partir de las muestras de las poblaciones de ARN de las plántulas de chile habanero asperjadas ya sea con etefón o agua y luego, inoculadas con *F. oxysporum*.

La hibridación se realizó con el método de Church y Gilbert (1984), y las reacciones positivas fueron reveladas exponiendo las membranas a una película sensible a la luz.

2.2.7.5 HIBRIDACIÓN (CHURCH & GILBERT, 1984)

Se colocó la membrana de nylon a prehibridar en una solución de fosfatos 0.5 M pH 7.2, SDS 7% (m/v), EDTA 1 mM pH 7, durante 8-12 h a 65 °C con agitación suave. Se transfirió la membrana a la solución de hibridación [Solución de fosfatos 0.5 M pH 7.2, SDS 7% (m/v), EDTA 1 mM pH 7, albúmina

sérica de bovino 1%, sonda desnaturalizada (se calentó a 100 °C durante 5 min y posteriormente, se colocó en hielo 5 min)] durante 12-24 h a 65 °C con agitación suave. La membrana se lavó con SSC 2X (NaCl 0.3 M, citrato de sodio 30 mM) a TA durante 15 min. Después se realizaron 4 lavados consecutivos a 65 °C y durante 15 min cada uno con las siguientes soluciones: SSC 2X, SSC 0.5X, SSC 0.2X y SSC 0.1X. Se equilibró la membrana con solución de lavado [Ácido maléico 0.12 M y NaCl 0.15 M, pH 7.5 con KOH, y Tween-20, 0.3 % (v/v)] durante 1 min a TA.

Se bloqueó la membrana 1 h a TA con solución de lavado + 5% (m/v) de leche Svelty®. Luego, se colocó la membrana en solución de bloqueo fresca (solución de lavado + leche Svelty® 5%) y con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina (1.3 µL de anticuerpo por cada 20 mL de solución). Se lavó la membrana tres veces con solución de lavado por 15 min a TA. Se equilibró la membrana con solución de detección (Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5 y NaCl 0.1 M) por 2 min a TA.

El procedimiento se continuó en el cuarto oscuro. Se eliminó el exceso de solución de detección y la membrana se colocó en un porta-acetatos, ésta se incubó con 1 mL de sustrato (CSPD, chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase, Roche®) durante 5 min en oscuridad a TA. Se eliminó el exceso de sustrato y se expuso la membrana con una película en oscuridad a TA durante 15-60 min. Finalmente, la película se reveló y se fijó.

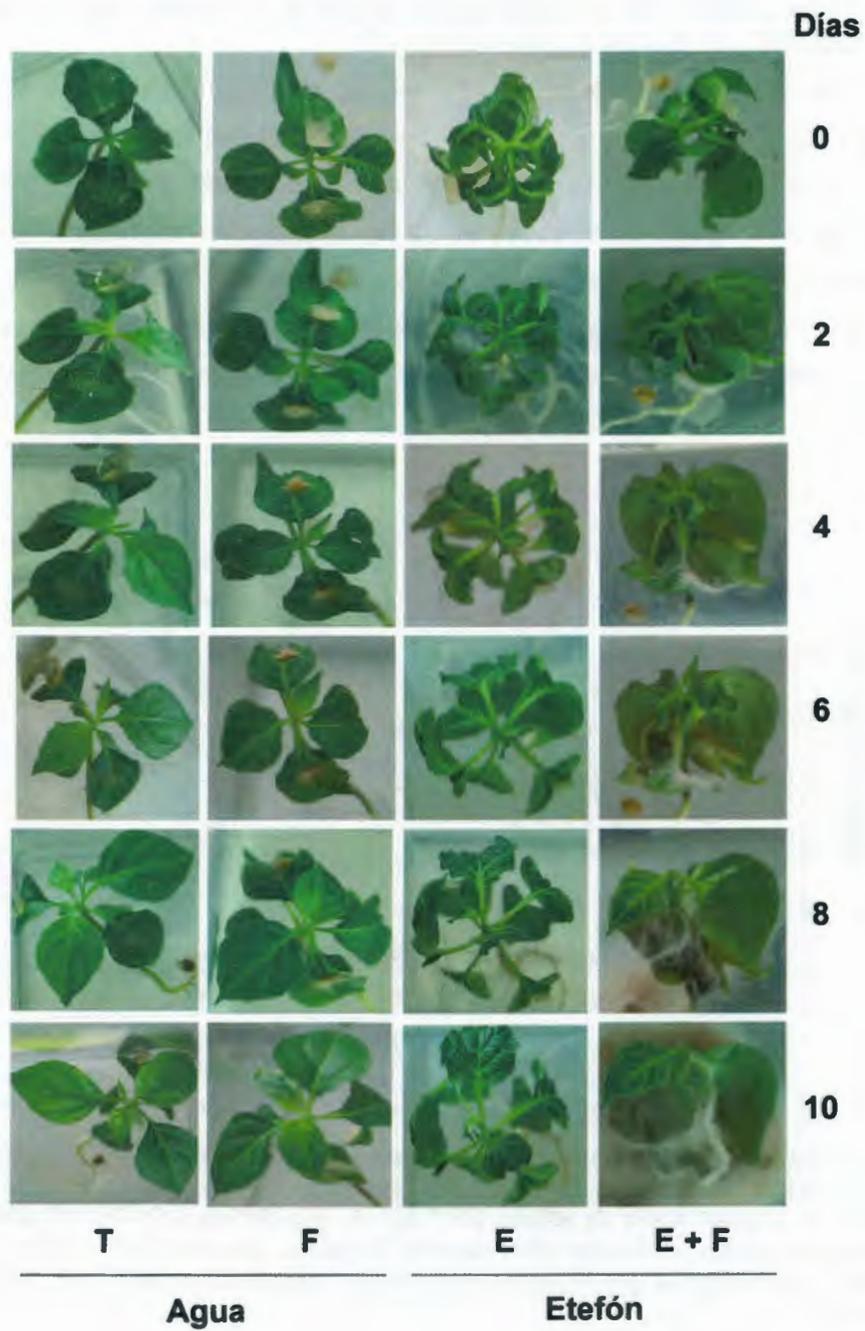
2.3 RESULTADOS

2.3.1 EFECTO DEL ETILENO EN EL PROCESO DE INFECCIÓN DE PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO INOCULADAS CON *F. oxysporum*

Las plántulas de *C. chinense* inoculadas con *F. oxysporum* presentaron una pequeña zona necrótica en las hojas que fueron inoculadas a partir del día 5 después de la inoculación (d.i.). Esta necrosis localizada no se extendió al resto de la planta, y la inoculación con el hongo no dañó considerablemente a la plántula, la cual continuó creciendo de manera normal, sin que el hongo colonizara de manera importante el tejido vegetal (Fig. 2.1) aún en el día 14 d.i. (datos no mostrados). Estos síntomas demostraron que las plántulas de *C. chinense* de 30-35 días de edad presentaban un nivel de tolerancia muy alto contra *F. oxysporum*.

Sin embargo, cuando las plántulas fueron previamente tratadas con etefón, la inoculación con el hongo condujo al desarrollo de síntomas de la enfermedad (necrosis y marchitamiento), entre los 6 y 8 días d.i. Estos resultados sugieren entonces que en el patosistema incompatible *C. chinense*-*F.oxysporum*, el ET afecta la resistencia natural, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.

Figura 2.1. Efecto del etileno en la susceptibilidad a *Fusarium oxysporum* del chile habanero. Se asperjaron plántulas de un mes de edad con agua (T y F) o etefón 5 mM (E y E+F) y a las 24 h fueron inoculadas con dos discos de micelio de *F. oxysporum* (F y E+F) o de agar papa dextrosa (T y E), en la tercera y cuarta hojas verdaderas. La sintomatología fue monitoreada en diferentes períodos (0, 2, 4, 6, 8 y 10 d.p.i.).



2.3.2 PRODUCCIÓN DE ETILENO EN PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO INOCULADAS CON *F. oxysporum*

Se presentó una acumulación de ET en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* a partir del día 7 d.i., pudiéndose observar dos fases, teniendo un primer nivel máximo en el día 12 d.i. ($6.39 \text{ nL}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco) y posteriormente, en el día 24 d.i. ($8.25 \text{ nL}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco). En comparación, los niveles de ET permanecieron en un nivel basal en las plántulas testigo ($0.44 \pm 0.14 \text{ nL}\cdot\text{g}^{-1}$ peso fresco) (Fig. 2.2). En el último día de análisis, 40 días d.i., las plántulas ya habían sido invadidas completamente por el hongo y el tejido estaba necrosado.

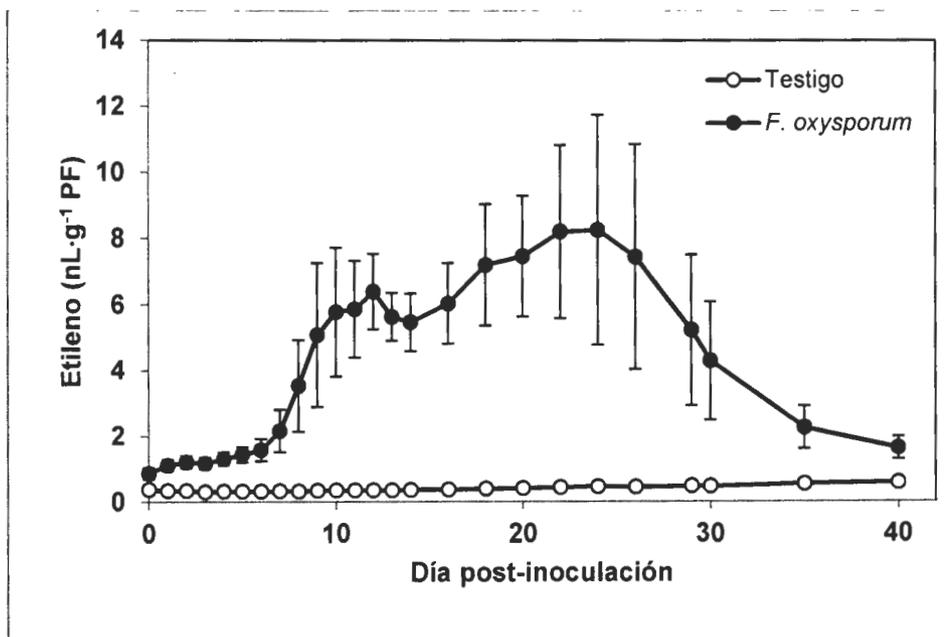


Figura 2.2. Producción de etileno en plántulas de chile habanero inoculadas con *Fusarium oxysporum*. Se inocularon plántulas de un mes de edad y se analizó la concentración de etileno en 1 mL de gas del espacio de cabeza de las cajas Magenta, mediante cromatografía de gases. Se analizaron 5 plántulas testigo y 5 inoculadas con el hongo. Las barras verticales representan el error estándar.

2.3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ETEFÓN EN EL CRECIMIENTO *in vitro* DE *F. oxysporum*

Debido a que la aspersión con etefón revirtió la resistencia que presenta de manera natural el chile habanero contra *F. oxysporum* (ver Fig. 2.1 E+F), se aplicó etefón directamente sobre un cultivo *in vitro* del hongo para descartar un efecto químico secundario. Los resultados mostraron que la aplicación directa de este compuesto retarda el crecimiento del hongo, pero no lo inhibe completamente como se observa en la Fig. 2.3.

El etefón se descompone en ET, ión cloruro (Cl⁻) e ión fosfato de hidrógeno dibásico (HPO₄²⁻). Es posible que alguno de estos compuestos retarde el crecimiento del hongo a la concentración de etefón utilizada (5 mM). No obstante, el efecto que genera la aplicación directa de etefón sobre el crecimiento del hongo *in vitro* no corresponde con sus efectos *in planta*. Lo anterior sugiere que la aspersión con etefón, cuya hidrólisis libera ET, provoca un efecto adverso sobre los sistemas de defensa de la plántula de chile habanero.

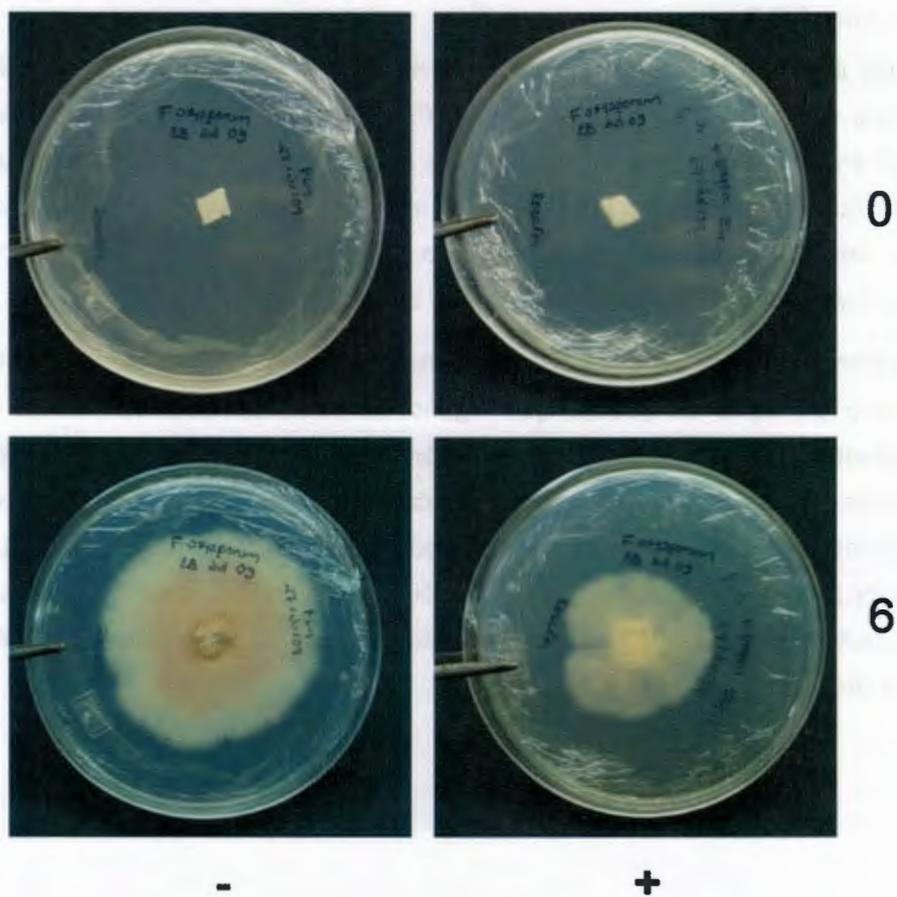


Figura 2.3. Efecto directo del etefón en el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum*. El hongo se cultivó a TA en agar papa dextrosa en presencia (+) o ausencia (-) de etefón 5 mM. El crecimiento del hongo se evaluó a diferentes tiempos después de la siembra (0 y 6 días).

2.3.4 EFECTO DEL ETILENO EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE CHILE HABANERO DURANTE LA INOCULACIÓN CON *F. oxysporum*.

El análisis de expresión se realizó en plantas asperjadas con agua o con etefón 5 mM, y a las cuales únicamente se les colocó ya fueran dos discos de APD o de micelio de *F. oxysporum*.

Como se observó en los resultados anteriores, en las condiciones experimentales empleadas las plántulas de chile habanero no fueron infectadas por el hongo, sino hasta el día 14 d.i.; sin embargo, en las plántulas asperjadas previamente con etefón, el hongo logró colonizarlas a partir del día 4 d.i. (Fig. 2.1).

Debido a que el ET revierte el estado de defensa, se analizaron las modificaciones en los niveles de expresión de 21 genes de chile habanero, durante el proceso infectivo en presencia y ausencia de ET, para determinar el efecto que tiene éste sobre su expresión y su posible relación con la susceptibilidad adquirida en la planta.

La ubicación de cada gen analizado en el arreglo se muestra en el cuadro 2.3. La comparación de los niveles de expresión bajo los diferentes tratamientos se describe esquemáticamente en el cuadro 2.4, y en la Figura 2.4, se muestra el resultado de las hibridaciones.

Cuadro 2.3 Identidad de los genes de chile habanero en el mini-arreglo.

	1	2	3
A	ACC oxidasa	PR10 (3)	Prot. Dedo Zinc
B	Enz. Conjug. Ubiquitina	GST12	PR10 (4)
C	Glutación peroxidasa	Prot. Pared celular	Esterasa
D	Metalotioneína	GST1	Peroxidasa aniónica
E	ω -6 desaturasa	ω -6 desaturasa 2	Receptor
F	MPK1	MPK2	MPK3
G	NPR1	WRKY	Actina

En las plántulas inoculadas con *F. oxysporum*, se incrementó el nivel de expresión de la mayoría de los genes analizados, con respecto a los niveles observados en las plántulas testigo. Este resultado podría sugerir que la plántula detecta la presencia del hongo. Debido a la naturaleza diversa de las proteínas codificadas por estos genes, podría suponerse que se disparan diversos mecanismos de defensa que las involucran, lo cual podría conducir al establecimiento del alto nivel de tolerancia que las plántulas de chile habanero presentaron al ataque por *F. oxysporum*.

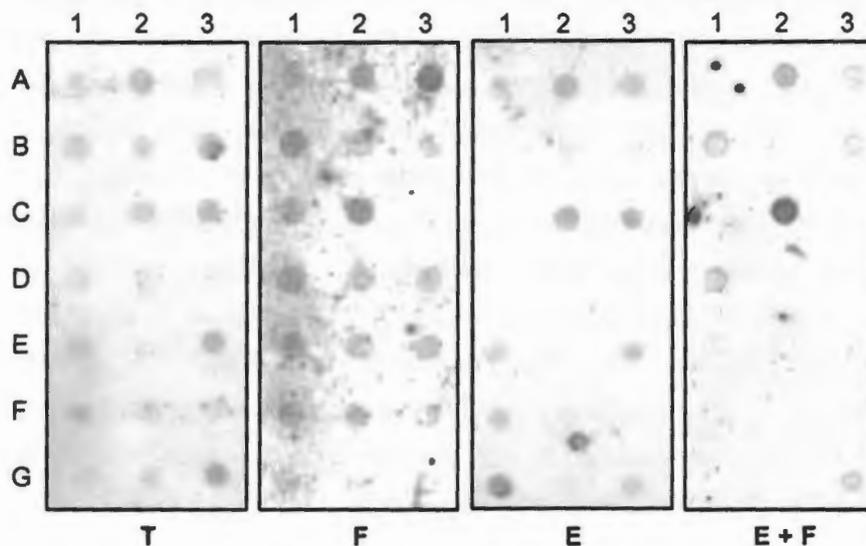


Figura 2.4. Análisis de los efectos del etileno y la infección con *Fusarium oxysporum* sobre la expresión génica en plántulas de chile habanero. Seis μg de cada una de las 21 clonas de ADNc mostradas en el cuadro 2.3 fueron transferidos en una membrana de nylon e hibridados independientemente con sondas de ADNc marcadas con digoxigenina, producidas a partir de RNA extraído de las hojas de plántulas que fueron sometidas a cuatro diferentes tratamientos: aspersión con agua (T), aspersión con etefón 5 mM (E), inoculación con *F. oxysporum* (F) o inoculación con *F. oxysporum* después de asperjar con etefón (E + F).

El tratamiento con etefón no indujo muchos cambios en la expresión génica en chile habanero, en comparación con las plántulas testigo (Cuadro 2.4); sin embargo, los genes que sí mostraron inducción por este tratamiento fueron los que codifican una proteína de pared celular, una ω -6 desaturasa y NPR1. Interesantemente, sólo una de las dos ω -6 desaturasas analizadas fue inducida por el tratamiento con etefón, sugiriendo que estos genes presentan una regulación diferencial en su expresión.

Cuando se asperjaron las plántulas con etefón y después fueron inoculadas con el hongo, se pudo observar claramente que gran parte de los genes que fueron inducidos por la simple inoculación con el hongo (ver Figura 2.4), fueron reprimidos cuando la planta era previamente tratada con etefón (Cuadro 2.4). Esto podría sugerir que la ruta de señalización mediada por el tratamiento con etefón no es la misma que se dispara por la percepción del hongo, y que incluso estas dos rutas podrían estar actuando de manera antagónica. Bajo condiciones de aplicación de ET la planta se tornó susceptible al ataque por el hongo, sugiriendo que el ET induce el desarrollo de la enfermedad, inhibiendo posiblemente la ruta de defensa disparada por la detección del hongo, en la cual se sugiere la participación de las proteínas GST1/12, glutatión peroxidasa, peroxidasa aniónica, ω -6 desaturasa1/2, CcMPK1/2/3, NPR1 y WRKY1.

Cuadro 2.4. Cambios en la expresión de un grupo de genes de chile habanero tratado con etefón y/o inoculado con *Fusarium oxysporum*.

Gen	<i>F. oxysporum</i> ^a	Etefón ^b	Etefón + <i>F. oxysporum</i> ^c	
ACC oxidasa	↑	-	-	↓
PR10 (3)	↑	-	↑	-
Proteína Dedo Zinc	↑	-	-	-
Enz. Conjug. Ubiquitina	↑	-	↑	-
GST12	↑	-	↓	↓
PR10 (4)	-	↓	-	-
Glutación peroxidasa	↑	-	-	↓
Proteína de pared celular	↑	↑	↑	-
Esterasa	↓	-	↓	↓
Metalotioneína	↑	-	↑	-
GST1	↑	-	-	↓
Peroxidasa aniónica	↑	-	-	↓
ω-6 desaturasa 1	↑	↑	-	↓
ω-6 desaturasa 2	↑	↓	-	↓
Receptor	-	-	↓	↓
CcMPK1	↑	-	↓	↓
CcMPK2	↑	↓	↓	↓
CcMPK3	↑	↓	↓	↓
NPR1	↑	↑	-	↓
WRKY	↑	-	-	↓
Actina	-	-	-	-

Los símbolos significan: (↑) inducción en la expresión, (↓) represión en la expresión y (-) sin cambios en la expresión. Se compararon de manera independiente los tratamientos (a, b y c) con la planta testigo (únicamente asperjada con agua), los resultados se muestran en las columnas blancas. La columna gris representa la comparación entre los tratamientos c y b.

^a Las plántulas fueron inoculadas con *F. oxysporum*

^b Las plántulas fueron asperjadas con etefón

^c Las plántulas fueron asperjadas con etefón y 24 h después inoculadas con *F. oxysporum*

2.4 DISCUSIÓN

Se sabe que el ET es una molécula señalizadora que induce las respuestas de defensa principalmente contra microorganismos necrotróficos. El hongo *F. oxysporum* se considera un patógeno hemibiotrófico, y en su interacción con el chile habanero, los resultados obtenidos permiten sugerir que el ET desempeña un papel negativo en el establecimiento de la defensa. La interacción que se presenta en las vías de señalización mediadas por el ET, el SA y el JA puede resultar en la represión de alguna de ellas (Clarke *et al.*, 2000; Kunkel & Brooks, 2002; Spoel *et al.*, 2003), y el balance de estas fitohormonas es crucial para que se encienda una u otra vía, dando lugar a la activación o la represión de factores de transcripción, los cuales a su vez pueden actuar como reguladores negativos o positivos en la inducción de genes relacionados con la defensa (Mao *et al.*, 2007). Por ejemplo, los factores transcripcionales de respuesta a ET (ERFs) integran señales de las rutas mediadas por el ET y el JA, y representan un punto de control para la intercomunicación con otras señales, ya que múltiples vías de señalización convergen en los ERFs mediante regulaciones a nivel transcripcional y post-transcripcional (Shinshi, 2008). Es posible entonces, que al aumentar los niveles de ET en la planta de chile habanero se induzca la inhibición de la ruta de defensa mediada por alguna otra fitohormona, la cual es la efectiva para restringir el ataque de *F. oxysporum*.

En la interacción de *A. thaliana* con *F. oxysporum*, hay un factor transcripcional de respuesta a ET (Factor de respuesta a etileno 1) que media la resistencia contra este patógeno, pues tiene un papel determinante en el establecimiento de la defensa, dependiente del ET y del MeJA (Berrocal-Lobo & Molina, 2004). Sin embargo, es importante tener presente que *C. chinense* y *A. thaliana* son dos especies vegetales que pertenecen a distintas familias (Solanaceae y Brassicaceae, respectivamente) y que las rutas de defensa pueden ser distintas, aunque se trate del mismo patógeno.

Dentro de la familia Solanaceae, las plantas mutantes de jitomate dañadas en la percepción de ET mostraron una reducción significativa en los síntomas de la enfermedad en comparación con la planta silvestre, después de la inoculación con varios microorganismos patógenos, entre los cuales se encontraba *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lund *et al.*, 1998). Otros estudios con jitomate confirmaron estos resultados, mostrando que el ET actúa de manera negativa en la resistencia contra *F. oxysporum* (Francia *et al.*, 2007).

Al utilizar etefón como compuesto liberador de ET, fue necesario determinar el efecto directo que tiene sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. Se observó que este compuesto retardó el crecimiento del hongo; sin embargo, no lo inhibió completamente. A pesar de esto, la respuesta fue distinta en la planta tratada con etefón, ya que la aspersión con éste favoreció el desarrollo del hongo.

El análisis de la expresión de genes de defensa sugiere que la inoculación con *F. oxysporum* induce respuestas de defensa en las plántulas de chile habanero, y que esta respuesta se inhibe por el tratamiento previo con etefón.

Los genes que fueron reprimidos por el tratamiento con etefón en las plántulas inoculadas con *F. oxysporum* codifican las siguientes proteínas:

Las glutatión-S-transferasas 1 y 12 (GST1/12). Estas enzimas ubicuas desempeñan un rango diverso de funciones en la célula, y catalizan la adición de glutatión reducido a sustratos electrofílicos para etiquetarlos y luego ser secuestrados en la vacuola. También reducen los hidroperóxidos orgánicos formados durante el estrés oxidativo (Dixon *et al.*, 2002; Csiszár *et al.*, 2002). Estas enzimas tienen actividades citoprotectoras, lo que les permite la preservación de las plantas durante estrés ambiental y en enfermedades (Marrs, 1996; Csiszár *et al.*, 2002). Entre los papeles que se han descrito para las GSTs en relación con la patogénesis en las plantas, se encuentran la reducción del ADN dañado y los hidroperóxidos lipídicos, y su capacidad antioxidante, además participan en la inducción de la chalcona sintasa, enzima

clave involucrada en la biosíntesis de fitoalexinas isoflavonoides (Diniz-Campos *et al.*, 2003), en respuesta a la exposición a luz UV (Dixon *et al.*, 2002).

La peroxidasa aniónica y la glutatión peroxidasa. Se ha implicado a las peroxidases en numerosos procesos fisiológicos de importancia durante las interacciones planta-patógeno, incluyendo la lignificación, el entrecruzamiento de componentes de la pared celular y durante la resistencia sistémica adquirida (Mäder & Amberg-Fisher, 1982; Bradley *et al.*, 1992; Curtis *et al.*, 1995). El incremento en la actividad de las peroxidases se ha asociado con una disminución en la tasa de multiplicación y dispersión de patógenos, señalando un papel activo de estas enzimas en la resistencia. Las peroxidases catalizan la oxidación de una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos a expensas del H₂O₂ (Chittoor *et al.*, 1997). La secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de la peroxidasa aniónica evaluada en este estudio presenta un 55% de identidad con una peroxidasa aniónica reportada en camote dulce (*Ipomoea batatas*, código del GenBank Z84472), la cual es inducida transcripcionalmente por bajas temperaturas (4 °C). Esta proteína contribuye a la protección contra el estrés oxidativo inducido por el frío y las heridas (Huh *et al.*, 1997).

La esterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de compuestos que contienen un enlace éster; su actividad se ha relacionado con la defensa de la planta frente a patógenos. En *C. annuum* se demostró que la sobreexpresión de una esterasa inhibió la formación del apresorio de *Colletotrichum gloeosporioides* de manera dosis-dependiente y protegiendo a los frutos de chile contra la infección (Kim *et al.*, 2001).

Una ω-6 desaturasa. Las ω-6-desaturasas participan en el metabolismo de los ácidos grasos, llevan a cabo la desaturación del ácido oleico, para producir el ácido linoléico, el cual sufre una desaturación para formar el ácido linolénico. Éste desempeña una función importante durante la interacción planta-patógeno, siendo el sustrato para la síntesis de JA (Teixeira *et al.*, 2009; Vick & Zimmerman, 1983). Se observó que la inoculación de las plántulas de chile

habanero con *F. oxysporum* indujo la expresión de las dos ω -6 desaturasas analizadas. En contraste, la aspersión con etefón sin la posterior inoculación con *F. oxysporum* indujo únicamente la expresión de la ω -6 desaturasa1, lo que indica una regulación diferencial de estos dos genes. La secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de la ω -6 desaturasa1 tiene un nivel de identidad del 99%, mientras que el de la ω -6 desaturasa2 del 69%, con una ácido graso desaturasa de *C. annuum* (código del GenBank EF645679), la que fue inducida de manera específica durante la respuesta de resistencia del chile al virus del mosaico de tabaco (Kim *et al.*, 2007). Las desaturasas de plantas se consideran proteínas de membrana, a excepción de la proteína acarreadora de esteroil acil desaturasa (Iba *et al.*, 1993). La modificación en el nivel de expresión de la ω -6 desaturasa1 sugiere que podrían estar presentándose remodelaciones en las membranas celulares, particularmente en las de los cloroplastos o en el retículo endoplásmico, ya que en estos sitios es donde se encuentra localizada la proteína (Teixeira *et al.*, 2009).

Por otro lado, la inoculación de las plántulas de chile habanero con *F. oxysporum* indujo la expresión de las tres MAPKs analizadas (CcMPK1/2/3), mientras que la aspersión con etefón inhibió la expresión de las CcMPK2 y 3, y cuando las plántulas se asperjaron con etefón y posteriormente fueron inoculadas con *F. oxysporum* no se indujo la expresión de ninguna de las tres MAPKs, dando como resultado la susceptibilidad de la planta. Esto sugiere que la inducción de la expresión de las MAPKs es importante para que se presente la respuesta de defensa en la planta y que el ET podría estar regulando de manera negativa su expresión.

La secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de CcMPK1 de *C. chinense* muestra un nivel de identidad del 98% con una MAPK de *Solanum tuberosum* (StMPK1, código del GenBank AB062138), la cual se activó en tubérculos de papa tratados con las paredes celulares de la hifa de *P. infestans*, y está relacionada con la muerte celular que se presenta durante la respuesta de

hipersensibilidad (Katou *et al.*, 1999; Katou *et al.*, 2005). Además, ésta presenta una identidad en la secuencia deducida de aminoácidos del 96% con la MPK6 de *A. thaliana* (AtMPK6, código TAIR AT2G43790) y del 82% con AtMPK4 (código TAIR AT4G01370). AtMPK6 es inducida por diversos tipos de estrés tanto bióticos como abióticos, y se ha demostrado que dependiendo de la MAPKK que la active es el tipo de respuesta final que se presentará en la planta. En la AtMPK6 convergen al menos tres señales extracelulares distintas (una mediada por el JA, otra por patógenos y una más por estrés salino/frío) para dar lugar a tres grupos diferentes de respuestas (Takahashi *et al.*, 2007). En *Arabidopsis* el silenciamiento de la AtMPK6 compromete la resistencia basal, así como la gen a gen de la planta (Menke *et al.*, 2004). La AtMPK6 de *Arabidopsis* es el ortólogo de una MAPK de tabaco denominada proteína cinasa inducida por salicilato (SIPK), la cual es activada por inductores generales y específicos de raza, así como por estrés físico (Nühse *et al.*, 2000).

La secuencia deducida de aminoácidos de CcMPK1 tiene una identidad del 98% con una MAPK activada por SA de *Nicotiana tabacum* (código del GenBank U94192; Zhang & Klessig, 1997).

La CcMPK2 de chile habanero tiene una identidad del 98% en la secuencia deducida de aminoácidos con MAPKs de diversas especies de la familia Solanaceae [*Lycopersicon esculentum* (código del GenBank AY261513), *Solanum tuberosum* (código del GenBank AB062139), *Solanum peruvianum* (código del GenBank EU887292), y *Nicotiana benthamiana* (código del GenBank AB373026)], incluyendo a CcMPK3, y 97% con CcMPK1, además presenta un 95, 85 y 82% de identidad con las MAPKs AtMPK6, AtMPK3 (código TAIR AT3G45640) y AtMPK4 de *Arabidopsis*, respectivamente.

La secuencia deducida de aminoácidos de CcMPK3 comparte una identidad del 96% con AtMPK6, de 86% con AtMPK3 y de 83% con AtMPK4.

Debido al alto nivel de identidad que hay entre las MAPKs de chile habanero analizadas en este estudio con la AtMPK6 de *A. thaliana* y a la MAPK inducida por salicilato en tabaco, es posible que las MAPKs de chile habanero también sean inducidas por esta hormona vegetal, lo que apoyaría las observaciones que sugieren que el ET regula de manera negativa su expresión.

NPR1, como mencionamos con anterioridad, es un regulador importante de la ruta de señalización mediada por el SA. A pesar de que su expresión es inducida, tanto por la inoculación con *F. oxysporum* como por la aspersión con etefón, su expresión se inhibe cuando las plántulas perciben los dos estímulos, lo que parece sugerir que las dos rutas actúan antagonicamente en algún punto corriente arriba de NPR1. Se debe mencionar que se analizaron los tiempos cortos de la interacción y que el patrón de expresión podría cambiar en las etapas medias o tardías. Al observar que la expresión de NPR1 se inhibe cuando las plántulas asperjadas con etefón son inoculadas con *F. oxysporum*, presentando entonces susceptibilidad, se podría sugerir que es posible que la ruta de defensa del chile habanero contra *F. oxysporum* está mediada por el SA, en donde NPR1 tiene un papel importante en su establecimiento.

El factor de transcripción WRKY de chile habanero tiene un 98% de identidad en la secuencia deducida de aminoácidos con WRKY de *C. annuum* (código del GenBank AY391747), el cual es inducido durante la respuesta de hipersensibilidad disparada por el virus del mosaico del tabaco y *Xanthomonas campestris* (Park *et al.*, 2006). Así mismo, tiene un 88% de identidad con WRKY6 de *Nicotiana attenuata* (código del GenBank AY456272) donde se observó su función como regulador en respuesta a herviboría (Skibbe *et al.*, 2008).

El gen de respuesta a ET, ACC oxidasa mostró una pequeña inducción en su transcripción con el tratamiento con etefón; sin embargo, ésta se reprimió cuando la plántula, además de ser asperjada, se inoculó con *F. oxysporum*, sugiriendo que la percepción de ambos estímulos (ET y *F. oxysporum*) regulan

de manera negativa la expresión de este gen. Es importante mencionar que la ACC oxidasa es una proteína codificada por una familia multigénica; en jitomate, la ACC oxidasa está codificada por lo menos por cuatro miembros de una familia que presenta regulación diferencial (Nakatsuka *et al.*, 1998; Anjanasree *et al.*, 2005). Al igual que NPR1, la expresión de la ACC oxidasa fue inducida cuando se aplica uno de los dos estímulos (ET o *F. oxysporum*), pero se inhibió al tratarlo con ambos.

2.5 CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones experimentales analizadas, las plántulas de chile habanero fueron altamente tolerantes a la infección por el hongo *F. oxysporum*, lo que sugiere que la interacción entre ambos organismos es de tipo incompatible.
- El tratamiento con etefón revirtió el sentido de la interacción, dando lugar a la susceptibilidad de la plántula, lo que parece sugerir que el ET podría estar inhibiendo la ruta de defensa efectiva contra el hongo.
- El etefón causó un retardamiento en el crecimiento *in vitro* de *F. oxysporum* cuando se aplicó directamente en el medio de cultivo; sin embargo, cuando se aplica sobre la planta se produce el efecto contrario, ya que cuando la plántula es previamente asperjada con el compuesto, el hongo la infecta con mayor rapidez.
- La inoculación de las plántulas con *F. oxysporum* indujo la expresión de genes de defensa y de respuesta a estrés, sugiriendo que la planta percibió la presencia del hongo, activando los mecanismos de defensa.
- El tratamiento con etefón y la posterior inoculación con *F. oxysporum* reprimió la expresión de los genes de GST1/12, peroxidasa aniónica, glutatión peroxidasa, esterasa, ω -6 desaturasa, CcMPK1/2/3, NPR1 y

WRKY, lo cual podría estar relacionado con el abatimiento de la respuesta de defensa, o ser el resultado de ello. La represión génica parece ser la causa de la susceptibilidad en las plántulas de chile habanero inoculadas con *F. oxysporum* que fueron previamente asperjadas con etefón.

2.6 REFERENCIAS

- Anjanasree, K. N., P. K. Verma and K. C. Bansal (2005). *Differential expression of tomato ACC oxidase gene family in relation to fruit ripening*. Current Science, 89(8), 1394-1399.
- Armstrong, G. M. and J. K. Armstrong (1981). "Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases" in *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, Nelson, P. E., T. A. Tousson and R. J. Cook (ed). The Pennsylvania State University Press, University Park and London. pp. 391-399.
- Berrocal-Lobo, M. and A. Molina (2004). *Ethylene Response Factor 1 mediates Arabidopsis resistance to the soilborne fungus Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Microbe Interactions, 17(7), 763-77.
- Berrocal-Lobo, M. and A. Molina (2007). *Arabidopsis defense response against Fusarium oxysporum*. Trends in Plant Science, 13(3), 145-150.
- Bradley, D.J., P. Kjellbont and C. J. Lamb (1992). *Elicitor- and wound inducible oxidative cross-linking of a prolin-rich plant cell wall protein a novel, rapid defense response*. Cell, 70, 21-30.
- Chittoor, J. M., J. E. Leach, and F. F. White (1997). *Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Molecular Plant Microbe Interactions, 10, 861-871.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). *Genomic sequencing (DNA methylation/ UV crosslinking/ filter hybridization/ immunoglobulin genes)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81, 1991-1995.
- Clarke, J. D., S. M. Volko, H. Ledford, F. M. Ausubel and X. Dong (2000). *Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in Arabidopsis*. The Plant Cell, 12, 2175-2190.
- Cohen, S. I. and F. D. Heald (1941). *A wilt and root rot of asparagus caused by Fusarium oxysporum (Schlecht.)*. Plant Disease Reports, 25, 503-509.
- Csiszár, J., M. Szabó, E. Illés and K. Kurucz (2002). *Investigations of glutathione S-transferase and peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic tobacco calli under salt stress conditions*. Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology, 46, 79-80.
- Curtis, M. D, J. P. Nourse and J. M. Manners (1995). *Nucleotide sequence of a cationic peroxidase gene from the tropical forage legume Stylosanthes humilis*. Plant Physiology, 108, 1303-1304.
- Diniz-Campos, A., A. Gui-Ferreira, M. M. Vozári-Hampe, I. Ferreira-Antunes, N. Brancão, E. P. Silveira, J. Batista da Silva, V. Algayer-Osório (2003). *Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by*

- salicylic acid and Colletotrichum lindemuthianum in common bean. Brazilian Journal of Plant Physiology, 15(3), 129-134.*
- Dixon, D. P., A. Laphorn and R. Edwards (2002). *Plant glutathione transferases. Genome Biology, 3(3), 1-10.*
- Francia, D., D. Demaria, O. Calderini, L. Ferraris, D. Valentino, S. Arcioni, G. Tamietti and F. Cardinale (2007). *Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection. Plant, Cell and Environment, 30, 1357-1365.*
- Huh, G. H. S. J., Lee, Y. S. Bae, J. R. Liu and S. S. Kwak (1997). *Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. Molecular and General Genetics, 255, 382-391.*
- Iba, K., S. Gibson, T. Nishiuchi, T. Fuse, M. Nishimura, V. Arondel, S. Hugly and C. Somerville (1993). *A gene encoding a chloroplast ω -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the fad7 mutant of Arabidopsis thaliana. The Journal of Biological Chemistry, 268(32), 24099-24105.*
- Jarvis, W. R. (1988). *Fusarium crown and root rot of tomatoes. Phytoprotection, 69, 49-64.*
- Jovicich, E., D. J. Cantliffe and P. J. Stoffella (2003). *Managing greenhouse grown peppers in a saline environment. Acta Horticulturae, 609, 187-191.*
- Katou, S., H. Yoshioka, K. Kawakita, O. Rowland, J. D. G. Jones, H. Mori and N. Doke (2005). *Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. Plant Physiology, 139, 1914-1926.*
- Katou, S., K. Senda, H. Yoshioka, N. Doke and K. Kawakita (1999). *A 51 kDa protein kinase of potato activated with hyphal wall components from Phytophthora infestans. Plant Cell Physiology, 40, 825-831.*
- Kim, K. J., J. H. Lim, S. Lee, Y. J. Kim, S. B. Choi, M. K. Lee, D. Choi and K. H. Paek (2007) *Functional study of Capsicum annuum fatty acid desaturase 1 cDNA clone induced by Tobacco mosaic virus via microarray and virus-induced gene silencing. Biochemical and Biophysical Research Communications, 362(3), 554-561.*
- Kim, Y. S., H. H. Lee, M. K. Ko, C. E. Song, C. Y. Bae, Y. H. Lee and B. J. Oh (2001). *Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (Capsicum annuum) esterase. Molecular Plant Microbe Interactions, 14, 80-85.*
- Kunkel, B. and D. Brooks (2002). *Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology, 5, 325-331.*

- Lund, S. T., R. E. Stall and H. J. Klee (1998). *Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato*. *The Plant Cell*, 10, 371-382.
- Mäder, M. and V. Amberg-Fisher (1982). *Role of peroxidase in lignifications of tobacco cells*. *Plant Physiology*, 70, 1128-1131.
- Mao, P., M. Duan, C. Wei and Y. Li (2007). *WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression*. *Plant Cell Physiology*, 48, 833-842.
- Marrs, K. A. (1996). *The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 127-158.
- Menke, F. L., J. A. van Pelt, C. M. Pieterse and D. F. Klessig (2004). *Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16, 897-907.
- Mushtaq, M. and M.H. Hashmi (1997). *Fungi associated with wilt diseases of capsicum in Sindh, Pakistan*. *Pakistan Journal of Botany*, 29, 217-222.
- Nakazawa-Ueji, Y. E. (2010). *Efectos de homogenados fúngicos sobre la vía de transducción de señales mediada por MAPKs en Capsicum chinense Jacq.* Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México.
- Nakatsuka, A., S. Murachi, H. Okunishi, S. Shiomi, R. Nakano, Y. Kubo and A. Inaba (1998). *Differential expression and internal feedback regulation of 1-amino cyclopropane-1-carboxylate synthase, of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening*. *Plant Physiology*, 118, 1295-1305.
- Nühse, T. S., S. C. Peck, H. Hirt, and T. Boller (2000). *Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7521-7526.
- Park, C. J., Y. C. Shin, B. J. Lee, K. J. Kim, J. K. Kim and K. H. Paek (2006). *A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and Xanthomonas campestris*. *Planta*, 223, 168-179.
- Ploetz, R. C. (2006). *Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653-656.
- Ruepp, A., A. Ifred Zollner, D. Maier, K. Albermann, J. Hani, M. Mokrejs, I. Tetko, U. Güldener, G. Mannhaupt, M. Münsterkötter and H. W. Mewes (2004). *The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes*. *Nucleic Acids Research*, 32, 5539-5545.

- Shinshi, H. (2008). *Ethylene-regulated transcription and crosstalk with jasmonic acid*. *Plant Science*, 175(1-2), 18-23.
- Skibbe, M., N. Qu, I. Galis and I. T. Baldwin (2008). *Induced plant defenses in the natural environment: Nicotiana attenuata WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory*. *The Plant Cell*, 20, 1984-2000.
- Spoel, S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van Loon, X. Dong and C. M. J. Pieterse (2003). *NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol*. *The Plant Cell*, 15, 760-770.
- Takahashi, F., R. Yoshida, K. Ichimura, T. Mizoguchi, S. Seo, M. Yonezawa, K. Maruyama, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (2007). *The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 805-818.
- Teixeira, M. C., N. Coelho, M. E. Olsson, P. E. Brodelius, I. S. Carvalho and M. Brodelius (2009). *Molecular cloning and expression analysis of three omega-6 desaturase genes from purslane (Portulaca oleracea L.)*. *Biotechnology Letters*, 31, 1089-1101.
- Vick, B. A. and D. C. Zimmerman (1983). *The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 111, 470-77.
- Zhang, S. and D. F. Klessig (1997). *Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco*. *The Plant Cell*, 9(5), 809-824.

Capítulo 3

Evaluación del efecto del etileno en la interacción compatible *Capsicum chinense-Phytophthora capsici*

3.1 INTRODUCCIÓN

Phytophthora capsici es un oomiceto distribuido en todo el mundo, agente causal de la enfermedad conocida como marchitez del chile, la cual provoca grandes pérdidas en los cultivos de chile. El chile habanero es una especie susceptible a su ataque, y solamente se han reportado dos variedades de *C. annum* resistentes a esta enfermedad (Palloix *et al.*, 1990; Gil-Ortega *et al.*, 1991). El uso de compuestos inductores de las respuestas de defensa en chile ha permitido la evaluación de su efectividad para restringir el ataque por *P. capsici* (Sunwoo *et al.*, 1996); sin embargo, el mecanismo exacto por el cual se induce la resistencia no se ha determinado.

El papel de las fitohormonas durante la interacción planta-patógeno es fundamental para el establecimiento de las respuestas de defensa frente a diversos tipos de amenazas, incluyendo el ataque de patógenos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante el estudio de la interacción del chile habanero con *P. capsici* y los efectos de incrementar los niveles de ET e inhibir su percepción durante la interacción. En la primera parte del capítulo (Sección 3.2), se presenta el análisis de la expresión de un grupo de 21 genes de chile habanero en plántulas asperjadas con etefón e inoculadas con *P. capsici*. En la segunda parte del capítulo se incluye una copia de la publicación que describe el efecto que tuvo la manipulación exógena de la concentración y la percepción de ET en las plántulas cultivadas *in vitro*, tanto en su interacción con *P. capsici*, caracterizando el desarrollo de la sintomatología de las plántulas a simple vista y mediante micrograffas electrónicas de barrido, así como determinando la producción de ET en las plántulas inoculadas, y

evaluando las modificaciones en los niveles de expresión de un grupo de genes marcadores de las rutas de señalización medidas por el ET, el JA y el SA.

3.2 EFECTO DEL ETILENO EN LA EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE GENES DE *Capsicum chinense* DURANTE SU INTERACCIÓN CON *Phytophthora capsici*

Se analizó la expresión de los 21 ADNc descritos en el Capítulo 2 mediante una hibridación de arreglos tipo dot blot, a partir de hojas sistémicas de plántulas de un mes de edad asperjadas con etefón o agua e inoculadas con *P. capsici*.

3.2.1 METODOLOGÍA

La metodología que se utilizó se describe detalladamente en la sección 2.2.7 del Capítulo 2. Las sondas empleadas para realizar la hibridación fueron las poblaciones de ADNc marcadas con digoxigenina obtenidas de los ARNs extraídos de hojas sistémicas de plántulas de chile habanero que fueron asperjadas con agua o con etefón 5 mM e inoculadas con dos discos de micelio de *P. capsici* o de APD.

La identidad de los ADNc en el arreglo se describe en el Capítulo 2 (Cuadro 2.3).

3.2.2 RESULTADOS

El análisis de expresión de genes mediante la hibridación diferencial en los arreglos mostró que la inoculación de las plántulas con *P. capsici* no modifica en gran medida los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados, con excepción de aquellos que codifican las CcMAPK1/3, cuya expresión se indujo notoriamente (Fig. 3.1).

El tratamiento con etefón aumentó la expresión de la NPR1, la ω -6 desaturasa1, la proteína de pared celular, y muy ligeramente la CcMPK1 (Fig. 3.1).

Cuando las plántulas fueron asperjadas con etefón y posteriormente inoculadas con el oomiceto, se inhibió la expresión de las dos MAPKs (CcMPK1 y CcMPK3) y PR10 (4), mientras que la de NPR1 y la ω -6 desaturasa1 permaneció inducida (Fig. 3.1).

Los resultados sugieren que las plántulas de chile habanero perciben la presencia de *P. capsici* y que los cambios ocasionados en el hospedante durante la infección con el oomiceto disparan una respuesta en la que se involucra la participación de dos MAPKs. Sin embargo, la interacción entre ambos organismos es de tipo compatible, por lo que la planta muere irremediamente. Es por esto que la inducción de genes que codifican MAPK de chile habanero puede no ser suficiente para frenar la infección, o puede significar que ambas proteínas señalizadoras participan en el mecanismo de infección, regulando de manera negativa la respuesta de defensa de la planta.

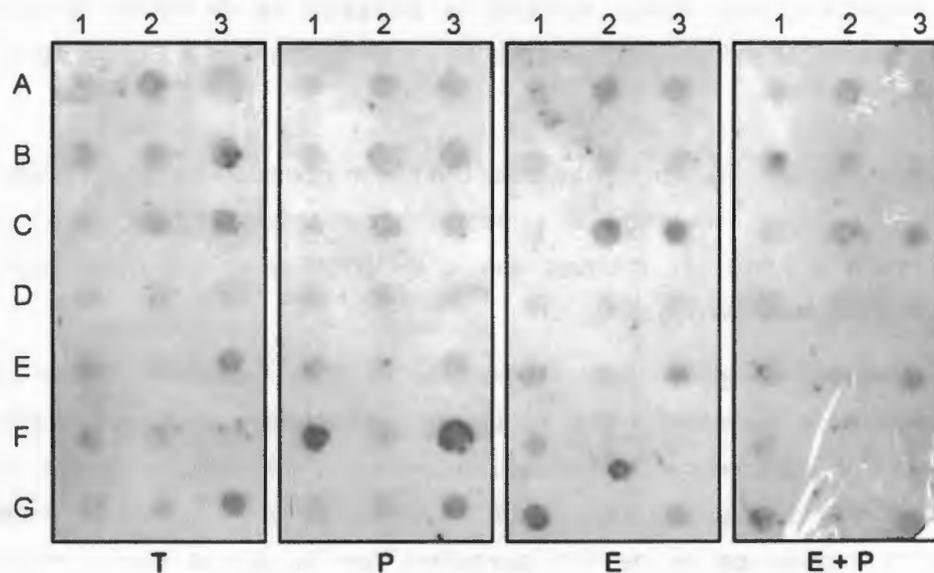


Figura 3.1. Análisis de los efectos del etileno y la infección con *P. capsici* sobre la expresión génica en plántulas de chile habanero. Seis μg de cada una de las 21 clonas de ADNc mostradas en el Cuadro 2.3 fueron colocados en una membrana de nylon e hibridadas independientemente con sondas de ADNc marcadas con digoxigenina, producidas a partir de RNA extraído de las hojas de plántulas que fueron sometidas a cuatro diferentes tratamientos: aspersión con agua (T), aspersión con etefón 5 mM (E), inoculación con *P. capsici* (P) o inoculación con *P. capsici* después de asperjar con etefón (E + P).

3.2.3 DISCUSIÓN

Al evaluar la expresión de los 21 genes de chile habanero que codifican proteínas con diversas funciones en la célula, se logró observar que la inoculación con *P. capsici* indujo la expresión de dos MAPKs (CcMPK1/3). Es bien conocido que las MAPKs pueden aumentar la transcripción de genes relacionados con la defensa cuando la planta percibe diferentes tipos de estrés, ya sean bióticos o abióticos (Colcombet & Hirt, 2008; Pitzschke *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro modelo los resultados mostraron que cuando se inocula con el oomiceto ocurre la inducción de las MAPKs, pero las plántulas mueren;

en contraste, cuando se asperja con el etefón se inhibe la inducción de ambas MAPKs y la planta es ahora tolerante contra el oomiceto. Lo anterior sugiere que ambas, o al menos una de las MAPKs, podrían estar desempeñando un papel como regulador negativo en el establecimiento de la respuesta de defensa en chile habanero. La mutante *mpk4* de *Arabidopsis* exhibe una SAR constitutiva, niveles elevados de SA, la expresión constitutiva de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis, y una mayor resistencia a patógenos virulentos, además la actividad de la MPK4 induce la expresión de genes de respuesta al JA (Petersen *et al.*, 2000).

En el presente trabajo, la relación encontrada entre la expresión de las MAPK y la muerte de las plántulas, así como su represión con la sobrevivencia permiten sugerir que la ruta de defensa contra *P. capsici* en *C. chinense* requiere de la inactivación de CcMPK1, CcMPK3 o ambas.

En el caso del gen que codifica la proteína NPR1, se observó que su expresión se inhibió durante la interacción chile habanero-*P. capsici*. NPR1 es un componente de la vía de señalización mediada por el SA durante el establecimiento de la SAR. Cuando se presenta la acumulación de SA en las células, se induce un cambio en el balance redox, resultando en la reducción de NPR1 a una forma monomérica, ya que en un estado no inducido, NPR1 está presente como un homo-oligómero formado a través de enlaces disulfuro intermoleculares presente en el citosol (Pieterse & Van Loon, 2004). El monómero de NPR1 se acumula en el núcleo e interactúa positivamente con la familia de factores de transcripción TGA, induciendo de esta manera la

expresión de genes de defensa como PR1 (Mou *et al.*, 2003). Además de su función en el núcleo NPR1 se considera un punto modulador entre las vías de señalización mediadas por el SA, el JA y el ET en donde su participación a nivel citosólico es fundamental para inhibir las respuestas reguladas por el JA, bajo la influencia del SA y el ET (Spoel *et al.*, 2003; Mou *et al.*, 2003; Leon-Reyes *et al.*, 2009).

En nuestro modelo, la represión de NPR1 en las plántulas inoculadas con *P. capsici* podría indicar que el oomiceto posee la capacidad de inhibir en algún punto alguna ruta de defensa en la que participa esta proteína, lo que puede ser determinante para que no se dé una respuesta de defensa efectiva contra este patógeno hemibiotrófico.

Para corroborar la modificación de la expresión de NPR1 bajo los diferentes tratamientos se realizó un análisis por PCR en tiempo real, donde también se analizaron genes marcadores de las rutas de señalización mediadas por el ET (ACC oxidasa), el JA-ET (PDF1.2) y el SA (PR1); los resultados se muestran en la segunda parte de este capítulo.

3.2.4 CONCLUSIONES

- La inoculación de las plántulas de chile habanero con *P. capsici* indujo la expresión de dos MAPKs. Puesto que las plántulas mueren, la activación de estas proteínas en el hospedante podría estar involucrada en la regulación negativa de la respuesta de defensa.
- La expresión del regulador transcripcional NPR1 se inhibió al inocular las plántulas con *P. capsici*. Lo anterior sugiere su participación en el establecimiento de la defensa, aunque para poder determinarlo debe demostrarse la activación de la proteína.

3.2.5 REFERENCIAS

- Colcombet, J. and H. Hirt (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413, 217-226.
- Gil-Ortega, R., C. Palazón-Español and J. Cuartero-Zueco (1991). *Genetics of resistance to Phytophthora capsici in the Mexican pepper SCM-334*. *Plant Breeding*, 107, 50-55.
- Leon-Reyes, A., S. H. Spoel, E. S. De Langue, H. Abe, M. Kobayashi, S. Tsuda, F. E. Millenaar, R. A. M. Welschen, T. Ritsema and C. M. J. Pieterse (2009). *Ethylene modulates the role of Nonexpressor of Pathogenesis-Related Genes1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling*. *Plant Physiology*, 149, 1797-1809.
- Mou, Z., W. Fan and X. Dong (2003). *Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes*. *Cell*, 113, 935-944.
- Palloix, A., A. M. Daubeze, T. Phaly and E. Pochard (1990). *Breeding transgressive lines of pepper for resistance to Phytophthora capsici in a recurrent selection system*. *Euphytica*, 51, 141-150.
- Petersen, M., P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H. B. Nielsen, M. Lacy, M. J. Austin, J. E. Parker, S. B. Sharma, D. F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A. B. Jensen and J. Mundy (2000). *Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*. *Cell*, 103(7), 1111-1120.
- Pieterse, C. M. J. and L. C. Van Loon (2004). *NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways*. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 456-464.
- Pitzschke, A., A. Schikora and H. Hirt (2009). *MAPK cascade signalling networks in plant defence*. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 1-6.
- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari and J. D. G. Jones (2007). *Pathological hormone imbalances*. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 372-379.
- Spoel, S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van Loon, X. Dong and C. M. J. Pieterse (2003). *NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol*. *The Plant Cell*, 15, 760-770.
- Sunwoo, J. Y., Y. K. Lee and B. K. Hwang (1996). *Induced resistance against Phytophthora capsici in pepper plants in response to DL-B-amino-n-butyric acid*. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 663-670.

3.3 ETHYLENE, BUT NOT SALICYLIC ACID OR METHYL JASMONATE, INDUCES A RESISTANCE RESPONSE AGAINST *Phytophthora capsici* IN HABANERO PEPPER

Paper accepted in the European Journal of Plant Pathology

doi:10.1007/s10658-011-9841-z

Authors:

Rosalía Núñez-Pastrana¹, Guadalupe Fabiola Arcos-Ortega², Ramón Armando Souza-Perera¹, Carlos Alberto Sánchez-Borges¹, Yumi Elena Nakazawa-Ueji¹, Francisco Javier García-Villalobos¹, Adolfo Alberto Guzmán-Antonio¹ and José Juan Zúñiga-Aguilar^{1*}

(1) Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200 Yucatán, México

(2) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo No. 195, Playa Palo de Santa Rita, La Paz, B. C. S., México

Author for correspondence:

José Juan Zúñiga Aguilar

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200 Yucatán, México.

Phone: +52 (999) 9428330

Fax: +52 (999) 9813900

*Email: zuniga@cicy.mx

Key words:

Pathogenesis-related proteins, phytohormones, Phytophthora blight

3.3.1 ABSTRACT

We sprayed defence-related plant growth regulators (salicylic acid, methyl jasmonate and ethephon) on one-month-old Habanero pepper seedlings cultivated *in vitro*. Twenty-four hours later, we inoculated the seedlings with a virulent strain of *Phytophthora capsici* and periodically evaluated the disease symptoms. At the concentrations used, neither salicylic acid nor methyl jasmonate generated a protective effect in the seedlings, which died less than 10 days post inoculation. However, the treatment with 5 mM ethephon delayed or prevented disease symptoms in 30% of the seedlings. Interestingly, blocking the ethylene receptor with a previous application of 300 μ M silver nitrate impeded the protective effects of ethephon. This result demonstrated that the plant resistance response required the perception of ethylene. Analysis of transcript populations in ethephon-treated seedlings revealed a direct correlation between survival and the accumulation of PR1, a gene marker of the systemic acquired resistance (SAR). Although the ethephon treatment also modified transcript levels of the plant defensin PDF1.2, a marker of the induced systemic resistance (ISR), in this case the accumulation also occurred when the ethylene receptor was blocked, suggesting a non-specific effect. The ethephon treatment did not modify the expression of NPR1 (a key transcriptional regulator of plant defence). Interestingly, transgenic pepper seedlings overexpressing endogenous PR10 or esterase genes, which are induced by the ET treatment, completely resisted the infection, which corroborated the importance of these genes in the defence response. Our results suggest that ethylene induced a systemic defence response in susceptible seedlings, possibly in an NPR1-independent pathway.

Abbreviations

Days post inoculation (dpi), Ethylene (ET), Jasmonic acid (JA), Methyl jasmonate (MeJA), Phytophthora blight (PB), Salicylic acid (SA)

3.3.2 INTRODUCTION

Phytophthora blight (PB) is a deadly disease that affects all species of the genus *Capsicum* and many species within the families Solanaceae and Cucurbitaceae (Kreutzer *et al.*, 1940). The disease is characterised by root and crown rot; leaf, fruit and stem blight; and the rapid wilting and death of infected plants (Ristaino *et al.*, 1993). Even though the causal agent of PB (the oomycete *Phytophthora capsici*) was first described on bell pepper in New Mexico almost 90 years ago (Leonian, 1922), no effective management programs have been developed to stop its spread in pepper crops.

There are virtually no PB-resistant species in the genus *Capsicum*; the commercially valueless *Capsicum annuum* cultivars "AC2258" (Palloix *et al.*, 1990) and "Serrano Criollo de Morelos" (CM334) (Gil-Ortega *et al.*, 1991) are among the few exceptions. Research efforts to find the genetic basis of resistance have determined that it can be polygenic, with quantitative trait loci (QTL) mapping to several chromosomes (Sugita *et al.*, 2006). However, efforts to generate resistant cultivars through breeding programs have not resulted in cultivars with consistent levels of resistance.

Manipulation of the host response has been proposed as one mechanism by which oomycete pathogens block the plant defence response (Kamoun, 2006). If this mechanism is in effect, a previous triggering of the correct defence response should render the susceptible pepper species resistant to later infection by *P. capsici*. Indeed, the application of chemicals has been used to study the susceptibility of peppers to PB. Baysal *et al.* (2005) proposed that the activation of defence-related enzymes such as L-phenylalanine ammonia-lyase

(PAL), chitinase, and β -1,3-glucanase may contribute to the induction of resistance against *P. capsici* in *C. annuum* seedlings that were sprayed with acibenzolar-S-methylbenzo [1,2,3]thiadiazole-7-carbothioic acid-S-methyl ester (ASM). In another report, the exogenous application of DL- β -amino-n-butyric acid (BABA) induced a resistance response to PB in *C. annuum* (Sunwoo *et al.* 1996). In these works, the exact mechanisms by which the chemical treatments induced a systemic response were not determined.

The establishment of plant systemic defence responses requires the orchestrated action of plant growth regulators (PGRs). Salicylic acid (SA) mediates the establishment of systemic acquired resistance (SAR), a robust response triggered by the specific recognition of pathogenic microorganisms and characterised by the induction of genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins. Ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) play key roles in the induced systemic resistance (ISR), a response activated by non-pathogenic rhizobacteria (Van Loon *et al.* 1998) that includes the expression of non-“SAR” PR proteins, principally plant defensin 1.2 (PDF1.2) and thionin 2.1 (THI2.1). Despite the fact that different signals activate SAR and ISR, their signal transduction networks are complex and may share some components. In some responses, the protein encoded by the non-expressor of PR proteins gene 1 (NPR1) can activate either SAR or ISR, according to the nature of the pathogenic signal and the defence hormone involved (Pieterse & Van Loon, 1999). For example, SA can induce a gene encoding the protein PR1 (a molecular marker of SAR) through NPR1-dependent and NPR1-independent mechanisms (Clarke *et al.* 1998); however, ET induces PR1 in an NPR1-independent pathway (Shah *et al.* 2001). In any case, once activated, PR1 displays antimicrobial activity against different pathogens.

Because the role of phytohormones in the establishment of plant systemic responses is well established, we tested the hypothesis that a previous treatment with SA, MeJA (methyl jasmonate) or ET could promote a resistant

response against PB in a susceptible cultivar of Habanero pepper. We also evaluated the expression of SAR and ISR gene markers to obtain further evidences about the possible mechanisms of defence. Our results revealed that a previous spraying with ET reduced or impeded infection in seedlings inoculated with *P. capsici*. The resistance phenotype was correlated with the expression of the PR1 gene. Since it seemed that expression of PR proteins correlated with the resistance phenotype, we overexpressed PR10 and esterase homologue genes to evaluate their contribution to defence. In both cases the overexpression conferred resistance to *C. chinense* seedlings against *P. capsici*. These results demonstrated that the external application of ET induced a defence response against PB in Habanero pepper, probably by the promotion of a NPR1-independent SAR-like response.

3.3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.3.1 *In vitro* CULTURE OF HABANERO PEPPER

Habanero pepper seeds from Seminis® were surface sterilised with 80% ethanol for 5 min, rinsed three times with sterile distilled water, washed with sodium hypochlorite (1.6%) for 15 min and finally rinsed three times with sterile distilled water. Surface-sterilised seeds were germinated in Petri dishes with cotton and water. Once the radicle emerged, the seeds were transferred to Magenta boxes containing synthetic media. The medium contained Murashige and Skoog salts (Sigma), thiamine (40 mg l⁻¹, Sigma), myo-inositol (100 mg l⁻¹, Sigma), L-cysteine (25 mg l⁻¹, Fluka), sucrose (30 g l⁻¹) and gelrite (2.2 g l⁻¹, Sigma); the pH of the medium was adjusted to 5.6, and it was autoclaved at 1.1 kg cm⁻² (121°C) for 15 min. The Magenta boxes were covered with a lid that allowed gaseous interchange through a sponge. Habanero pepper seedlings were grown for 30-35 days (when they had four leaves) at 25°C under an 18-h photoperiod at a light density of 19.64 μmol m⁻² s⁻¹.

3.3.3.2 CHEMICAL TREATMENTS

One-month-old *in vitro* seedlings were sprayed with 1 ml of 5 mM ethephon (Sigma). Sets of seedlings were sprayed with water as controls. To inhibit the perception of ET, the seedlings were sprayed with 300 μ M AgNO₃ (Sigma) 24 h before the application of ethephon (1 ml of a 5 mM solution). After each chemical treatment, the Magenta boxes were hermetically closed for 24 h, and then the seedlings were inoculated with *P. capsici*.

3.3.3.3 *In vitro* CULTURE OF *Phytophthora capsici* AND INOCULATION OF HABANERO PEPPER

A virulent strain of *P. capsici* was grown for six days on potato dextrose agar (PDA, Difco) at 28°C before being used to inoculate pepper seedlings. One-month-old Habanero pepper seedlings were inoculated *in vitro* by placing a mycelium plug from *P. capsici* onto the surface of two opposing leaves (the third and fourth true leaves). Disease symptoms were then recorded periodically [at 3, 10 and 20 days post inoculation (dpi)]. In mock-inoculated seedlings, two PDA plugs were used.

3.3.3.4 ET MEASUREMENTS

To measure the production of ET, a 1-ml sample of gas was removed with a gastight syringe (SGE Analytical Science) from the atmosphere of hermetically closed Magenta boxes containing the mock- or *P. capsici*-inoculated seedlings. Gas samples were collected every 24 h over a period of six days. The concentration of ET was determined by gas chromatography (Hewlett Packard gas chromatograph, 8690 Series II) with a GS-Q FSOT column (Alltech, 30 m L x 0.53 mm ID) and an FID detector. Nitrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 10 ml min⁻¹. The temperature of the oven was 70°C, and injector and detector temperature was 200°C. ET was used as an external standard. Three

seedlings per treatment were analysed, and a statistical analysis was performed to determine the standard error in the mock- and *P. capsici*-inoculated seedlings.

3.3.3.5 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Electron micrographs from inoculated Habanero pepper seedlings that were previously treated with 5 mM ethephon and/or 300 μ M AgNO₃ were obtained as follows. Three dpi, the inoculated leaves were cut and prepared for scanning electron microscopy. The leaves were fixed with 5% (v/v) formaldehyde (Sigma), and they were then submerged sequentially for 1 h into different solutions containing increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70 and 96% v/v). The dehydrated leaves were submerged twice into absolute ethanol for 1 hour each, and they were dried using a model Sandri-795 Tousimis® drier, substituting ethanol with liquid CO₂, and subsequently with gaseous CO₂. Finally, the dried samples were metalised with a 21-nm thick gold cover using a Denton® Vacuum Desk II metaliser. The metalised samples were observed under a model JSM-6360LV JEOL® Scanning Electron Microscope.

3.3.3.6 RNA EXTRACTION AND GENE EXPRESSION ANALYSIS

RNA was extracted from the leaves of mock-inoculated pepper seedlings and from seedlings inoculated with a plug of *P. capsici* mycelium. Both types of seedlings were previously treated *in vitro* with 5 mM ethephon and/or 300 μ M AgNO₃. The treated leaves were collected at 0, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h post inoculation, and total RNA was isolated using Trizol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 2 μ g of total RNA was reverse transcribed using oligo-dT and SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen). The transcript levels of specific genes in inoculated seedlings were quantified by means of reverse transcription coupled to

quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Each cDNA used as a qRT-PCR substrate represented different RNA pools, as follows: i) soon after inoculation (0 and 4 h); ii) middle time after inoculation (8, 12 and 24 h); long after inoculation (48 and 72 h). The RNA and cDNA concentrations were measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The qRT-PCR analysis was performed using combinations of gene-specific primers for each cDNA (Table 3.1). Each amplification assay was performed in triplicate in a 48-well plate (StepOne model, Applied Biosystems). The reaction mix (20 μ L final volume) consisted of 10 μ L of SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1 μ L of each primer (250 nM final concentration) and 3 μ g of cDNA. A blank (no-template control) was also incorporated into each assay for each primer pair. The cycling program was as follows: one initial denaturation step at 95 °C for 10 min, then 30 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 54 °C and 30 s at 72 °C. In the case of PDF1.2 transcription analysis, the number of cycles was 40. After completion of the program, melting-curve data were collected to verify PCR specificity, contamination and the absence of primer dimers. Variations in the concentration of every cDNA sample were normalised using actin as an internal standard. Fold changes in gene expression were based on the Δ Ct calculation ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method). Δ Ct corresponded to the Ct of one selected gene subtracted from the Ct of actin for each treatment. Fold changes in expression were based on the calculation of the $\Delta\Delta$ Ct that corresponds to the Δ Ct in treated (water, ethephon or AgNO₃-ethephon) and inoculated leaves subtracted from that of mock-inoculated leaves. An analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple range test ($P \leq 0.05$) was performed to determine the significance of the differences in fold expression between the different treatments.

Table 3.1 Oligonucleotide sequence of the primers used in the real-time RT-PCR assays.

Gene	Sequence primer	Amplicon size (pb)
ACC oxidase	^a F: 5'-AAGTGCAACCATGGGACTTC-3' ^b R: 5'-TGCTTTCCCAGTCTGTGTTG-3'	212
Actin	F: 5'-TTCCCTCTATGCCAGTGGAC-3' R: 5'-GGCTGTGGTGGTCAAAGAGT-3'	183
NPR1	F: 5'-GCACAGAGGACAACAGTGGA-3' R: 5'-TCAGTGAACGCTTTGGTCAG-3'	260
PDF1.2	F: 5'-CAAGGGGTTGTGCCTTAGTA-3' R: 5'-TTCCTGCAGAAGCATTTAAGA-3'	105
PR1	F: 5'-CTTGTTAGTCTCATGATACTAGCC-3' R: 5'-TCATTTTAGTAAGGGACTTTGTCCGG-3'	459

^a Forward primer

^b Reverse primer

3.3.4 RESULTS

3.3.4.1 EXOGENOUS APPLICATION OF ET PREVENTED *Phytophthora capsici* INFECTION OF SUSCEPTIBLE HABANERO PEPPER SEEDLINGS

In non-treated seedlings and in those sprayed with control solutions, *P. capsici* rapidly infected the plant tissue (Fig. 3.2). The inoculated leaves showed necrosis and withering at nearly 3 dpi, and the necrosis reached the leaf peduncle and hypocotyls by 4 dpi. Between 4 and 5 dpi, the necrosis covered

the upper part of the plant, and between 6 and 10 dpi the mycelium grew profusely throughout the entire seedling (Fig. 3.2). In contrast, previous spraying of seedlings with a concentration of ethephon that did not induce the abscission of leaves produced a significant modification of the disease symptoms (Fig. 3.2). Nonetheless, the ethephon treatment had a heterogeneous effect on the population. At 3 dpi (when 100% of control seedlings were infected), 60% of the treated seedlings showed no symptoms of infection. Interestingly, though the percentage of asymptomatic seedlings was reduced to 30% by 10 dpi, these seedlings resisted infection for more than 20 dpi (Table 3.2).

Table 3.2 Effect of exogenous application of ethylene on the severity of *Phytophthora* blight in Habanero pepper.

Dpi ^a	Treatment ^b	Disease severity ^c (% seedlings)			
		—	+	++	++++
3	W	0	10	90	0
	Eth	60	40	0	0
	Ag + Eth	0	20	80	0
10	W	0	0	0	100
	E	30	10	30	30
	A + E	0	0	0	100
20	W	0	0	0	100
	E	20	0	10	70
	A + E	0	0	0	100

^a Days post inoculation.

^b Treatments in pepper seedlings consisted of spraying with water (W), ethephon (Eth) or AgNO₃ and ethephon (Ag + Eth) prior to the inoculation with *P. capsici*.

^c Severity level of the infection was denoted as: (—), no lesion was observed; (+), only one of the two inoculated leaves was necrotized; (++) , the two inoculated leaves were necrotized; (++++), the whole plant was necrotized and mycelium was profusely growing.

The above results suggested a role for ET in the establishment of a defence response against PB; however, there are reports in the literature of non-specific effects induced by ethephon (Lawton *et al.*, 1994). To determine if this defence-like response was induced specifically by ET, we repeated the ethephon treatment in seedlings in which the ET perception was blocked by the application of silver nitrate (300 μM AgNO_3), a chemical compound that impairs the capacity of the receptor to transduce the signal after ET is bound (Beyer 1976). The optimal concentration of AgNO_3 to block the ET perception was determined experimentally by a leaf abscission assay (Supplementary Material 1). We found that the addition of AgNO_3 to pepper seedlings not only impeded the protective effects of ethephon but also allowed a faster proliferation of mycelium *in planta* (Fig. 3.2), which suggested that the resistance phenotype depended on the perception of ET. A closer observation of the infected leaves using scanning electron microscopy revealed that by three dpi the mycelium had dispersed profusely through the tissue (Fig. 3.3a.b), and hyphae began to emerge from the leaf surface (Fig. 3.3c). However, in the ET-treated leaves, most of the mycelium remained within the agar plug and only occasionally disseminated in its vicinity, neither penetrating significantly nor disturbing the leaf surface, which appeared healthy and turgid (Fig. 3.3d-f). Interestingly, the previous addition of AgNO_3 to block the ET perception produced a more aggressive dispersal of the mycelium than that observed in control seedlings (Fig. 3.3h-i). These results reinforce the association of the defence response against *P. capsici* with the perception of ET.

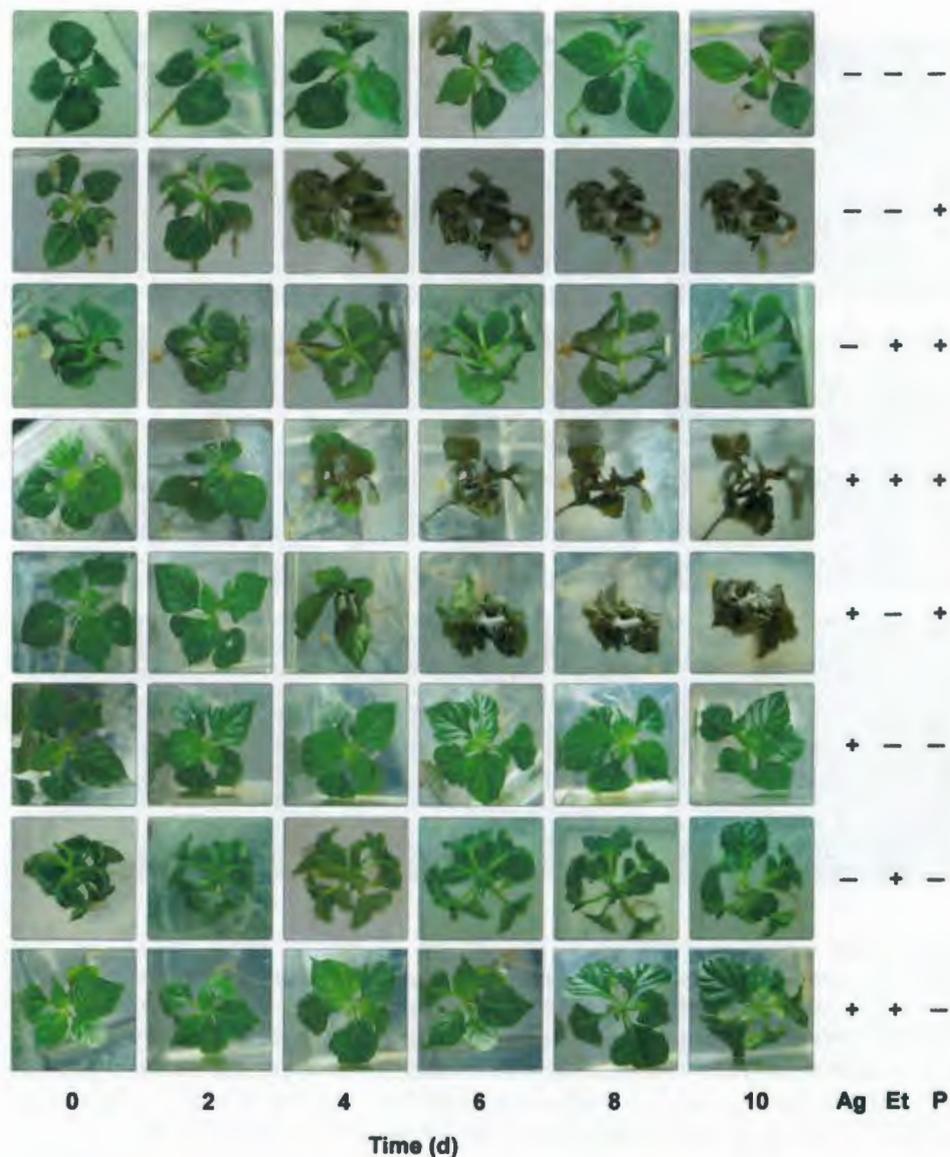


Figure 3.2. Effect of ethylene in the pepper resistance against *Phytophthora capsici*. One-month old Habanero pepper seedlings were sprayed with 300 μ M silver nitrate (Ag) or 5 mM ethephon (Et). 24 h later they were inoculated *in vitro* with *P. capsici* (P) and the disease symptoms were periodically evaluated. Control seedlings were sprayed with water.

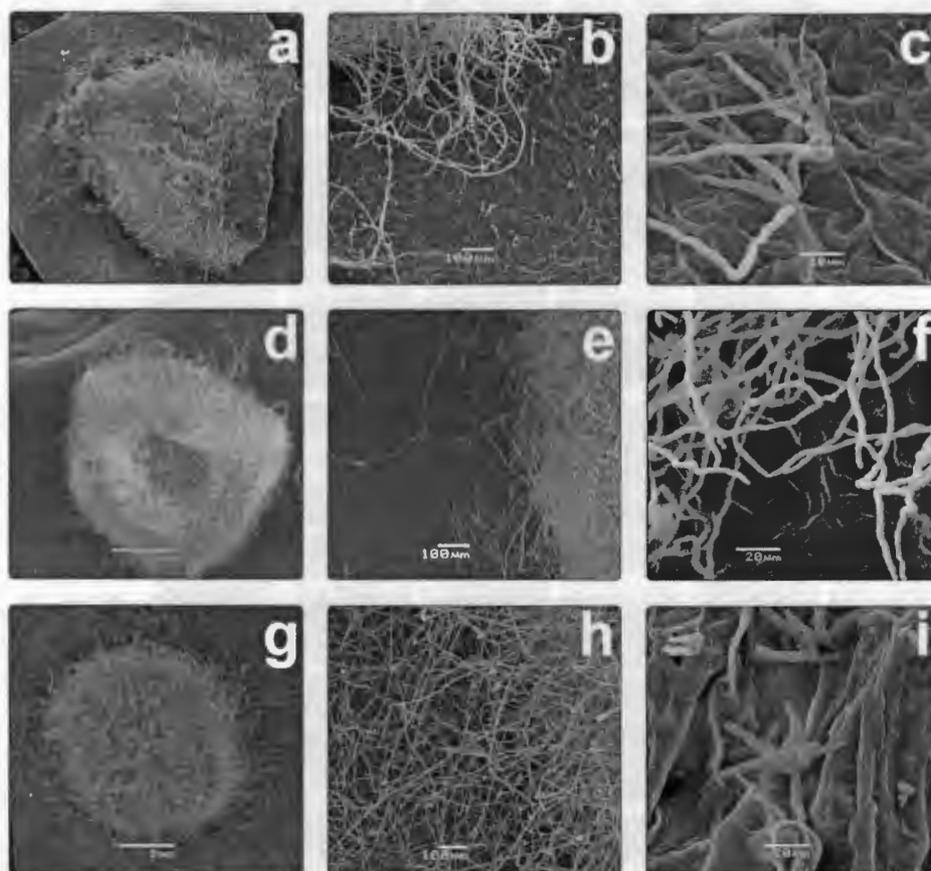


Figure 3.3. Effect of ethylene in the growth of *Phytophthora capsici* on the Habanero peppers leaves. Inoculated leaves of seedlings from the different treatments were detached and observed by scanning electron microscopy. Pepper leaves inoculated with *P. capsici* (a-c), pepper leaves sprayed with 5 mM ethephon, and then inoculated with *P. capsici* (d-f), pepper leaves sprayed with 300 μ M AgNO_3 and 5 mM ethephon, and then inoculated with *P. capsici* (g-i). Bars = 1mm (a, d, g), 100 μ m (b, e, h) or 20 μ m (c, f, i), respectively.

3.3.4.2 ENDOGENOUS ET DID NOT ACCUMULATE DURING THE PROGRESS OF PHYTOPHTHORA BLIGHT *in vitro*

Because the Habanero pepper seedlings used in this study were susceptible to PB but ET treatment prevented the establishment of the disease, it is possible that the production of endogenous ET is impaired during the infection of untreated seedlings. To assess this possibility, we measured the concentration of ET in the Magenta boxes during the progress of PB infection *in vitro* (Fig. 3.4). In the pepper seedlings inoculated with *P. capsici*, ET did not accumulate within the jars during the first 3 dpi, and only a slight accumulation occurred between 4 and 5 dpi (Fig. 3.4, black boxes). On the contrary, ET accumulated rapidly beginning at 1 dpi in seedlings that were treated with 5 mM ethephon (Fig. 3.4, open circles), regardless of whether they were previously sprayed with AgNO₃ (Fig. 3.4, black diamonds) or subsequently inoculated with *P. capsici* (Fig. 3.4, black circles). Under the ethephon treatments, the accumulation of ET reached a maximum between 3 and 4 dpi and then decreased gradually. In seedlings that were mock inoculated (Fig. 3.4, open boxes) or treated with 300 μM AgNO₃ (Fig. 3.4, open diamonds), there was no accumulation of ET during the whole observation period (0 to 5 d).

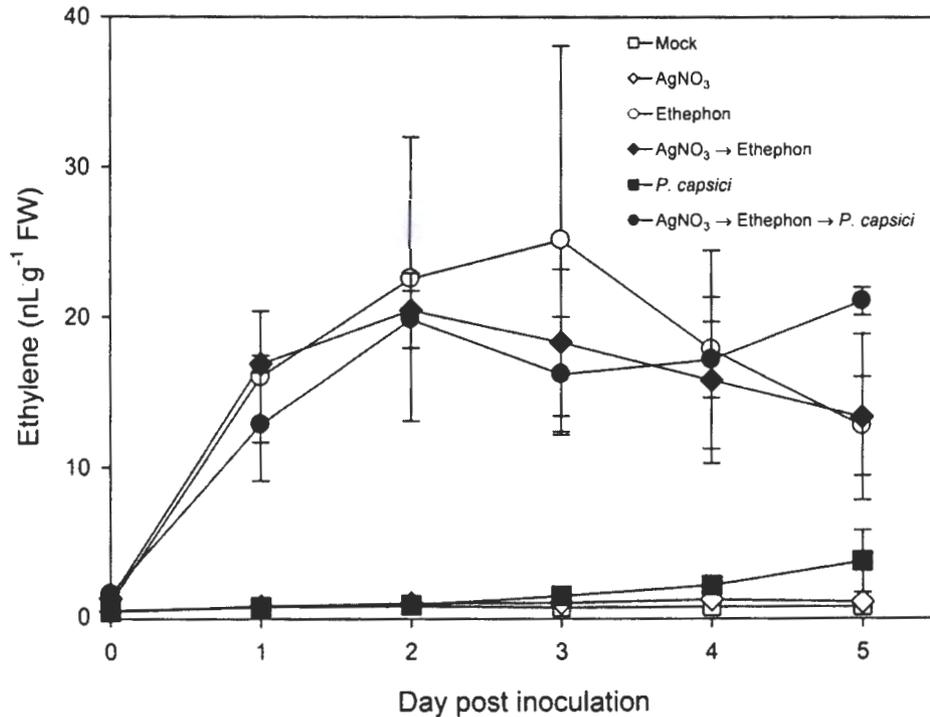


Figure 3.4. Accumulation of ethylene in Habanero pepper seedlings inoculated *in vitro* with *Phytophthora capsici*. One-month-old seedlings were sprayed with water, 300 μM AgNO_3 , 5 mM ethephon, and then mock inoculated or inoculated with *P. capsici*. All treatments were sequentially applied in 24 h intervals. After each treatment, 1 mL of the air in the jar were periodically sampled and analyzed by gas chromatography. Seedlings were mock inoculated (\square) (two PDA plugs were put on the leaves), sprayed with AgNO_3 (\diamond), sprayed with ethephon (\circ), sprayed with AgNO_3 and ethephon (\blacklozenge), sprayed with water and inoculated with *P. capsici* (\blacksquare), or sprayed with AgNO_3 and ethephon and inoculated with *P. capsici* (\bullet). Each point is the mean of three independent experiments with a single seedling, each. Bars represent standard error of means.

3.3.4.3 TOXIC EFFECTS OF ETHEPHON OR SILVER NITRATE WERE NOT RESPONSIBLE FOR THE INHIBITION OF THE MYCELIUM GROWTH *in planta*

To test whether toxic effects of the treatments with ethephon or AgNO_3 halted the mycelium spread *in planta*, the oomycete was cultivated on PDA plates directly in the presence of $300 \mu\text{M}$ AgNO_3 and/or 5mM ethephon. The addition of both chemicals to the culture medium, alone or in combination, delayed the growth of *P. capsici* dramatically, especially when added together, yet the growth was not completely inhibited (Fig. 3.5). Although the *in vitro* effect of ethephon might correlate with its capacity to block the establishment of the disease, the effects of AgNO_3 and the combination of AgNO_3 plus ethephon are indeed contrary to the results obtained *in planta*, as the mycelium spreading was optimal in seedlings sprayed with AgNO_3 and ethephon (compare Figs. 3.2 and 3.3 with Fig. 3.5). Thus, we could discard the possibility that a toxic effect of the chemical treatment was responsible for inhibiting the growth of the pathogen.

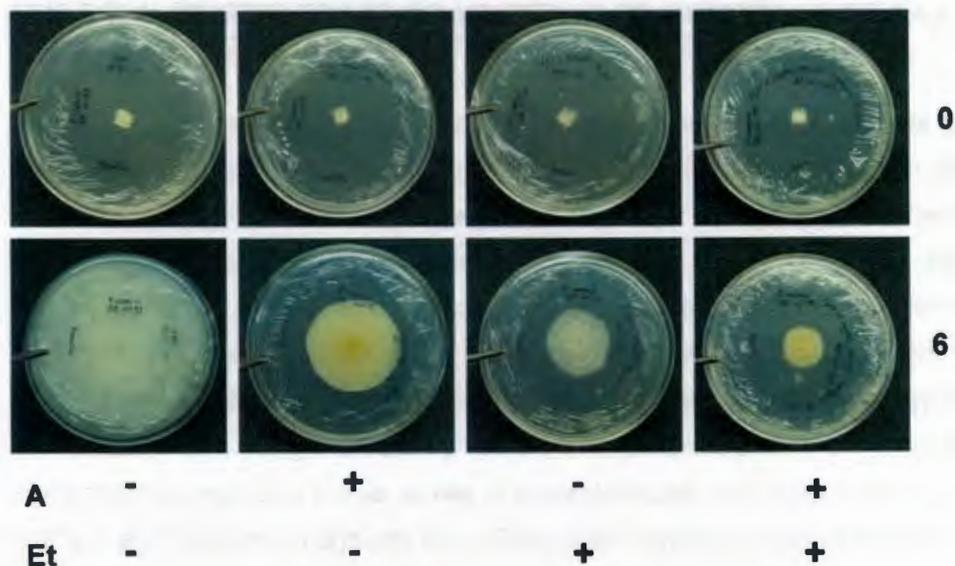


Figure 3.5. Effect of $AgNO_3$ and ethephon on the *Phytophthora capsici* growth in vitro. Mycelium pieces (0.5 cm^2) were seeded onto PDA plates containing $AgNO_3$ and ethephon and the growth was periodically monitored.

3.3.4.4 THE ETHEPHON TREATMENT MODIFIED THE EXPRESSION OF DEFENCE-RELATED GENES IN HABANERO PEPPER SEEDLINGS

In previous studies, the inoculation of pepper seedlings with *P. capsici* induced the expression of two MAPK genes (CcMPK1 and CcMPK2), whereas the expression of several defence-related genes was either not modified, like NPR1 and WRKY, or even slightly reduced, like PR10 and esterase homologues (Nakazawa *et al.*, 2010). To gain insight into the regulation of the defence pathway induced by ET, we then performed qRT-PCR to quantify the transcript levels of the PR1 and PDF1.2 genes, which are molecular markers for SAR and ISR, respectively. Both genes were induced by ethephon, but the expression of PDF1.2 was even higher when the ET perception was blocked, which suggests a non-specific effect (Fig. 3.6). Induction of PR1 occurred long after the

ethephon spraying (48 to 72 h). ET specifically induced the ACC oxidase gene (used as a marker for ET perception), but it did not modify the expression of NPR1 (Fig. 3.6).

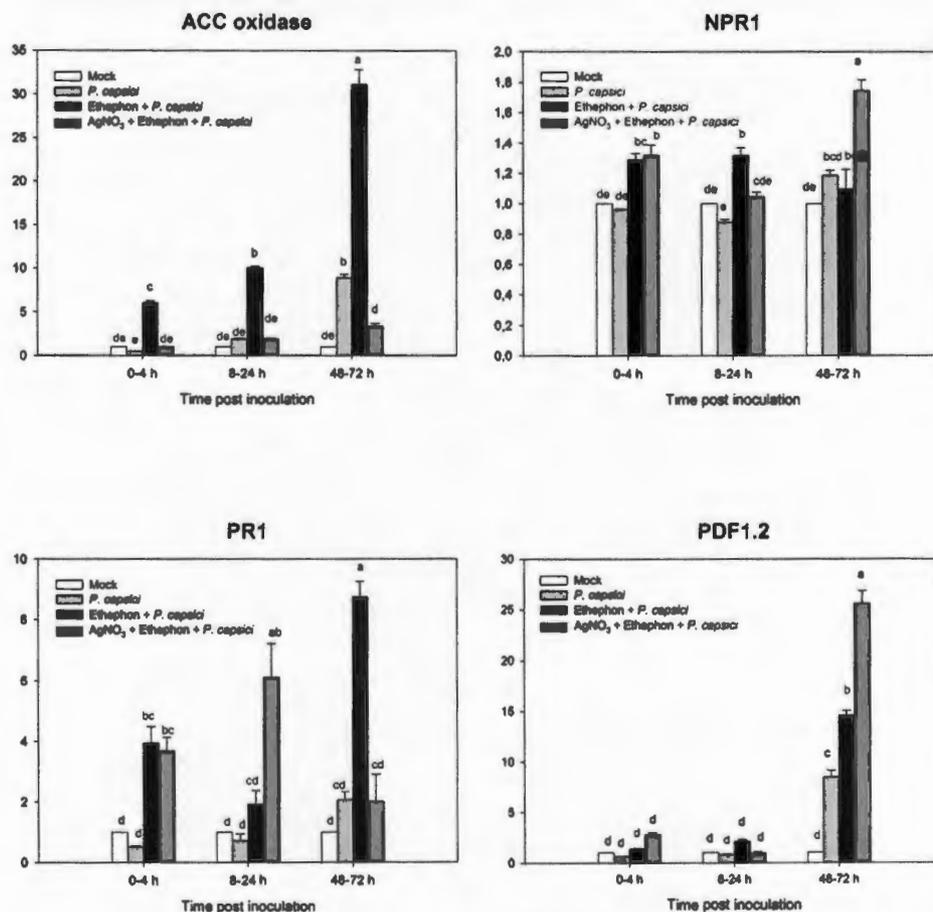


Figure 3.6. Effect of ethylene in the gene expression of defence molecular markers. Three micrograms pools of cDNA from three seedlings under the different treatments were amplified by qPCR with gene specific primers for ACC oxidase, NPR1, PR1 and PDF1.2 genes. As control, seedlings were inoculated with an agar plug (mock). Fold changes in gene expression were based on the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Actin was used for normalization of each transcript. Vertical bars indicate standard errors from three independent amplifications. Columns with different letters differ significantly according to Tukey's multiple range test ($P \leq 0.05$).

3.3.5 DISCUSSION

With few exceptions (Gil-Ortega *et al.*, 1991), most of the species within the genus *Capsicum* are susceptible to the lethal disease Phytophthora Blight. Different strategies have been used in attempts to dissect the genetic nature of the resistance, to investigate its biochemical and molecular regulation, and to identify the hormonal signalling network involved in the resistance response. A different approach, which has been used to study the regulation of defence against PB, involves the use of biotic and abiotic elicitors to induce systemic resistance in susceptible pepper cultivars (Ahmed *et al.*, 2000; Baysal *et al.*, 2005). However, despite the efforts to understand the basis of the compatibility between pepper species and *P. capsici*, the mechanisms by which this pathogen blocks the defence response are not clear.

In the present work, we carried out PB challenge experiments with pepper seedlings *in vitro* based on two general considerations. First, we wanted to avoid the interference of biotic or abiotic environmental stresses, as a casual induction of systemic responses could mask the results. Second, because there is a direct correlation between the age of the pepper plants and their response to PB (Kim *et al.*, 1989), it is possible that physical barriers and the history of the plant's interaction with its environment contribute to the resistant phenotype; thus, we believed that the inoculation of young seedlings could offer a clear cause-and-effect response.

The results revealed that spraying with ET Habanero pepper seedlings clearly induced a resistance response against PB, delaying the appearance of symptoms by more than 10 days and halting the infection in 30% of the seedlings. Even though more experiments are needed to determine the basis of this heterogeneous induction of defence against *P. capsici*, the irregular kinetics of the ET release after the spraying with ethephon (note the standard errors in Fig. 3.4) might have an important contribution to the resistance phenotype. In

this respect, the existence of ET mutants in peppers would help to conduct clearer experiments. Nonetheless, the electron micrographs showed that whenever the ethephon treatment induced a resistance phenotype, a clear inhibition of both the mycelium penetration and dispersion was produced, yet the mycelium viability was not affected noticeably (Fig. 3.3d-f). The use of AgNO₃ to block the ethylene receptor confirmed an ethylene-specific effect in the host. These results positively suggest that an active plant response induced by ET inhibited the oomycete growth and its ability to penetrate the leaf surface, and it is possible that both responses were decisive to prevent tissue infection by *P. capsici*.

The Habanero pepper response to ET is consistent with other reports in which a positive effect of ET on the resistance of *Solanum lycopersicum* to *P. capsici* was reported (Francia *et al.*, 2007). Interestingly, in this report, the authors found that ET had a negative effect against *Fusarium oxysporum*, which is in agreement with recent findings by our group indicating that spraying with ethephon reversed the natural resistance of Habanero peppers to a local strain of *F. oxysporum* (Núñez-Pastrana, unpubl.). These coincident results support our proposal that ET induced a systemic response against *P. capsici* and also suggest that the signalling networks of defence are conserved within the Solanaceae family.

In plants, a network of PGR coordinates the establishment of the main systemic responses. SA mediates the establishment of SAR during the plant interaction with pathogens, and ET and MeJA are involved in the development of ISR during the plant interaction with non-pathogenic microorganisms (Van Loon *et al.*, 1998). Thus, the fact that ET induced a systemic response in Habanero pepper might imply the involvement of an ISR rather than a SAR response. This assumption is reinforced by the fact that the ET levels showed a modest increase within 4 dpi with *P. capsici*, when all seedlings were completely infected. Conversely, in the ethephon-treated seedlings, there was a nearly ten-

fold increase within the first 24 h after inoculation that rose to almost 20 fold and remained at that level for at least five days.

A qRT-PCR evaluation of defence gene markers revealed that the application of ET to Habanero pepper seedlings induced the expression of PDF1.2, a molecular marker for ET and MeJA. However, because the expression of this gene was higher in the AgNO₃-treated seedlings (that ultimately died), it is likely that PDF1.2 did not contribute to the resistance induced by ET. On the contrary, it induced the expression of PR1, a broadly accepted molecular marker for SAR. In addition, the ET treatment barely induced the expression of the NPR1 homologue; thus, the expression of PR1 seemed to be independent of NPR1. The pivotal role of NPR1 in switching between the ET, JA and SA signalling pathways relies on its cytosolic activation (Spoel *et al.*, 2003); however, gene expression of NPR1 is also positively regulated during the activation of plant defence responses (Yu *et al.*, 2001). In fact, PR1 has both NPR1-dependent and NPR1-independent expression (Shah *et al.*, 2001). Furthermore, there are examples of the NPR1-independent induction of PR1 by ET (Kim & Hwang, 2000). Additionally, the regulation of basic PR1 genes by ET has been demonstrated in different species, including *Nicotiana tabacum* (Eyal *et al.*, 1993), and especially in *Arabidopsis thaliana*, where the promoters of PR1 genes have MeJA-responsive elements (Santamaria *et al.*, 2001). In our study, the highest expression of PR1 occurred at relatively late times after inoculation (48 and 72 h). These results are in agreement with other reports in the Solanaceae family, where the resistance against oomycetes depended on the late expression of PR1 (van't Klooster *et al.*, 1999). The deduced amino acid sequence of the *Capsicum chinense* PR1 cDNA analysed in this study shares 97% identity with a basic PR1 protein from *Solanum tuberosum* (Supplementary Material 2) (Hoegen *et al.*, 2002).

In some cases, the expression of PR genes has been associated with the chemical induction of systemic resistance (Baysal *et al.*, 2005). However, in

others, such as *A. thaliana*, the use of PR genes as molecular markers has revealed that the resistance induced by BABA is independent of PRs (Jakab *et al.*, 2001). We found that PR1 is induced by ET in coincidence with the establishment of a defence response.

In recent years, evidence from Phytophthora species has indicated that pathogen effectors manipulate plant defence responses after their translocation into the host cytoplasm (Whisson *et al.*, 2007). The members of the genus Phytophthora possess apoplastic and cytoplasmic effectors that are sufficient to trigger systemic resistance in their hosts (Kamoun *et al.*, 1997). For instance, *P. capsici* possesses capsicein, a member of the α -class elicitors that has been shown to induce protection of tobacco against *P. nicotianae* (Ricci *et al.*, 1989). *P. capsici* also possesses phospholipase-like proteins with significant similarity in their amino termini to capsicein (Nespoulous *et al.*, 1999). Thus, although it is possible that peppers are able to recognise different effectors during their interaction with *P. capsici*, the oomycete must effectively block the establishment of a defence response. This hypothesis implies that if the correct signalling pathway is activated at the right time, the host systemic response should make the cell metabolism refractory to further manipulation by the pathogen. Our results demonstrated that in the *C. chinense*-*P. capsici* pathosystem, the previous application of ET activated a systemic response that prevented infection by the pathogen, probably through an NPR1-independent mechanism. Thus, it is possible that components of the signalling pathway activated by ET are targets of the oomycete effectors; this is supported by the fact that in Habanero pepper ET levels did not rise significantly during the normal course of the infection. In addition, because treatment with ET reversed the natural resistance of Habanero pepper to *F. oxysporum*, the response activated by ET could be specific to some pathogens, but it could also be antagonistic to the defence responses devoted to other pathogens.

Finally, although the role of JA has been suggested to be crucial in the establishment of the defence of *C. annuum* against *P. capsici* (Ueeda *et al.*, 2006), the results from our model suggest that ET, rather than SA or JA, is the key phytohormone involved in restricting PB in Habanero pepper.

3.3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Q. Angela Kú Gonzalez for technical assistance in obtaining the scanning electron micrographs, and Dr. Felipe Barahona Pérez for technical assistance in the ethylene measurements. This project had funding from CONACYT grant P48831. RNP and GFAO gratefully acknowledge CONACYT for the scholarships 208245 and 56153, respectively.

3.3.7 REFERENCES

- Ahmed, S. A., C. Pérez and M. E. Candela (2000). *Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (Capsicum annuum) to Phytophthora capsici using Trichoderma harzianum and its relation with capsidiol accumulation*. European Journal of Plant Pathology, 106, 817–824.
- Arcos-Ortega, G. F., R. A. Chan-Kuuk, W. A. González-Kantún, R. Souza-Perera, Y. E. Nakazawa-Ueji, E. Avilés-Berzunza, G. Godoy-Hernández, M. A. Lawton and J. J. Zúñiga-Aguilar (2010). *Agrobacterium tumefaciens-transient genetic transformation of Habanero pepper (Capsicum chinense Jacq.) leaf explants*. Electronic Journal of Biotechnology, 13, 7-8.
- Baysal, Ö., C. Turgut and G. Mao (2005). *Acibenzolar-S-methyl induced resistance to Phytophthora capsici in pepper leaves*. Biologia Plantarum, 49, 599-604.
- Beyer, E. M. (1976). *A potent inhibitor of ethylene action in plants*. Plant Physiology, 58, 268-271.
- Clarke, J. D., Y. Liu, D. F. Klessig and X. Dong (1998). *Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant Arabidopsis cpr6-1 mutant*. The Plant Cell, 10, 557-569.
- Eyal, Y., Y. Meller, S. Lev-Yadun and R. Fluhr (1993). *A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression*. The Plant Journal, 4, 225-234.
- Francia, D., D. Demaria, O. Calderini, L. Ferraris, D. Valentino, S. Arcioni, G. Tamietti and F. Cardinale (2007). *Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection*. Plant, Cell and Environment, 30, 1357-1365.
- Gil-Ortega, R., C. Palazón-Español and J. Cuartero-Zueco (1991). *Genetics of resistance to Phytophthora capsici in the Mexican pepper SCM-334*. Plant Breeding, 107, 50-55.
- Hoegen, E., A. Strömberg, U. Pihlgren and E. Kombrink (2002). *Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato*. Molecular Plant Pathology, 3, 329-345.
- Jakab, G., V. Cottier, V. Toquin, G. Rigoli, L. Zimmerli, J. P. Métraux and B. Mauch-Mani (2001). *B-Aminobutyric acid-induced resistance in plants*. European Journal of Plant Pathology, 107, 29-37.
- Kamoun, S. (2006). *A Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes*. Annual Review of Phytopathology, 44, 41-60.

- Kamoun, S., H. Lindqvist and F. Govers (1997). *A novel class of elicitor-like genes from Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 10, 1028–1030.
- Kim, Y. J. and B. K. Hwang (2000). *Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible*. *Physiologia Plantarum*, 108, 51–60.
- Kim, Y. J., B. K. Hwang and K. W. Park (1989). *Expression of age-related resistance in Pepper plants infected with Phytophthora capsici*. *Plant Disease*, 73, 745-747.
- Kreutzer, W. A., E. W. Bodine and L. W. Durrell (1940). *Cucurbit diseases and rot of tomato fruit caused by Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 30, 972-976.
- Lawton, K. A., S. L. Potter, S. Uknes and J. Ryals (1994). *Acquired resistance signal transduction in Arabidopsis is ethylene independent*. *The Plant Cell*, 6, 581-588.
- Leonian, L. H. (1922). *Stem and fruit blight of pepper caused by Phytophthora capsici species nov.* *Phytopathology*, 12, 401-408.
- Nakazawa-Ueji, Y. E., R. Núñez-Pastrana, R. A. Souza-Perera, N. Santana-Buzzy and J. J. Zúñiga-Aguilar (2010). *Mycelium homogenates from a virulent strain of Phytophthora capsici promote a defence-related response in cell suspensions from Capsicum chinense*. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 403-415.
- Nespoulous, C., O. Gaudemer, J. C. Huet and J. C. Pernollet (1999). *Characterization of elicitor-like phospholipases isolated from Phytophthora capsici culture filtrate*. *FEBS Letters*, 452, 400-406.
- Palloix, A., A. M. Daubeze, T. Phaly and E. Pochard (1990). *Breeding transgressive lines of pepper for resistance to Phytophthora capsici in a recurrent selection system*. *Euphytica*, 51, 141-150.
- Pieterse, C. M. J. and L. C. Van Loon (1999). *Salicylic acid-independent plant defence pathways*. *Trends in Plant Sciences*, 4, 52-58.
- Ricci, P., P. Bonnet, J. C. Huet, M. Sallantin, F. Beauvais-Cante, M. Bruneteau, V. Billard, G. Michel and J. C. Pernollet (1989). *Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco*. *European Journal of Biochemistry*, 183, 555-563.
- Ristaino, J. B., R. P. Larkin and C. L. Campbell (1993). *Spatial and temporal dynamics of Phytophthora epidemics in commercial bell pepper fields*. *Phytopathology*, 83, 1312-1320.

- Santamaria, M., C. J. Thomson, N. D. Read and G. J. Loake (2001). *The promoter of a basic PR1-like gene, AtPRB1, from Arabidopsis establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate*. *Plant Molecular Biology*, 47, 641-652.
- Shah, J., P. Kachroo, A. Nandi and D. F. Klessig (2001). *A recessive mutation in the Arabidopsis SSI2 gene confers SA- and NPR1-independent expression of PR genes and resistance against bacterial and oomycete pathogens*. *The Plant Journal*, 25, 563-574.
- Spoel, S. H., A. Koornneef, S. M. C. Claessens, J. P. Korzelius, J. A. Van Pelt, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. P. Métraux, R. Brown, K. Kazan, L. C. Van Loon, X. Dong and C. M. J. Pieterse (2003). *NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defence pathways through a novel function in the cytosol*. *The Plant Cell*, 15, 760-770.
- Sugita, T., K. Yamaguchi, T. Kinoshita, K. Yuji, Y. Sugimura, R. Nagata, S. Kawasaki and K. A. Todoru (2006). *QTL analysis for resistance to Phytophthora blight (Phytophthora capsici Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of Capsicum annuum*. *Breeding Science*, 56, 137-145.
- Sunwoo, J. Y., Y. K. Lee and B. K. Hwang (1996). *Induced resistance against Phytophthora capsici in pepper plants in response to DL-B-amino-n-butyric acid*. *European Journal of Plant Pathology*, 102, 663-670.
- Ueeda, M., M. Kubota and K. Nishi (2006). *Contribution of jasmonic acid to resistance against Phytophthora blight in Capsicum annuum cv. SCM334*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 149-154.
- Van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker and C. M. J. Pieterse (1998). *Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria*. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Van't Klooster, J. W., V. G. A. A. Vleeshouwers, S. Kamoun and F. Govers (1999). *Characterization of a cDNA encoding a pathogenesis-related protein PR1 from potato (Solanum tuberosum) (Accession No. AJ250136) (PGR99-182)*. *Plant Physiology*, 121, 1384.
- Whisson, S. C., P. C. Boevink, L. Moleleki, A. O. Avrova, J. Morales, E. M. Gilroy, M. R. Armstrong, S. Grouffaud, P. van West, S. Chapman, I. Hein, I. K. Toth, L. Pritchard and P. R. J. Birch (2007). *A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins inside host plant cells*. *Nature*, 450, 115-118.
- Yu, D., C. Chen and Z. Chen (2001). *Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression*. *The Plant Cell*, 13, 1527-1539.

Capítulo 4

Discusión general

Las plantas al ser organismos sésiles dependen de la activación de una amplia diversidad de rutas de señalización que le van a permitir responder a un sin número de estímulos exteriores. El papel que desempeñan las fitohormonas como moléculas señalizadoras está bien establecido, y se sabe que su participación es importante durante el crecimiento y el desarrollo de la planta, pero además su función es crucial para que la planta responda a diversos tipos de estrés. En este trabajo se exploró una de las facetas que tiene el ET en dos patosistemas distintos: chile habanero- *F. oxysporum* y chile habanero- *P. capsici*. Los resultados permiten sugerir que la ruta de señalización que induce la respuesta de defensa contra cada uno de los patógenos es distinta. En el caso de *P. capsici*, los resultados sugieren que el ET desempeña un papel importante para que se establezca la respuesta de defensa, mientras que con *F. oxysporum*, el ET favorece el desarrollo de la enfermedad.

Se ha observado que las vías de señalización mediadas por el JA y el ET actúan de manera antagónica con la vía de señalización mediada por el SA en una variedad de modelos (Kunkel & Brooks, 2002; Li *et al.*, 2004). Sin embargo, al obtenerse más información se ha observado que el postulado anterior no es tan simple como se creía, y que la intrincada interacción que se presenta entre estas fitohormonas es bastante compleja (Brodersen *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007).

NPR1 es un punto modulador en las tres vías de señalización y es inducido por las tres fitohormonas bajo circunstancias distintas: el JA y el ET inducen la actividad de NPR1 durante la ISR (resistencia inducida por bacterias de la rizósfera no patogénicas), mientras que el SA lo hace durante la SAR (resistencia inducida por microorganismos patogénicos).

En el modelo propuesto de la interacción chile habanero- *P. capsici*, es posible que el oomiceto tenga la capacidad de inhibir en algún punto la ruta de señalización de defensa en la planta efectiva contra él; sin embargo, cuando las plántulas son previamente tratadas con ET, al parecer se induce una resistencia semejante a la ISR, la cual es capaz de contrarrestar el ataque por *P. capsici*. Los resultados demostraron que esta respuesta de defensa no parece estar mediada por NPR1, por lo menos a nivel transcripcional. A diferencia de PR1, cuya transcripción aumentada en los tiempos tardíos de la interacción (48-72 h post inoculación) parece ser fundamental para que se establezca una respuesta de defensa en las plántulas de chile habanero contra el oomiceto.

Por el contrario, en la interacción chile habanero- *F. oxysporum*, se indujo la expresión de NPR1, sugiriendo que su participación es importante en el establecimiento de la respuesta de defensa; sin embargo, cuando las plántulas se asperjaron con etefón, también se indujo la expresión de NPR1, pero en este caso la planta fue susceptible al ataque por el hongo. Por lo tanto, los resultados sugieren que la función de NPR1 es distinta en ambos casos. A esto, es importante considerar que la función de NPR1 es regulada por modificaciones post-traduccionales, las cuales influyen en el sitio donde se va a localizar la proteína y la función que ésta va a desempeñar.

En el caso de las MAPKs, su expresión se indujo cuando la planta presentó un nivel alto de tolerancia al hongo, y su inhibición mediada por el ET dio lugar a la susceptibilidad. Esto parece implicar que la expresión de las MAPKs es importante para que se establezca la ruta de defensa contra *F. oxysporum*.

Los resultados anteriores contrastan con los obtenidos en la interacción chile habanero-*P. capsici*, en donde la inducción de la expresión de las MAPKs por la inoculación con el oomiceto coincidió con la respuesta susceptible de la planta, y al inhibirse la expresión de éstas mediante el tratamiento con ET, la planta adquirió un nivel de tolerancia contra este microorganismo patogénico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Nakazawa-Ueji (2010), en donde se

analizó la activación de dos MAPKs en células en suspensión de chile habanero, y se determinó que había inducción en su actividad cuando las células eran tratadas con homogenizados de la pared celular de *P. capsici*. Los datos anteriores demuestran a pesar de que se detecta el patógeno y se induce la expresión y actividad de dos MAPKs, esta respuesta no es suficiente para que se establezca la defensa. Esto podría explicarse de dos maneras: una, que su función podría ser como reguladores negativos de la respuesta de defensa, o dos, que su participación no es determinante para este proceso.

La función diferencial que tienen las MAPKs en ambas interacciones se podría explicar considerando los niveles de intercomunicación que se presentan en las cascadas de señalización de éstas, en donde dependiendo del "complejo de andamiaje" formado, es decir, dependiendo de la MAPKKK y la MAPKK que se encuentren corriente arriba activando a la MAPK, será el grupo de proteínas blanco activadas por ésta. Estos complejos de andamiaje están poco caracterizados en plantas. En *Arabidopsis*, el ejemplo más conocido es el de la activación de la cascada MAPK inducida por la flagelina (proteína presente en el flagelo de las bacterias), la cual es percibida por un receptor tipo cinasa que a su vez activa a la cascada: AtMEKK1- MKK4/5- MAPK3/6, la cual activa a los factores de transcripción WRKY22 y WRKY29, quienes finalmente inducen la expresión de los genes de defensa (Asai *et al.*, 2002). En tabaco (*Nicotiana tabacum*) se han identificado algunos de los componentes de la cascada de MAPK que responden a varios estímulos, como el ataque por patógenos y las heridas. La percepción del estímulo activa la cascada: MAPKKK- NtMEK2- NtSIPK/WIPK, la MAPK WIPK fosforila y activa al factor de transcripción NtWIF que induce la expresión de un grupo diverso de genes de respuesta a estrés biótico, así como otros que participan durante el desarrollo de la planta (Chung & Sano, 2008).

Algunas MAPKs actúan como reguladores negativos de la defensa, como en el caso de la MAPK4 de *A. thaliana* que inhibe la expresión de genes de defensa

de respuesta al SA y por ende, el establecimiento de la SAR. La MAPK4 se requiere también para la expresión de genes de respuesta al JA y el ET (Petersen *et al.*, 2000; Brodersen *et al.*, 2006). La MAPK4 de *A. thaliana* participa pues durante el antagonismo que se presenta en las vías de señalización mediadas por el ET/JA y por el SA. Estos datos demuestran cómo las cascadas de MAPK pueden desempeñar papeles cruciales dentro de la intercomunicación entre las fitohormonas.

El hecho de que las MAPKs estén posiblemente actuando de manera positiva en el establecimiento de la defensa en un patosistema (chile habanero-*F. oxysporum*) y de manera negativa en el otro (chile habanero-*P. capsici*) podría explicarse en el hecho de que las MAPKs estén fosforilando blancos distintos, como consecuencia de su regulación a través de complejos multiprotéicos de andamiaje distintos para cada caso, lo que originaría una respuesta diferente en la planta.

Por último, es muy importante considerar que los resultados obtenidos apuntan a una regulación al nivel transcripcional. Aunque este nivel es muy importante, aquellos a nivel traduccional y post-traduccional son también determinantes para que se presente una respuesta específica en la planta.

4.1 MODELOS PROPUESTOS DE LOS PATOSISTEMAS *C. chinense*-*F. oxysporum* Y *C. chinense*-*P. capsici*

Los modelos propuestos en este capítulo se basan en los resultados obtenidos al evaluar el efecto que tiene el ET sobre las dos interacciones planta-patógeno analizadas.

En las plántulas que fueron inoculadas con el hongo (*F. oxysporum*) se indujo la expresión de genes de respuesta a estrés, incluido NPR1 (Fig. 4.1), y éstas presentaron resistencia frente al ataque; sin embargo, cuando éstas fueron asperjadas previamente con etefón y luego inoculadas con el hongo la expresión de NPR1 se redujo, y la expresión de los 7 genes de respuesta a estrés (glutación peroxidasa, metalotioneína, ω -6 desaturasa 1 y 2, y las MAPK 1, 2 y 3) que se había observado con la simple inoculación fue nula, resultando en la susceptibilidad de las plántulas. Esto permite sugerir que la ruta de defensa efectiva contra *F. oxysporum* en el chile habanero está mediada por una fitohormona diferente al ET, posiblemente por el SA.

En el modelo de interacción *C. chinense*-*P. capsici* se propone que la inoculación con el oomiceto induce la expresión de algunos genes de respuesta a estrés y de defensa, sugiriendo que se implementa una defensa basal insuficiente para restringir el ataque por el patógeno. En el modelo se sugiere que el ET desempeña una función importante en el establecimiento de la respuesta de defensa de la planta, que requiere de la participación de PR1 y es independiente de NPR1 (Fig. 4.2). No se sabe si el SA participa en la inducción de la expresión de PR1, lo que contribuiría al establecimiento de la respuesta de defensa; sin embargo, resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que ni el SA, ni tampoco el JA están involucrados en la respuesta de defensa mediada por el ET contra *P. capsici*. La inducción de la expresión de PDF1.2 no fue acorde con el estado de resistencia de la planta, lo que parece sugerir que esta proteína no participa en la respuesta de defensa del chile habanero contra *P. capsici* bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. En este patosistema, se observó que las MAPKs son inducidas por la inoculación con el oomiceto, pero son reprimidas con el tratamiento con etefón, lo que resultó en la muerte o la sobrevivencia de la planta, respectivamente.

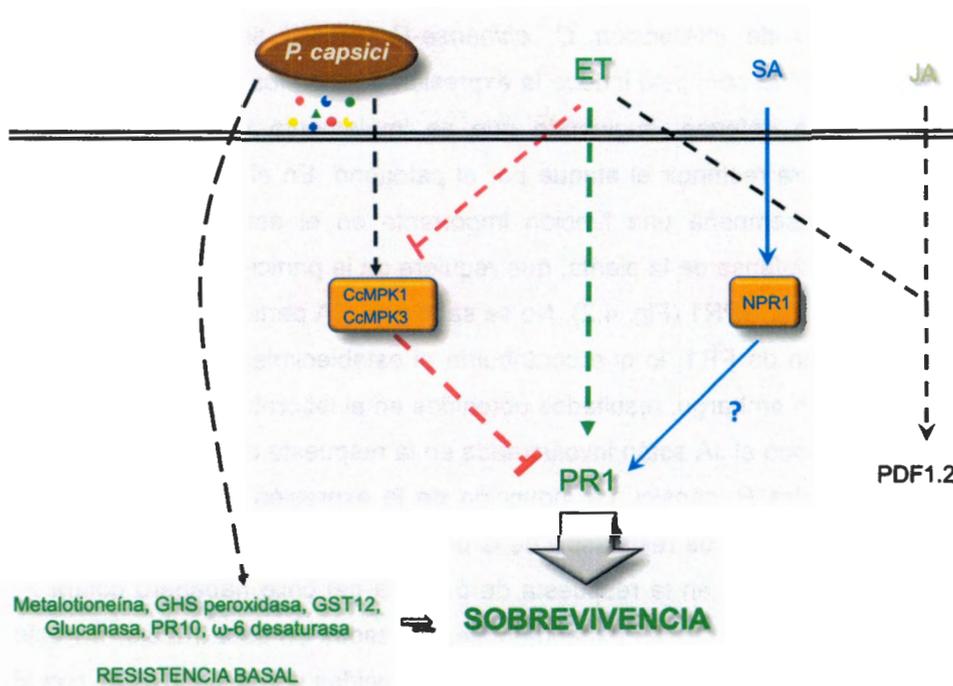


Figura 4.2. Modelo propuesto de la interacción *C. chinense*-*P. capsici*. En el modelo se propone que *P. capsici*, por medio de moléculas efectoras excretadas, enciende una respuesta de defensa basal que no es suficiente para que la planta sobreviva. Se sugiere que el ET le confiere resistencia al chile habanero contra *P. capsici* de manera dependiente de PR1 e independiente de NPR1. Sin embargo, la participación del SA en la expresión de PR1 no se ha documentado para este patosistema. La participación de PDF1.2 no se considera determinante para que se dé la respuesta de defensa mediada por el ET. La participación de las MAPKs podría darse como reguladores negativos de la respuesta de defensa, así como el ET tiene la capacidad de reprimirla. Las flechas indican una regulación positiva, las líneas trunçadas (marcadas en rojo) regulación negativa. Las líneas punteadas indican que se desconoce cuántos componentes podrían estar participando en la ruta de señalización.

4.2 REFERENCIAS

- Asai, T., G. Tena, J. Plotnikova, M. R. Willmann, W. L. Chiu, L. Gomez-Gomez, T. Boller, F. M. Ausubel and J. Sheen J (2002). *MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity*. Nature, 415, 977-983.
- Brodersen, P., M. Petersen, H. B. Nielsen, S. Zhu, M. A. Newman, K. M. Shokat, S. Rietz, J. Parker and J. Mundy (2006). *Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4*. The Plant Journal, 47, 532-546.
- Chung, K. M. and H. Sano (2008). *Finding a missing link in MAP kinase cascade*. Plant Signaling and Behavior, 3(8), 606-608.
- Kunkel, B. N. and D. M. Brooks (2002). *Cross talk between signaling pathways in pathogen defense*. Current Opinion in Plant Biology, 5, 325-331.
- Li, J., G. Brader and E. T. Palva (2003). *The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense*. The Plant Cell, 16, 319-331.
- Mao, P., M. Duan, C. Wei and Y. Li (2007). *WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression*. Plant Cell Physiology, 48(6), 833-842.
- Nakazawa-Ueji, Y. E. (2010). *Efectos de homogenados fúngicos sobre la vía de transducción de señales mediada por MAPKs en Capsicum chinense Jacq*. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.
- Petersen, M., P. Brodersen, H. Naested, E. Andreasson, U. Lindhart, B. Johansen, H. B. Nielsen, M. Lacy, M. J. Austin, J. E. Parker, S. B. Sharma, D. F. Klessig, R. Martienssen, O. Mattsson, A. B. Jensen and J. Mundy (2000). *Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance*. Cell, 103, 1111-1120.

CAPÍTULO 5

PERSPECTIVAS

La marchitez del chile causada en prácticamente todas las especies del género *Capsicum* por el oomiceto *Phytophthora capsici* ha sido tema de investigación científica por décadas, sin que a la fecha se conozcan los mecanismos por medio de los cuales el patógeno manipula los sistemas de defensa de sus hospedantes. Como resultado del presente proyecto, se consiguió establecer un modelo para estudiar la respuesta de defensa en plántulas de chile habanero en contra de la infección por *Phytophthora capsici*, mediante la aplicación exógena de ET, así como la reversión de este fenómeno mediante el bloqueo del receptor de ET. Por lo que, éste constituye una extraordinaria herramienta de investigación para poder entender los mecanismos que subyacen en la interacción molecular entre ambos organismos.

Se ha demostrado que en la respuesta de defensa se hallan involucrados la bien conocida ruta de transducción de señales eucariótica constituida por las MAPKs, y el regulador transcripcional NPR1. El uso de marcadores moleculares de las respuestas sistémicas de defensa apunta hacia un tipo de SAR, pero que no está mediada por el SA, ni por la proteína NPR1. Este tipo de señalización/activación no es el típico, pero existen otros ejemplos de esto en la literatura.

Con base en estos resultados surge una serie de posibilidades, entre las que se pueden encontrar las siguientes:

1. Sería de suma importancia poder determinar la identidad de las MAPKK y las MAPKKK río arriba en la cascada de señalización, que activan a CcMPK1 y CcMPK3. El conocimiento de los elementos río arriba de las MAPK puede permitir el diseño de estrategias para identificar las proteínas del patógeno que activan esta ruta de señalización, lo cual es crucial para poder generar especies resistentes a esta enfermedad. Además, la

identificación de los sustratos nucleares permitiría saber cuáles genes son los blancos primarios de la activación de esta ruta de señalización. Los ensayos de retardamiento en gel de electroforesis serían muy útiles para la identificación de factores transcripcionales activados por las MAPK.

2. A pesar de que la transcripción de NPR1 no se vió modificada durante la interacción chile habanero-*P. capsici*, sería muy importante determinar si la actividad de esta proteína es diferente en las plantas susceptibles, al compararlas con aquellas asperjadas con etefón y que presentan una alta tolerancia al ataque por el oomiceto. Este tipo de estudios se han llevado a cabo en otras especies, construyendo proteínas mutantes que tienen modificadas las regiones que le permiten trasladarse al núcleo, y de esta manera, estudiar el efecto de esta modificación sobre la respuesta de defensa de la planta.
3. En cuanto a la interacción entre el chile habanero y *F. oxysporum*, sería fundamental evaluar si la respuesta de defensa que la planta presenta de manera natural está mediada por otras fitohormonas, como el SA o el JA, así como la expresión de un grupo de genes utilizando los ADNc que no se evaluaron en este estudio.
4. Para continuar con el estudio del papel que desempeña el ET en el establecimiento de la defensa contra *P. capsici*, se debería contar con plantas mutantes que presenten niveles modificados de la síntesis o la percepción de ET, para evitar de esta manera el uso de compuestos químicos como el etefón y el nitrato de plata, los cuales pueden poseer efectos colaterales no evidentes.
5. Finalmente sería muy importante determinar si los resultados obtenidos en los análisis de expresión génica, corresponden a la actividad de las respectivas proteínas, de esta manera se tendría un panorama más amplio de su participación en ambos patosistemas.

DATOS COMPLEMENTARIOS

CURVA DE CALIBRACIÓN DE ETILENO

La curva de calibración se realizó inyectando 1 mL de ET en un matraz aforado de 1 L que contenía bolitas de papel aluminio, que al agitar permitieron mezclar el ET con el aire presente en el matraz. Se cerró herméticamente el matraz y se agitó por 2-4 min. Posteriormente, se inyectaron en el cromatógrafo de gases 2, 4, 6, 8 y 10 μL de la mezcla ET-aire, que correspondían a 2, 4, 6, 8 y 10 ppm. Los resultados obtenidos en la curva de calibración del ET se muestran en la Figura C1. Con base en la curva de calibración, se determinó que la concentración de ET se puede calcular utilizando la Fórmula 1.

Fórmula 1: concentración de etileno (ppm) = (área + 148.4)/662.8

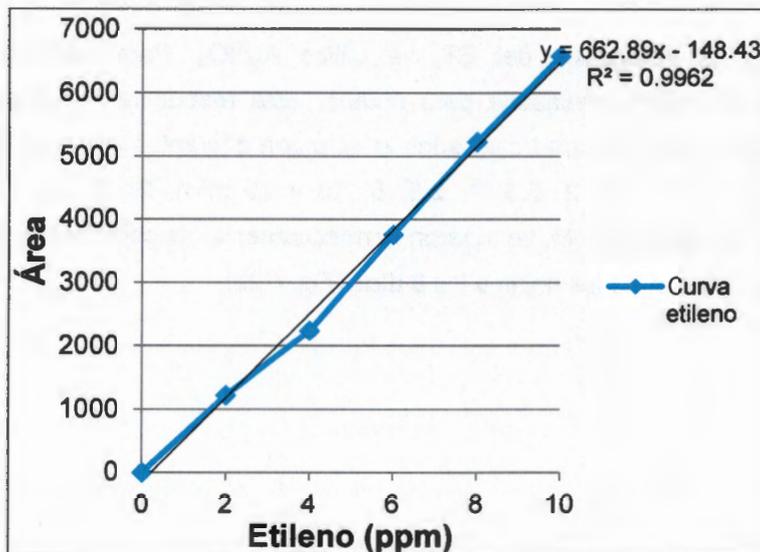


Figura C1. Curva de calibración de etileno. Se inyectaron 2, 4, 6, 8 y 10 ppm de etileno en un cromatógrafo de gases para determinar el área debajo de la curva correspondiente a cada una de las concentraciones analizadas.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN APROPIADA DE ETEFÓN Y NITRATO DE PLATA PARA INCREMENTAR LOS NIVELES DE ETILENO E INHIBIR SU PERCEPCIÓN EN PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO

Para determinar la concentración adecuada para liberar ET a partir del tratamiento con etefón, se asperjaron plántulas de un mes de edad de chile habanero cultivado *in vitro* con diferentes concentraciones de etefón (2.5, 5, 10 y 15 mM). Las cajas Magenta se cerraron herméticamente para evitar al máximo la salida de ET de los recipientes durante 8 días. Posteriormente, se registró la abscisión de las hojas que presentaron las plántulas (Fig. C2a).

La concentración umbral para realizar los tratamientos posteriores fue la de 5 mM. Es importante mencionar que en el resto de los experimentos, se utilizaron tapas que permitían el intercambio gaseoso, para evitar la acumulación de ET, que podría ocasionar la abscisión de hojas.

Para inhibir la percepción del ET, se utilizó AgNO_3 . Para determinar la concentración mínima necesaria para obtener esta respuesta, se asperjaron plántulas de un mes de edad cultivadas *in vitro* con diferentes concentraciones de AgNO_3 (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 1, 2.5, 5, 10 y 20 mM), 24 h después, se asperjaron con etefón 5 mM, se taparon herméticamente las cajas Magenta y se registró la abscisión de las hojas a los 8 días (Fig. C2b).

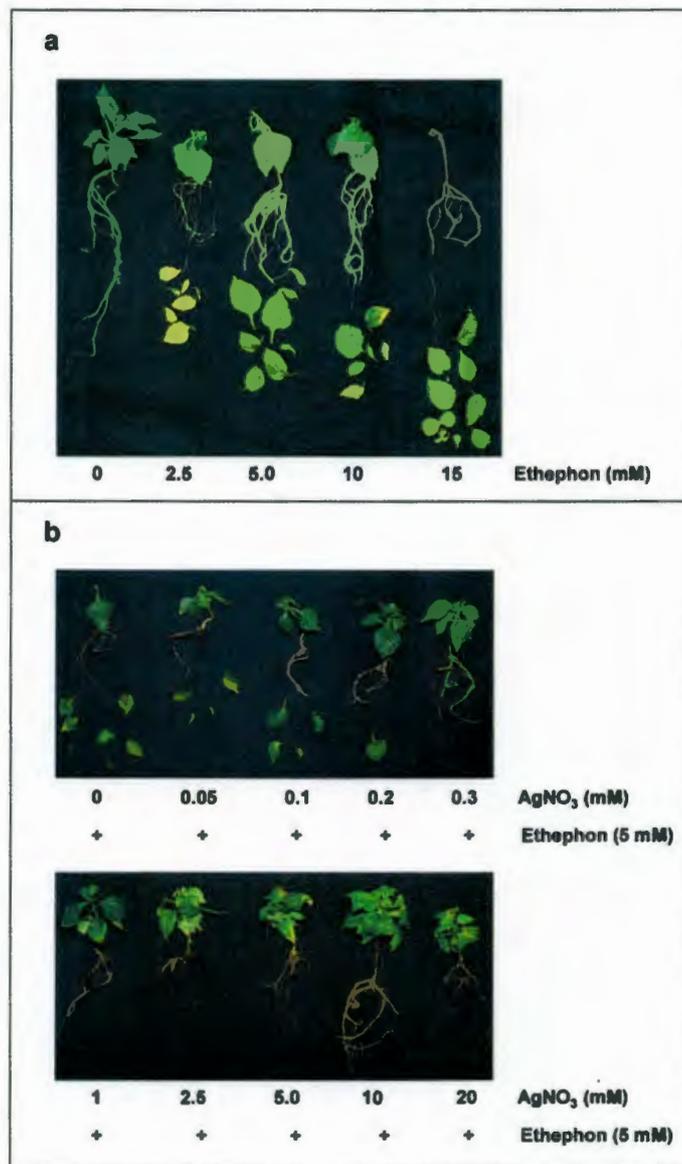


Figura C2. El etefón induce la abscisión de hojas, mientras que el nitrato de plata la inhibe en plántulas de chile habanero. Se asperjaron las plántulas con diferentes concentraciones de etefón (a), AgNO₃ y 24 h después, con etefón 5 mM (b). Se registró la abscisión de las hojas 8 días después de aplicar los tratamientos.

