



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

TESIS

“Expresión diferencial de genes en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) Injertadas sobre un patrón resistente a *Phytophthora capsici* Leo.”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

ISMAEL URRUTIA ANAYA

Dirigido por

Dr. IRINEO TORRES PACHECO

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco

Presidente

M. en C. Beatriz Verduzco Cuellar

Secretario

Dr. Ramón Guevara González

Vocal

Dr. Rosalía Ocampo Velázquez

Suplente

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Suplente

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

M. en S.P. Sergio Pacheco Hernández

Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Querétaro.

Diciembre 2015

México

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ingeniería Campus Amazcala división de Biosistemas y a la Facultad de Química, posgrado de Maestría en Ciencia y tecnología ambiental, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al proyecto 193512 de FORDECYT, al instituto Leibnitzfürgemüse-undzierpflanzenbau (IGZ) en Großbeeren Erfurt E. V. Alemania.

A los científicos que colaboraron en el cumplimiento de este proyecto de investigación: Doctor Andrés cruz Hernández, Doctora Sandra Neli Jiménez García, Doctora Lina García Mier, Doctora Ángela María Chapa Oliver, Doctora Laura Mejía Teniente, Doctor Juan Caballero Pérez.

Dedicado s mi madre, la señora Teresa Anaya Granados y a Laura Berenice Flores Tejeida por su cariño, paciencia y apoyo. Agradezco también a mis compañeros y estimados amigos por su incondicional disposición: Samuel (Sam), Maribel, Judith, Francisco (Panchito), Ricardo (el negro), Julia, Ari, Isa (las arpías), Lina María, Neli María, Ange, Lau, el Andy, Germán, Marcelo, Ana Karen, Luis Felipe, Joss, Amna, Inna.

RESUMEN

El chile serrano criollo Morelos 334, *Capsicum annuum* L., ha sido considerado como el único material con resistencia, contundente, a la enfermedad de la marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* Leo. Sin embargo, en los últimos años se ha estudiado un patrón que ha mostrado resistencia a esta enfermedad denominado M-69 y del cual se inicia el esclarecimiento de los mecanismos de defensa con herramientas moleculares como los microarreglos y el análisis de compuestos volátiles asociados a la interacción *Capsicum annuum* L.-*Phytophthora capsici*. En esta investigación, se injertó el cultivar susceptible, Sonora Anaheim en el patrón resistente M-69 y se inoculó con el patógeno *P. capsici*. A los 30 días, las plantas control susceptibles, presentaron el 100 % de incidencia con el total de mortalidad de éstas, no presentándose incidencia de la enfermedad en las plantas del patrón resistente M-69 y las injertadas. Mediante el uso de microarreglos se detectaron 10,101 genes totales de los cuáles en 507 se observó expresión diferencial, posteriormente, fueron seleccionados 45 genes relacionados con la resistencia y metabolismo para detectar similitudes en los patrones de expresión. La parte aérea susceptible injertada comparte el 23% de similitud en la expresión genética con respecto al patrón resistente M-69 y un 53% es compartido con el cultivar susceptible Sonora Anaheim. Los genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana* expresados por la parte aérea injertada fueron AT4G15900.1 y AT5G50850.1, fueron regulados negativamente en M-69 y Sonora Anaheim, están involucrados con la producción de antocianinas y en el metabolismo secundario. El gen AT4G15700.1 está regulado positivamente en M-69 y se involucra en la homeóstasis celular durante el estrés oxidativo. El gen AT1G70310.1 está directamente asociado a la síntesis de espermidina y es regulado positivamente en el patrón resistente y en la variedad susceptible injertada. Se produjeron 18 compuestos volátiles 24 horas posteriores a la interacción *C. annuum-Phytophthora capsici* y 8 compuestos a los 14 días posteriores a esta interacción. Metoxifeniloxima es producido únicamente en la planta injertada e inoculada 24 horas post inoculación, sin embargo la producción de nonanal se mantiene en el patrón resistente M-69 y en la planta injertada 14 días post inoculación. Ambos compuestos están relacionados con la resistencia a patógenos y con la producción de proteínas PR y PAL.

Palabras clave: Resistencia, patrón expresión, compuestos volátiles

SUMMARY

The chili Serrano criollo Morelos 334 (*Capsicum annuum*) is considered as only one with high resistance to chili wilt disease caused by *Phytophthora capsici* Leo. However, in recent years, has been studied a new rootstock that has shown resistance to chili wilt disease called M-69 of which start its elucidation of resistance mechanism using microarrays and volatile compounds analysis associated with *Capsicum annuum* L.-*Phytophthora capsici* interaction. In this research, plants of sensitive cultivar Sonora Anaheim were grafted onto resistant rootstock M-69 and was inoculated with *P. capsici*. 30 days after inoculation there was 100% of mortality in sensitive plants not grafted but none both, grafted plants and resistant rootstock, showed symptoms. 10, 101 genes were detected using microarrays of which 507 showed differential expression. 45 genes related with resistance and metabolism were selected to detect similitude in patterns expression. Sensitive grafted plant showed 23% of similitude with resistant rootstock M/69 and 53% of similitude of expression with sensitive cultivar Sonora Anaheim. *Arabidopsis thaliana* orthologue genes AT4G15900.1 and AT5G50850 were up-regulated in sensitive grafted plant but were down-regulated in M-69 and Sonora Anaheim. This genes are related with anthocyanins production and secondary metabolism. AT4G15700.1 gene is related with homeostasis during oxidative stress and it's up regulated only in M-69. AT1G70310.1 gene is related with spermidine production and were up-regulated in sensitive grafted plant and resistant rootstock. 18 volatile compounds 24 hours after inoculation with *P. capsici* were produced and in the same way eight volatile compounds were produced 14 days after inoculation. Methoxy-phenyl-oxime was produced only by sensitive grafted plant 24 hours after of inoculation, however, the volatile compound nonanal production was remained in resistant rootstock and grafted plant 14 days after of inoculation. Both, volatile compounds, are related with PR and PAL production during pathogen resistance.

Key words: Resistance, patterns expression, volatile compounds

ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
SUMMARY	VII
ÍNDICE.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA.....	3
III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
3.1 Taxonomía del chile <i>C. annuum</i> L.....	4
3.2 Descripción general de la enfermedad de la marchitez del chile.....	5
3.3 Descripción del agente causal de la marchitez del chile.....	6
3.4 Problemas fitosanitarios en México.....	7
3.5 Genotipos con resistencia a <i>P. capsici</i> Leo. en México.....	8
3.6 Injerto en hortalizas.....	9
3.6.1 Injerto de púa.....	10
3.6.2 Injerto en tubo de silicón.....	11
3.7 Aspectos genéticos y metabólicos en el proceso de resistencia de las plantas en contra de enfermedades causadas por microorganismo fitopatógenos.....	12
3.7.1 Mecanismos generales en la defensa de las plantas.....	12
3.7.2 Reacción de hipersensibilidad.....	13
3.7.3 Resistencia sistémica adquirida.....	15
3.7.4 Expresión genética en la defensa de las plantas.....	16
3.7.5 Los microarreglos como herramienta para la descripción de la expresión genética.....	19

3.7.6 Producción de metabolitos secundarios asociados a la defensa de las plantas de Chile.....	21
3.7.7 Compuestos orgánicos volátiles.....	22
3.8 Descripción de las plantas usadas en este estudio.....	24
3.8.1 Planta patrón M-69.....	24
3.8.2 Sonora Anaheim.....	25
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos particulares.....	27
V. METODOLOGÍA.....	28
5.1. Establecimiento de la interacción patógeno (<i>Phytophthora capsici</i> Leo.)-hospedero (<i>Capsicum annuum</i> L): Porta injerto M-69, cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim.....	28
5.1.1 Obtención de plántulas del cultivar susceptible Sonora Anaheim y el patrón resistente M-69.....	28
5.1.2 Elaboración de injertos.....	29
5.1.3 Confrontación del patrón resistente M-69, las plantas injertadas (M-69/Sonora Anaheim) y el cultivar susceptibles Sonora Anaheim con <i>Phytophthora capsici</i> Leo.....	33
5.2 Identificación del perfil de expresión génica en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim asociado a la interacción con <i>Phytophthora capsici</i> Leo.....	34
5.2.1 Recolección de muestras y extracción de ARN total.....	34
5.2.2 Elaboración de microarreglos para la identificación del perfil de expresión génica.....	35

5.3 Identificación del perfil en la producción de compuestos volátiles en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim, asociado a la interacción con <i>Phytophthora capsici</i> Leo.	36
5.3.1 Captura y análisis de compuestos volátiles por medio del dispositivo Twister™.	36
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1 Establecimiento de la interacción planta-patógeno.	39
6.1.1 Determinación de compatibilidad en las plantas injertadas.	39
6.1.2 Incidencia y severidad de la enfermedad de la marchitez del chile.	43
6.2 Identificación del perfil de expresión génica en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim asociado a la interacción con <i>Phytophthora capsici</i> Leo.	46
6.3 Identificación del perfil en la producción de compuestos volátiles en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim, asociado a la interacción con <i>Phytophthora capsici</i> Leo.	60
VII. CONCLUSIONES.....	65
VIII. REFERENCIAS.....	66
IX. ANEXOS	81
ANEXO 1	81
ANEXO 2.....	82
ANEXO 3.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Injerto en púa. A) Injerto, B) Porta injerto.	10
2. Injerto en tubo de silicón. A) Porta injerto, B) Injerto.	11
3. Planta de chile M-69 usada como porta injerto resistente a <i>Phytophthora capsici</i> . A) Porte de la planta patrón, B) fruto inmaduro, C) fruto maduro.	24
4. Planta de la variedad Sonora Anaheim susceptible <i>Phytophthora capsici</i> . A) fruto de calidad comercial, B) porte de la variedad.	25
5. Plantas de Sonora Anaheim (izquierda) y accesión M-69 previa injertación (derecha).	29
6. Planta injertada Sonora Anaheim (parte aérea) y accesión M-69 (parte radical).	30
7. Plantas injertadas dentro de bolsas de poli papel para evitar desecación y favorecer la cicatrización.	31
8. Cámara usada para promover la unión entre el injerto de Sonora Anaheim y el patrón resistente M-69.	32
9. Establecimiento de la interacción planta-patógeno.	33
10. Molienda de las muestras vegetales con nitrógeno líquido.	34
11. Dispositivo Twister™ sobre la superficie de una hoja para captura de compuestos volátiles.	36
12. Parte aérea del injerto con necrosis.	39
13. Unión de haces vasculares en el injerto y formación de callo celular.	41
14. Análisis de varianza aplicado al diámetro de las plantas injertadas y no injertadas. $P < 0.05$, cv 19,3%. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.	42
15. Sintomatología de la enfermedad de la marchitez del chile causada por <i>Phytophthora capsici</i> . Leo en el cultivar susceptible Sonora Anaheim. 1) Inicio de clorosis, 2) Marchitamiento/defoliación, 3) Secadera, 4y 5) Muerte de la planta; 6) Acercamiento a la.....	43
16. Comparación de síntomas en las plantas inoculadas con <i>P. capsici</i> . A) Plantas injertadas M-69/Sonora Anaheim sin síntomas de marchitamiento (circuladas en	

rojo), B) Plantas no injertadas Sonora Anaheim con los primeros síntomas de la enfermedad de la marchitez del chile.....	44
17. Severidad de la enfermedad de la marchitez del chile en 30 días post inoculación con <i>P. capsici</i>	45
18. Clasificación general de los genes diferenciales encontrados en el experimento de acuerdo a su función biológica.....	46
19. Porcentaje de la expresión genética diferencial en el patrón resistente M-69.	48
20. Porcentaje de la expresión genética diferencial en las plantas injertadas (patrón resistente M-69/Sonora Anaheim susceptible).....	49
21. Porcentaje de la expresión genética diferencial en las plantas susceptibles Sonora Anaheim.....	50
22. Número de genes regulados positivamente compartidos e individuales en las tres iteraciones en este experimento.....	51
23. Número de genes regulados negativamente compartidos e individuales en las tres iteraciones en este experimento.....	52
24. Heatmap de los genes identificados como diferenciales expresados en el patrón resistente M-69 (1), la planta susceptible injertada sobre el patrón resistente (2) y la planta susceptible Sonora Anaheim (3) a las 24 horas post inoculación con <i>P. capsici</i>	56
25. . Producción de compuestos volátiles a las 24 horas post inoculación con <i>P. capsici</i> . Se muestran las abundancias de los compuestos producidos por los genotipos M-69 (resistente), Sonora Anaheim (susceptible) y el injerto (M69/Sonora Anaheim).	60
26. Producción de compuestos volátiles a las 14 días post inoculación con <i>P. capsici</i> . Se muestran las abundancias de los compuestos producidos por los genotipos M-69 (resistente), Sonora Anaheim (susceptible) y el injerto (M-69/Sonora Anaheim).	63

ÍNDICE DE CUADROS.

1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis PR's en plantas de interés agrícola (Fernández, 2011).	18
2. Iteraciones post inoculación con P. capsici leo	35
3. Número de genes diferenciales expresados a las 24 horas posteriores a la interacción con P. capsici.	47
4. Anotación de los genes identificados como diferenciales expresados en el patrón resistente (1), la planta susceptible injertada sobre el patrón resistente (2) y la planta susceptible Sonora Anaheim a las 24 horas post inoculación con P. capsici Leo. *genes relacionados con la respuesta a patógenos como hongos y bacterias, ▲ genes relacionados con respuesta a estrés.	53

I. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte de México y el bajío han representado de un 80% hasta 100% de la producción de éste, lo cual se debe al ataque de virus bacterias y hongos (Castro y col., 2012; CONAPROCH, 2014) principalmente la enfermedad conocida como la marchitez del chile, que es ocasionada por el hongo *Phytophthora capsici* Leo. (Rincón y Velásquez, 1999; Anaya y col., 2011). Este hongo ataca la raíz e incluso frutos y hojas de la planta, así mismo forma estructuras de resistencia que le confieren protección y viabilidad por periodos de aproximadamente cinco años, razón por la cual se han inhabilitado zonas importantes de cultivo (Agrios, 1996, Velásquez y col., 2004, Anaya y col., 2011, Babadoost, 2011, Castro y col., 2012). Para disminuir la incidencia de la enfermedad de la marchitez del chile se usa bromo metano o bromuro de metilo, el cual es un fumigante que causa daños a la salud por sus efectos carcinogénicos, neurotóxicos y mutagénicos (Bravo y col, 2013; ATSDR, 2013).

Por otro lado, la práctica del injerto se ha usado desde hace mucho tiempo como alternativa para el manejo y control de plagas y enfermedades en solanáceas como el jitomate y el chile (Oda y col, 1999; Gonzáles y col., 2008) por lo que esta técnica se ha implementado en proyectos biotecnológicos relacionados al mejoramiento de la resistencia a enfermedades de interés agrícola como en el caso del chile (Mohamed y col., 2013). Se sabe que el fenómeno de la resistencia en plantas de chile es complejo, sin embargo, se ha determinado que se da principalmente por la expresión de los genes que codifican para la producción de fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés) y proteína de resistencia 1 (PR-1), dando como resultado cambios estructurales mediante el engrosamiento de las paredes de las células y la producción de metabolitos secundarios con potencial fungicida (fenoles) durante la interacción *C. annuum-P.capsici* Leo. (Godínez y col., 2008; Kim y Kim, 2009). En las plantas de chile de tipo silvestre se pueden encontrar individuos resistentes a *P. capsici* como es el caso de la línea

Criollo Morelos (CM-334), un chile de tipo serrano, altamente resistente a este patógeno (Bonnet y col., 2007; Gil, 1991). Esta línea de chile se ha usado como porta injerto (Santos, 2004; García y col., 2010) y como parental resistente en cruizas con plantas susceptibles (Richinis, 2010).

En los últimos cinco años se ha detectado otra planta de chile resistente a *P. capsici*, denominada M-69, la cual también se ha usado como porta injerto en combinación con plantas susceptibles a la enfermedad de la marchitez del chile (Urrutia, 2010). La accesión M-69 ha mostrado resistencia contundente a *P. capsici* de igual forma que CM-334 (Urrutia, 2011) por lo tanto es necesario estudiar cuales son los mecanismos genéticos y metabolómicos que le confieren el carácter de resistente por medio de herramientas moleculares para detectar la expresión de algún gen o un grupo de éstos de forma simultánea y así obtener un perfil de expresión en algún momento determinado bajo condiciones específicas como estrés biótico o abiótico (Pérez y col., 2012).

En consecuencia, esta investigación tuvo como objetivo determinar si el perfil de expresión genética y metabolómica del porta injerto resistente M-69 es similar al del material susceptible injertado del cultivar Sonora Anaheim.

II. MOTIVACIÓN DE LA PROPUESTA

En México se ha reportado que la superficie de siembra de chile es de 103.591,87 hectáreas por parte de los estados productores como Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán (SIACON 2012). En Aguascalientes, Guanajuato y San Luis Potosí (19% del total nacional), se reportan pérdidas de superficie de siembra aproximadamente de 12 mil hectáreas a causa de la enfermedad de la marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* Leo. (Anaya y col., 2011).

Para disminuir la incidencia de la enfermedad de la marchitez del chile se usa bromo metano o bromuro de metilo, el cual es un fumigante que causa daños a la salud por sus efectos carcinogénicos, neurotóxicos y mutagénicos (Bravo y col, 2013; ATSDR, 2013). Como alternativa al uso del bromuro de metilo y otros fungicidas, se usa la técnica del injerto para controlar enfermedades como la marchitez del chile, usando como porta injertos plantas resistentes (Mohamed y col., 2013). Por lo tanto es importante encontrar nuevas fuentes de resistencia al agente causal de la enfermedad de la marchitez del chile *P. capsici* Leo. así como esclarecer los mecanismos genéticos y metabólicos que intervienen en el patosistema de *C. annuum* L.- *P. capsici* Leo.

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1 Taxonomía del chile *C. annuum* L.

Botánicamente, el chile (*C. annuum*) se clasifica en el reino Plantae, División Magnoliophyta; clase Magnoliopsida, Orden Solanales; Familia Solanaceae, Género *Capsicum* (Vela, 2009).

El género *Capsicum* contiene cerca de 20 especies (Pickersgill, 1971), aunque algunos autores afirman que hay de 25 (Andrews, 1995) hasta 30 (Eshbaugh, 1975). Las especies de este cultivo se originaron en el nuevo mundo y algunas de éstas son silvestres y se encuentran en vegetación sin disturbios, aunque sus frutos pueden ser colectados y usados por el hombre. Cinco especies (*C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq, *C. baccatum* Jacq, y *C. pubescens* L.) son cultivadas ampliamente en Latino América y el resto del mundo (Pickersgill, 1971; Pugliese y col., 2013)

La especie *C. annuum* se distribuye ampliamente en México y América Central y en Sur América, posiblemente después de la conquista de los españoles (Pickersgill, 1971). Sin embargo es la especie más cultivada a nivel mundial (Hwang-sung y col., 2015). Esta especie se distingue por su cáliz dentado, una inflorescencia solitaria y blanca, en cada nodo produce frutos principalmente alargados en los tipos cultivados y que así mismo han perdido la capacidad natural para dispersarse. Por otra parte, las plantas de chile no cultivadas producen frutos pequeños, erectos y deciduos, los cuáles pueden ser dispersados por aves y otros agentes. (Pickersgill, 1971; Eshbaugh, 1975).

3.2 Descripción general de la enfermedad de la marchitez del chile.

Los hongos fitopatógenos forman un grupo diverso y pasan una parte de su ciclo de vida en las plantas hospederas y otra parte en el suelo o materia orgánica que se encuentra en el mismo. Algunos hongos pasan su ciclo de vida en el hospedero y sólo sus esporas están en el suelo, en la mayoría de los casos las esporas se producen en el tejido del hospedero, lo cual asegura una rápida y eficiente diseminación (Agrios, 2005). Las esporas de los hongos requieren de condiciones especiales para poder germinar, los hongos como los oomicetos pueden producir zoosporas que requieren de agua en abundancia para su producción, movimiento y germinación de las estructuras reproductoras (Agrios, 1996).

La infección causada por *P. capsici*, por sí misma, es destructiva a nivel mundial, sin embargo, existe la particularidad de que la planta atacada se vuelve vulnerable a ser invadida por otros patógenos como *Rhizoctonia* y *Fusarium* a través de las heridas causadas a la planta (Agrios, 2005; Erwin, 1996; Hausbeck 2004; Moran y col., 2010). La sintomatología general de la enfermedad de la marchitez del chile es la presencia de marchitamiento, clorosis, necrosis en la base del tallo, en la raíz principal y raíces secundarias, defoliación, en ocasiones se presenta crecimiento de micelio color blanco en tallo (Apodaca y col., 2004; Velásquez, y col., 2004) y en otros casos, se ha reportado caída de flores y frutos (Guerrero y col., 2004), sin embargo también puede haber ataque directo a las hojas y frutos por la incidencia del tizón y pudrición de frutos causando al final la muerte de la planta (Morán y col., 2010; Zhang y col., 2013).

3.3 Descripción del agente causal de la marchitez del chile.

La supervivencia y acción de los hongos fitopatógenos depende de las condiciones ambientales (humedad y temperatura) y características intrínsecas de las plantas (resistencia). El micelio de un hongo sobrevive en un rango de temperatura de -5 °C a más de 45 °C, las esporas de los hongos resisten intervalos amplios de humedad y temperatura lo que les permite sobrevivir en estado de latencia por tiempo indefinido (Agrios, 2005).

El género *Phytophthora* inverna en forma de oospora, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Las pudriciones de raíz causadas por *Phytophthora* dañan a sus hospedantes en donde la temperatura es relativamente baja (15 y 23°C) y el suelo es lo suficientemente húmedo (mayor al 60%) como para permitir el desarrollo normal de las plantas susceptibles a este hongo. El comportamiento de las distintas especies de *Phytophthora* que causan las pudriciones de raíz de las plantas es muy parecida, sin embargo, también debe destacarse que varios hongos como *Rhizoctonia* y *Fusarium* con frecuencia producen síntomas similares (Agrios, 2005).

La mayoría de las especies de *Phytophthora* producen pudriciones de la raíz, ahogamiento de plántulas y pudriciones de tubérculos, cormos, bases de los tallos y otros órganos. Algunas especies son específicas al hospedero, es decir, que solo atacan a una o dos especies de plantas, otras especies de este patógeno tienen un amplio rango de hospederos (Agrios, 2005).

P. capsici es un oomiceto heterotálico (que requiere de otro individuo de distinto signo sexual) que forma esporas sexuales que aseguren la supervivencia a largo plazo puesto que se ha reportado que pueden persistir por años en campos de cultivo y son resistentes a condiciones ambientales adversas (Bowers y col., 1990; Drenth y col., 1995; Lamour, 2003). *P. capsici*, produce un gran número de esporangios en la superficie del hospedero, éstos se diseminan por agua de lluvia o escorrentía y se liberan zoosporas que nadan hacia las plantas

hospederas para colonizarlas hasta que las condiciones son adversas y se generan estructuras de invernación (Du y col., 2014). Cuando las condiciones ambientales son favorables, estructuras de invernación germinan, hay producción de micelio el cual prosigue su crecimiento, produciendo esporangios nuevamente y que posteriormente liberan zoosporas, las cuales nadan en el agua del suelo, e infectan las raíces de las plantas susceptibles (Agrios, 2005).

P. capsici genera la enfermedad de la marchitez del chile debido a la pudrición de la raíz y de los frutos del pimiento (*C. annuum* L.), pudrición de la zanahoria (*Daucus carota* L.) y la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y otras cucurbitáceas; así mismo, genera lapudrición de los frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) (Agrios, 2005).

3.4 Problemas fitosanitarios en México.

En México, el chile (*C. annuum* L.) es una de las hortalizas principales en la dieta de la población y por ello es cultivado comercialmente en la mayor parte del país. La región centro-norte ocupa el primer lugar en superficie cultivada principalmente en la producción de chile seco de tipo ancho, mirasol, pasilla y en estado fresco, los cuales se utilizan para la extracción de colorantes y en la cocina (Velázquez y col., 2003).

En México se ha reportado la incidencia de la marchitez en los estados productores de chile como Aguascalientes, Guanajuato, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Sinaloa, Sonora Chihuahua, Querétaro, Hidalgo y Michoacán, de los cuales, Aguascalientes, Guanajuato y San Luis Potosí la superficie de siembra se redujo casi 60% (Anaya y col., 2011; SIACON 2012).

Reportes del año 2001 citaban que el hongo *Phytophthora capsici* Leo. era el único agente causal de la enfermedad de la Marchitez o secadera de las plantas de chile en las zonas productoras como Aguascalientes, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas (Velázquez, 2001). Sin embargo, se han hecho aislados de raíces de plantas enfermas y se han encontrado otros hongos fitopatógenos como

Rhizoctonia, *Fusarium*, *Pythium* y *Phytophthora*, los cuales interactúan para la producción de la enfermedad (Velázquez y col., 2003; Guerrero y col., 2004; Morán y col., 2010).

Las pérdidas en la producción pueden llegar a ser considerables pues el control químico y cultural no ha sido suficiente para controlar el problema. Diversos autores consideran que la resistencia genética es una alternativa sustentable para enfrentar el problema fitosanitario y a la vez reducir el uso de fungicidas y la degradación del suelo. Al respecto, las poblaciones nativas representan un reservorio genético que debe ser explorado para identificar germoplasma resistente como en los chiles criollos de Morelos, donde se ha detectado resistencia a la enfermedad de la marchitez del chile (Morán y col., 2010).

3.5 Genotipos con resistencia a *P. capsici* Leo. en México.

En las plantas de chile de tipo silvestre se pueden encontrar individuos que cuentan con mecanismos de defensa en contra de *P. capsici* como en el caso de la línea Criollo Morelos (CM-334), que es un chile de tipo serrano altamente resistente especialmente a este patógeno aun cuando se ha inoculado la cepa más agresiva (Gil, 1991; Bonnet y col., 2007; Kim y Kim, 2009).

Actualmente se le considera al CM334 como una planta de resistencia a *P. capsici* a nivel mundial (Oelke y col., 2003; Glosier y col., 2008), por ello ha sido objeto de diversos estudios a nivel genético en los cuales se ha encontrado evidencia de que la hibridación entre las plantas resistentes y las susceptibles puede ser viable, sin embargo aún no se define totalmente este fenómeno (Suguita, 2006; Sy y col., 2008; Richinis y col., 2010). Por otro lado, la injertación de variedades susceptibles con porta injertos resistentes ha sido una buena opción en el control de la enfermedad de la marchitez del chile causada principalmente por *P. capsici* y otros hongos (Santos, 2004; García y col., 2010; Urrutia, 2010).

La línea CM334 puede no ser la única fuente de resistencia disponible en México ya que, en un estudio previo, la accesión criolla M-69 procedente del Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), con sede en Celaya Guanajuato, fue detectada como resistente en presencia de la mezcla del oomiceto *Phytophthora* y otros patógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Urrutia, 2010).

Adicionalmente, la accesión criolla M-69 se probó como planta porta injerto combinada con cuatro variedades comerciales de pimiento dulce (María, Startep 36, Triple Star y GretzKyRz) observándose compatibilidad con tres de éstas (María, Triple Star y GretzkyRz) y adicionalmente se confirió resistencia a la enfermedad de la marchitez del chile, perfilándose la accesión M-69 como una buena opción para el control de la enfermedad como porta injerto. (Urrutia, 2010).

3.6 Injerto en hortalizas.

El injerto en plantas es una práctica que se ha realizado a lo largo del tiempo, la cual consiste en la unión de dos porciones de tejido vegetal, de tal forma que se unan, crezcan y se desarrollen como una sola planta (Acosta, 2005). Uno de los objetivos del injerto en hortalizas es controlar las enfermedades del suelo en solanáceas como el tomate y el chile (Oda y col, 1999; Gonzáles y col., 2008, Mohamed y col., 2013).

Se conoce como porta injerto (patrón) a la planta de la cual van a usarse sus raíces, mientras que se conoce como injerto (variedad) a la planta de la cual van a aprovecharse las hojas y la que dará el fruto. Generalmente el porta injerto es resistente a las plagas y enfermedades, mientras que el injerto es propenso a ser afectado, sin embargo, proporciona mayor cantidad y calidad de fruto (Acosta, 2005). Para que el injerto entre dos plantas tenga éxito, éstas deben ser compatibles (afines). La afinidad está dada a nivel anatómico y fisiológico, es decir, similitud en la constitución de sus tejidos y que la savia que circula sea similar en cantidad y constitución en ambas partes (Acosta, 2005).

A continuación se describen los tipos de injertación más comunes en plantas herbáceas.

3.6.1 Injerto de púa.

Este injerto se elabora una vez obtenidas las plántulas del injerto y el porta injerto. La planta del porta injerto debe contar con 4-5 hojas verdaderas y el injerto las dos primeras hojas verdaderas. Ambas se decapitan y a la parte apical (injerto) se le da forma de púa y a la parte que contiene la raíz (porta injerto) se le hace una hendidura en forma de “V” de tal manera que ambas coincidan al momento de injertar; posteriormente se fijan con un clip de silicón o plástico (Oda, 1999; Acosta, 2005; Urrutia, 2010) (Figura 1).

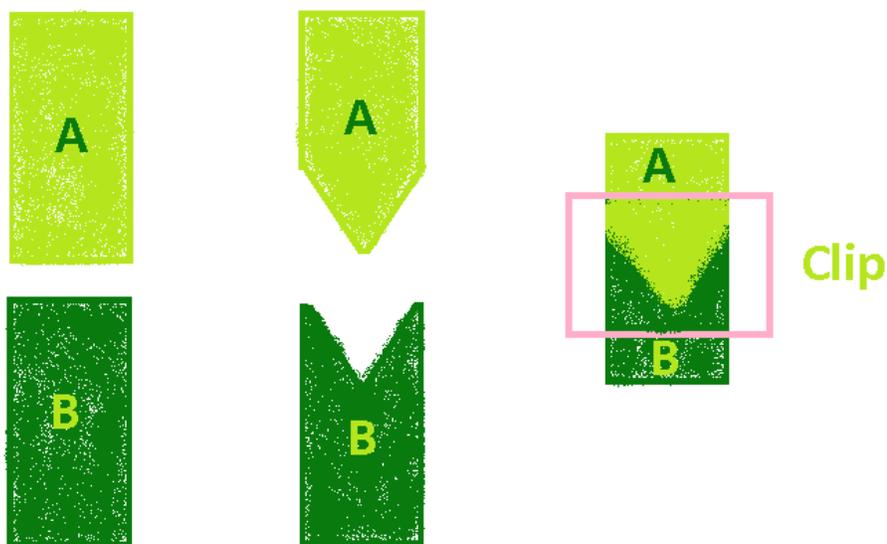


Figura1. Injerto en púa. A) Injerto, B) Porta injerto.

3.6.2 Injerto en tubo de silicón.

Con este método es posible injertar plántulas pequeñas. Primero se corta el porta injerto en forma diagonal generalmente entre 45 a 65°, de igual forma se corta el injerto. Se coloca un clip (tubo) de silicón del diámetro requerido (0.6 a 0.8 milímetros) sobre el porta injerto; posteriormente se desliza el injerto dentro de este clip (tubo) de tal forma que haya contacto firme entre los cortes encontrados (Oda, 1999; Acosta, 2005; Urrutia, 2010) (Figura 2).

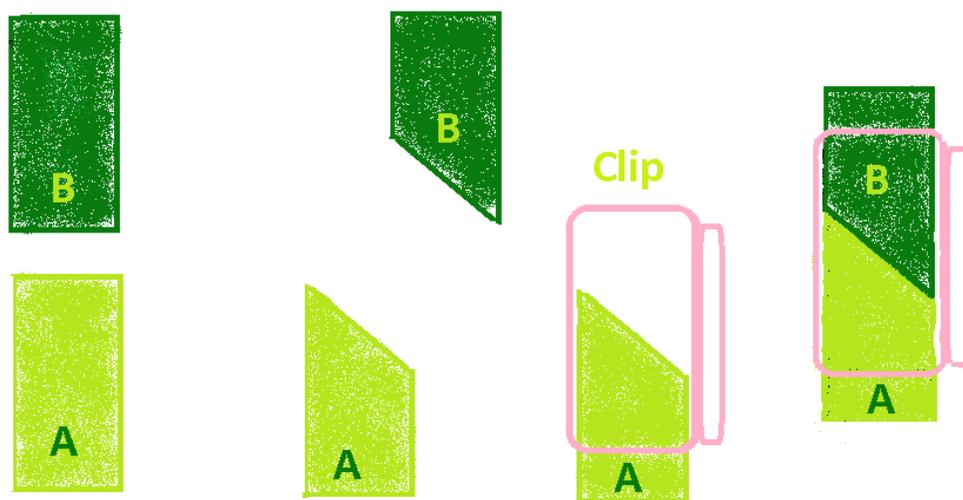


Figura 2. Injerto en tubo de silicón. A) Porta injerto, B) Injerto.

3.7 Aspectos genéticos y metabólicos en el proceso de resistencia de las plantas en contra de enfermedades causadas por microorganismo fitopatógenos.

3.7.1 Mecanismos generales en la defensa de las plantas.

Las plantas para defenderse disponen de una variedad de mecanismos de defensa que van, desde las barreras físicas hasta las reacciones bioquímicas que alertan las células entre sí, produciendo sustancias tóxicas que eliminan o inhiben la colonización de patógenos y/o plagas (Riveros, 2001). La resistencia en plantas se manifiesta por la incapacidad de un patógeno para crecer y multiplicarse, así como diseminarse, lo que a menudo puede denotarse por medio de la respuesta hipersensible dando lugar a la muerte celular en el sitio de infección (apoptosis) que da como resultado la formación de un anillo de células muertas que rodean el área afectada para evitar su diseminación dentro del órgano infectado (resistencia local). Este fenómeno desencadena resistencia no específica en la planta completa que le provee de protección a subsecuentes ataques por un amplio rango de patógenos (Urrutia, 2011).

Durante el proceso anterior, se refuerzan las paredes celulares por la deposición de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas, fenoles insolubles y la estimulación de la ruta de síntesis de metabolitos secundarios en donde destacan compuestos con actividad antimicrobiana (fitoalexinas), reguladores de defensa como el ácido salicílico, etileno y metabolitos derivados de la acumulación de lípidos; así mismo se acumula un amplio rango de proteínas asociadas con la defensa o proteínas de resistencia (Albersheim, 1978; Odjakova, 2001).

3.7.2 Reacción de hipersensibilidad.

El contacto directo de un fitopatógeno con una planta hospedera, se inicia una cascada de señales de transducción, que finalmente desencadenan la respuesta de hipersensibilidad (HR). La respuesta HR es una reacción local y se caracteriza por la aparición de lesiones necróticas en el sitio de infección. Como consecuencia, se detiene la invasión del patógeno en las células inicialmente infectadas, evitando la diseminación del patógeno por toda la planta. La reacción HR se desencadena debido a ciertos eventos moleculares que permiten la restricción del movimiento del patógeno (Odjakova, 2001; Satnge y col., 2007).

El primer evento celular que se ha detectado es el flujo de iones a través de la membrana plasmática que produce intermediarios reactivos de oxígeno (EROS) como son el radical superóxido (O_2^-), oxidrilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El primer estallido oxidativo (ROS I) es inespecífico y se observa en las primeras horas después de la infección. La etapa II de EROS se correlaciona directamente con la respuesta de defensa y se produce entre las 2 horas y de 2 a 6 días post infección dependiendo del patógeno (Suzuki, 2006; Satnge y col., 2007). Además, se ha observado que aumentan los niveles de ácido salicílico (AS), involucrado en la respuesta de defensa de las plantas. También, se produce la síntesis y entrecruzamiento de proteínas de la pared celular, provocándose la lignificación de ésta y el depósito de callosa en torno a la lesión (Odjakova, 2001; Amirsadeghi, 2007; Satnge y col., 2007).

En respuesta al ataque de hongos y otros fitopatógenos, algunas plantas contrarrestan la penetración e invasión de estos patógenos, con compuestos o minerales como glicoproteínas, compuestos fenólicos, lignina, suberina, sílice y calcio. Junto a ello se sintetizan compuestos antimicrobianos derivados de la ruta fenilpropanoides como fitoalexinas y proteínas relacionadas con patogénesis (Satnge y col., 2007). Las proteínas de resistencia (PR) constituyen un grupo heterogéneo de proteínas, constitutivas o inducidas, muy estables a pH bajos, relativamente resistentes a la acción de proteasas, generalmente de entre 8-100

kDa, tóxicas para los patógenos. Estas proteínas se acumulan predominantemente en los espacios extracelulares (Odjakova, 2001). Las proteínas de resistencia (PR) se inducen diferencialmente dependiendo de la especie vegetal y del tipo de infección que ha sufrido la planta. La presencia de estas proteínas es fácilmente demostrable al comparar por electroforesis, extractos de ácidos nucleicos de plantas sanas y de plantas expuestas a la acción de patógenos. Las proteínas PR se concentran en el lugar de la infección, pero también se encuentran en tejidos sin inocular y mantienen su actividad de unos días hasta algunas semanas (Richinis y col., 2010). Entre las PR se encuentran PR1 y PR5 que tienen actividad anti fúngica y anti oomicetos, PR2 que tiene actividad β -1,3 glucanasa, PR3 y PR8 de actividad quitinasa y PR10 de actividad nucleasa. No obstante, dado que β -glucan y quitina, son los principales constituyentes de la pared celular de los hongos, la acción de quitinasas y β -1,3-glucanasas se asocia con actividad anti fúngica. Estas son proteínas hidrolíticas que en forma sinérgica degradan la pared celular de los hongos y su presencia se correlaciona con la resistencia de la plantas a algunas micosis. El aumento en los niveles endógenos de AS es necesario para la activación transcripcional de los genes que codifican para proteínas PR ácidas (2 a 6 días post infección) (Ueeda y col., 2006; Satnge y col., 2007; Oliver y col., 2009; Muthukumar y col., 2011; Okubara y col., 2014).

3.7.3 Resistencia sistémica adquirida.

En la resistencia sistémica adquirida (SAR), hay acumulación de AS y proteínas PR en los tejidos distantes al sitio de infección, permiten a la planta defenderse con mayor intensidad y velocidad frente a una segunda infección de un patógeno (Satnge y col., 2007). Es un mecanismo de resistencia que permanece por algunas semanas en la planta y permite el reconocimiento de un amplio rango de patógenos incluyendo hongos, pseudohongos (chromistas) y bacterias. Generalmente se expresa como una disminución de la severidad (ej. número y tamaño de las lesiones producidas) de las enfermedades que estos patógenos producen en monocotiledóneas y dicotiledóneas (Satnge y col., 2007).

La inducción de SAR ocurre por la acción de una señal inespecífica, transportada sistémicamente cuya naturaleza molecular se desconoce. No obstante, numerosos trabajos han demostrado la acumulación de ácido salicílico (AS) en el floema se da en respuesta a una infección primaria, y se asocia este compuesto con la señal necesaria para activar una serie de procesos bioquímicos propios de la SAR, los que incluyen en la síntesis de proteínas regulatorias, activación de una batería de genes PR y a la acumulación de diversas proteínas PR, algunas de las cuales presentan actividad anti fúngica y antimicrobiana en general (Satnge y col., 2007).

A pesar de que la concentración de AS se correlaciona con la inducción de proteínas PR, es posible que la naturaleza química de esta señal en algunas plantas sea diferente. El AS puede inhibir la acción de enzimas oxidativas (catalasas) y de este modo provocar un incremento de H₂O₂ y otras especies reactivas de oxígeno (Satnge y col., 2007). Tanto la inhibición de catalasas como el aumento de especies reactivas de oxígeno inducen la expresión de genes de defensa asociados con SAR, por esto, se ha postulado que la acción del AS en la SAR podría estar mediada por concentraciones elevadas H₂ O₂ y estrés oxidativo, lo que posiblemente ocurriría en un grupo reducido de células en contacto directo con el patógeno u otro agente inductor, provocando una reacción de

hipersensibilidad microscópica (Satnge y col., 2007; Wang y col., 2013; Okubara y col., 2014).

3.7.4 Expresión genética en la defensa de las plantas.

El estrés se define como los factores externos que representan una desventaja en la planta y que generalmente apuntan a condiciones ambientales, incluyendo la competencia con malezas, patógenos e insectos (Xu y col., 2008).

La respuesta celular hacia el estrés incluye cambios dentro de la membrana, vacuolización de las células, cambios en la arquitectura de la pared celular. A nivel bioquímico las plantas alteran su metabolismo en diferentes rutas para nivelarse ante el estrés incluyendo la producción de compuestos osmoreguladores como la prolina, glicina y betaína. Los eventos moleculares ligados a la percepción del estrés llevan a respuestas genómicas (Taiz y Zeiger, 2006).

Se ha demostrado que la resistencia a *P. capsici* en tallo, raíz y hojas está controlada por diferentes sistemas genéticos (Foster, 2010; Richinis, 2010). Algunos transcritos de estos genes se han denominado proteínas asociadas a la resistencia (PR), sin embargo, los mecanismos de defensa en las plantas están controlados por múltiples rutas bioquímicas (Wongpia, 2010).

Los genes asociados a la resistencia son representados por la presencia de las proteínas PR que se clasifican en 14 grupos (PR1- PR14) basados en la homología estructural dentro de los grupos; siendo los genes representativos durante el proceso de defensa en las plantas CABPR1, GLU, POX y sus productos: CABPR1 (PR-1) GLU (glucanasas), POX (peroxidasa), los cuales se acumulan en los espacios intracelulares principalmente dentro del tallo cuando hay ataque por patógenos como *P. capsici* (Hong y Hwang, 2005).

Las PRs son inducidas por hongos, virus, bacterias, insectos y nematodos principalmente (Bol y Linthost, 1990). Al respecto, se ha determinado que existe

una activación diferencial de los miembros de las familias de genes PRs ya que cuando hay ataque por patógenos principalmente se expresan las PRs en formas ácidas (Bol y col., 1996). Las PRs se dividen en grupos de familias que comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, relaciones serológicas y actividad enzimática y biológica. En el Cuadro 1 se muestran las familias de proteínas relacionada con patogénesis que se han detectado en plantas de interés agrícola.

Las proteínas de resistencia son codificadas por las plantas hospederas inducidas específicamente en situaciones de patogénesis y no solamente se acumulan localmente, sino que son inducidas sistémicamente (RSA) para prevenir futuros ataques de hongos, bacterias y virus. La inducción de las PR se han encontrado en diversas familias de plantas, sugiriendo que el rol de estas proteínas es importante en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés biótico (Van Loon, 2009). El criterio para incluir nuevas familias de PR es que éstas deben ser inducidas por un patógeno en un tejido en donde normalmente no se expresa, y que la expresión inducida debe mostrar ocurrencia en al menos dos diferentes combinaciones de planta-patógeno, así mismo, la expresión de esta proteína debe ser confirmada independientemente en diferentes laboratorios (Van Loon, 2009).

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis PR's en plantas de interés agrícola (Fernández, 2011).

PR	Planta en la que se detectó	Función
PR-1	Arroz, cebada, tomate, tabaco.	Engrosamiento de la pared celular.
PR-2	Arroz, trigo, cebada, maíz, papa, tomate, tabaco, chile, frijol, soya, betabel.	β -1, 3-glucanasa.
PR-3	Arroz, maíz, tomate, chile, betabel.	Quitinasa.
PR-4	Tabaco, tomate, árbol de goma.	Quitinasa.
PR-5	Arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, papa, tomate, tabaco.	Alteración de la permeabilidad de la membrana del hongo.
PR-6	Cebada, tomate, papa, tabaco.	Inhibidor de proteínasa.
PR-7	Tomate.	Endoproteínasa.
PR-8	Pepino.	Quitinasa.
PR-9	Tomate, arroz, tabaco, trigo.	Peroxidasa.
PR-10	Papa, espárrago, chícharo, frijol, arroz.	Ribonucleasa.
PR-11	Tabaco.	Quitinasa.
PR-12	<i>Arabidopsis</i> , chícharo, rábano.	Defensina.
PR-13	Cebada.	Tionina.
PR-14	Cebada LTP4.	Transferencia intracelular de lípidos.
PR-15	Cebada.	Oxalacetato oxidasa.
PR-16	Cebada y trigo.	Parecida a oxalacetato sin presentar esta actividad.
PR17	Trigo	Peptidasa

Al respecto, en la interacción *P. capsici* y la accesión M-69 se observó que en el extracto de hojas de las plantas resistentes se expresaron los transcritos de PR-1 y PAL-1 diferencialmente a partir de las 24 horas post inoculación hasta los 35 días, siendo el transcrito PR-1 el más persistente en el tiempo (Urrutia, 2011).

3.7.5 Los microarreglos como herramienta para la descripción de la expresión genética.

El análisis de la expresión genética es importante en muchos campos de la investigación biológica, donde los cambios en la fisiología de un organismo o una célula se acompañan por los cambios en el modelo de la expresión génica. El microarreglo es una tecnología recientemente desarrollada que permite un estudio simultáneo de la expresión de múltiples genes en las plantas, u otros organismos (Pérez, 2005). El desarrollo de esta tecnología permite un salto cualitativo en las investigaciones de la fisiología y la defensa de las plantas (Pérez y col., 2012). Esta tecnología está basada en un proceso de hibridación y el uso de superficies o chips los cuales se encuentran arreglados en una cuadrícula regular con segmentos y patrones de tiras de ADN, las cuáles son depositadas en todos y cada uno de los segmentos de la cuadrícula del chip (Hernández y col., 2013).

El procedimiento de un experimento con microarreglos de ADN incluye varios pasos, desde la preparación de la muestra hasta el análisis de los datos. El chip de ADN (cADN) resultante de la hibridación es escaneado y procesado para producir un arreglo numérico en dos dimensiones de la expresión de los genes y estos datos son usados para aplicar un análisis con algoritmos (Hernández y col., 2013).

La elaboración de los experimentos con microarreglos comprende tres pasos básicos: 1) Preparación de la muestra y marcaje de la misma, lo cual consiste de muestras de ARN o ADN del tejido de interés, el cual se marca con fluoróforos; 2) Hibridación y enjuague, el cual consiste en la unión de dos tiras complementarias de ADN para formar una molécula de doble hélice, el cADN

(ADN complementario) marcadores mezclado junto con el chip a temperatura específica para templar las secuencias complementarias y finalmente el chip se enjuaga para remover excedentes y contaminantes; 3) Escaneo de la imagen del microarreglo y su procesamiento que consiste en analizar las tonalidades y la intensidad de los colores generándose una matriz de datos en un arreglo de números en dos dimensiones en donde las columnas indican los genes y los renglones indican las muestras. Cada columna representa el nivel de expresión de todos los genes de una muestra, cada renglón representa el nivel de expresión de un gen entre las diferentes muestras (Hernández y col., 2013).

En la última década, la tecnología del microarreglo ha permitido generar información sobre la interacción planta –patógeno (Lodha, 2011). Esta tecnología ha descrito los genes involucrados en la respuesta sistémica adquirida. Por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* se han observado 7000 genes relacionados a la resistencia, así mismo se han observado aproximadamente 300 genes nuevos relacionados al mismo fenómeno. Con el uso de diferentes algoritmos con patrones de regulación comunes (regulones) se pueden agrupar diferentes tipos de genes de resistencia como en el caso del gen PR-1 que corresponde al grupo de PR's y que se induce bajo el control de NPR1 (Nonexpressor of pathogenesis-related gene), proteína que interactúa con miembros de la familia de factores de transcripción TGA de cierres de leucina básicos (TGA-bZIP). El promotor de PR-1 en *Arabidopsis* contiene un sitio de unión para el factor TGA-bZIP que sirve como elemento positivo para la inducción de la respuesta sistémica adquirida. Por esto se puede esperar que todos los genes del regulón PR-1 contengan un sitio de unión con el factor de transcripción TGA-bZIP en sus promotores. Sin embargo, no es el único factor de transcripción al cual se une PR-1, pues existe otro como el promotor W box (WRKY que inhibe la transcripción), otro factor poco conocido que activa la transcripción y TGA-bZIP (Lodha, 2011).

El factor WRKY podría actuar junto con otros factores de transcripción para llevar a cabo una regulación precisa en la expresión de genes durante la respuesta sistémica adquirida y se ha propuesto que el regulón de los genes PR-1

puede ser co-reprimido por los factores WRKY y durante la respuesta sistémica adquirida estos genes podrían ser desinhibidos. Este es un ejemplo en donde los perfiles obtenidos de los microarreglos arrojan información sobre las redes reguladoras y el descubrimiento de genes en las plantas. Hasta ahora se han realizado muchos experimentos con microarreglos en las interacciones de planta-patógeno, enfocándose en los mecanismos que controlan la resistencia de las plantas a la enfermedad, la trama en las rutas de señalización involucradas y las estrategias que usan los patógenos para suprimir la defensa (Lodha, 2011).

Aún no hay un lenguaje unificado para intercambiar datos entre diferentes laboratorios, por lo que se requiere acudir a la sociedad dedicada a la interpretación de los datos arrojados por los microarreglos con respecto a la expresión genética o “Microarray Gene Expresión Data Society” (MGED) ahora denominada “Functional Genomics Data Society”(FGDS), la cual desarrolla lineamientos para la publicación de datos provenientes de microarreglos; así mismo, esta sociedad desarrolla un lenguaje estandarizado y proveer una plataforma para la presentación y análisis de los datos de los microarreglos generados por diferentes laboratorios a nivel mundial (Lodha, 2011).

3.7.6 Producción de metabolitos secundarios asociados a la defensa de las plantas de Chile.

Las plantas se defienden contra las adversidades que la rodean por la producción de sustancias (metabolitos secundarios) que son codificadas por genes de resistencia. La carrera armamentista entre la planta y el patógeno (estrés biológico) decide el éxito o el fracaso y en casos muy específicos puede haber una relación benéfica, ya que también el ataque de otros agentes patogénicos, por ejemplo, el virus del tabaco (TMV) que puede inducir la tolerancia a condiciones ambientales adversas (Heldt, 2007; Thakur, 2007; Xu y col., 2008). Por otro lado, la interacción de la raíz con hongos o bacterias benéficos puede promover que la planta exprese resistencia sistémica lo cual incluye la producción de metabolitos secundarios (Martínez y col., 2013).

Estas sustancias se les conoce como fitoalexinas o metabolitos secundarios de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas y que se producen y acumulan en plantas expuestas a microorganismos. Estos compuestos normalmente se encuentran en niveles basales en las plantas sanas pero su acumulación se incrementa dramáticamente después del ataque de un patógeno (Paxton 1981; García, 2003).

Las plantas producen diferentes metabolitos secundarios bajo estrés biótico a partir de fenilalanina amonio liasa (PAL) en contra de hongos como *P. capsici* (Koc y col., 2011, Godínez y col., 2008) y se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes generándose una reacción híper sensible que consiste en la muerte programada de las células dañadas por ataque de patógenos (Hammerschmidt 1999). Al respecto, en la interacción *P. capsici* – *Capsicum* se ha observado el aumento de fenilalanina amonio liasa (PAL), cambios en compuestos fenólicos con propiedades tóxicas e incremento en la síntesis de la fitoalexina capsidiol que contrarresta el ataque de *P. capsici* (Fernández y col., 2012), así mismo, en la interacción *P. capsici*–accesión M-69 se observó una mayor producción de fenoles totales y flavonoides en comparación a las plantas susceptibles California Wonder en las primeras 24 horas post inoculación (Urrutia, 2011).

3.7.7 Compuestos orgánicos volátiles.

Las plantas producen y emiten numerosos compuestos volátiles orgánicos. Siempre se ha reconocido el olor que producen, por su importancia comercial y estética, que liberan no sólo de flores y frutos sino también de tejidos vegetativos. Generalmente estos compuestos están conformadas por terpenos, derivados de ácidos grasos y compuestos aromáticos. La importancia de los compuestos volátiles de plantas radica en que pueden actuar como señales para otros organismos u otras plantas, y aún para la misma planta. Estos compuestos pueden modificar el entorno de las especies que los producen, sus vecinos y sus enemigos (Marín, 2007). Los compuestos volátiles sirven a las plantas para

reproducción, atrayente de polinizadores y dispersores de semillas; como defensa para repeler insectos, detener la colonización de bacterias y hongos fitopatógenos; para atraer enemigos naturales de fitófagos y como mensajeros intra- e interespecíficos. Los progresos en las técnicas de análisis, la biología molecular y la bioquímica, han permitido elucidar vías biosintéticas, enzimas y genes involucrados en la producción y emisión de éstos, lo que ha ayudado a conocer parcialmente la razón del porqué se producen este tipo de sustancias, el papel que desempeñan en la interacción con otros organismos y con el medio (Marín, 2007). Algunos compuestos orgánicos volátiles son específicos a ciertas especies de plantas, por ejemplo los isotiocianatos son catabolitos volátiles de los glucosinolatos y son característicos de las crucíferas por ataque de plagas especializadas a este tipo de plantas, por otro lado el estrés de origen abiótico como altas temperaturas, estrés por sequía llevan a la producción de isoprenos, monoterpenos y sesquiterpenos. Los terpenos son producidos en abundancia por las hojas verdes y son aldehídos de seis carbonos, alcoholes y ésteres de lipooxigenasas embebidas en ácidos grasos (Atkinson y col., 2013). El ácido jasmónico es precursor y regulador positivo de la síntesis de compuestos orgánicos volátiles ya sea endógena o exógenamente en mono y dicotiledóneas (Okada, 2014).

3.8 Descripción de las plantas usadas en este estudio.

3.8.1 Planta patrón M-69.

Planta anual, herbácea de entre 50-80 centímetros de altura, de hábito erguido de tallos pubescentes, de hojas abundantes verde oscuro pequeñas de aproximadamente dos centímetros, oblongas, flor blanca, anteras violáceas, fruto de aproximadamente cinco centímetros que en estado verde es color oscuro y se torna rojo a la maduración, altamente resistente al oomiceto fitopatógeno *Phytophthora capsici* Leo. (Figura 3).



Figura 3. Planta de chile M-69 usada como porta injerto resistente a *Phytophthora capsici*. A) Porte de la planta patrón, B) fruto inmaduro, C) fruto maduro.

3.8.2 Sonora Anaheim.

La variedad de chile Sonora Anaheim es una planta herbácea de aproximadamente un metro de altura, de tallos glabros, hojas anchas y oblongas, flor blanca, fruto de alargado y ancho (aprox.19 cm x 4.5), posee un picor suave (500-2500 unidades Scoville); el fruto a la maduración se torna rojo, aunque el consumo es en estado verde o menos maduro. Es resistente al virus del mosaico del tabaco patotipo 0 (TMV P0) y susceptible a *Phytophthora capsici* Leo. (Figura 4).



Figura4. Planta de la variedad Sonora Anaheim susceptible *Phytophthora capsici*. A) fruto de calidad comercial, B) porte de la variedad.

III. HIPÓTESIS

La interacción de *Phytophthora capsici* Leo- *Capsicum annuum* L. induce la expresión de genes de resistencia y la producción de compuestos volátiles asociados a ésta, tanto en el patrón de chile resistente M-69 como en la parte aérea susceptible Sonora Anaheim injertada sobre dicho patrón.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Determinar si el perfil de expresión genética y metabolómica del patrón resistente M-69 es similar al del material susceptible Sonora Anaheim en él injertado en interacción con el fitopatógeno *Phytophthora capsici* Leo.

4.2 Objetivos particulares.

Establecer la interacción patógeno (*Phytophthora capsici* Leo.)-hospedero (*Capsicum annuum* L): porta injerto M-69, cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim.

Identificar el perfil de expresión génica en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

Identificar el perfil en la producción de compuestos volátiles en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim, asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

V. METODOLOGÍA

El experimento de campo se llevó a cabo en el Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro y el análisis de compuestos volátiles se llevó a cabo en el instituto Leibnizfürgemüse-undzierpflanzenbau en Grossbeeren Erfurt E. V. Alemania.

5.1. Establecimiento de la interacción patógeno (*Phytophthora capsici* Leo.)-hospedero (*Capsicum annuum* L): Porta injerto M-69, cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim.

5.1.1 Obtención de plántulas del cultivar susceptible Sonora Anaheim y el patrón resistente M-69.

10 días previos a la siembra de la variedad Sonora Anaheim, se colocaron 200 semillas de M-69 en remojo en agua corriente a temperatura ambiente por 24 horas y se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades previamente desinfectadas con sales cuaternarias (10 mililitros/litro de agua), se usó como sustrato vermiculita. Las plantas germinaron bajo las siguientes condiciones: 32 °C humedad relativa del 32.3 % y 15,900 lux en el día; 23°C, 52% humedad relativa y cero lux por la noche.

10 días posteriores a la siembra del patrón resistente M-69, se sembraron 200 semillas de la variedad Sonora Anaheim (Seminis) en charolas de poliestireno de 200 cavidades previamente desinfectadas con sales cuaternarias (10 mililitros/litro de agua) bajo las mismas condiciones que las semillas del patrón resistente M-69.

5.1.2 Elaboración de injertos.

Los injertos se elaboraron por el método de tubo de silicón (Oda, 1999) cuando las plantas de Sonora Anaheim contaban con seis u ocho hojas verdaderas y M-69 con seis u ocho hojas verdaderas y una altura aproximada de 10 centímetros (Figuras 5 y 6).



Figura 5. Plantas de Sonora Anaheim (izquierda) y accesión M-69 previa injertación (derecha).



Figura6. Planta injertada Sonora Anaheim (parte aérea) y accesión M-69 (parte radical).

Los injertos se colocaron en macetas de ocho centímetros de diámetro y seis centímetros de altura las cuales se llenaron con vermiculita a capacidad de campo con solución nutritiva (Anexo 1), posteriormente las macetas se colocaron dentro de bolsas de poli papel y se cerraron con cinta de enmascarar para evitar la desecación (Figura 7).



Figura 7. Plantas injertadas dentro de bolsas de poli papel para evitar desecación y favorecer la cicatrización.

Los injertos se colocaron dentro de una cámara de crecimiento, Artificial Climate Chamber Rtop Series TM (Figura 8). Las condiciones iniciales fueron de 80% de humedad relativa, 26°C, 2200 luxes y 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Al segundo día se aumentó la temperatura a 28°C.



Figura 8. Cámara usada para promover la unión entre el injerto de Sonora Anaheim y el patrón resistente M-69.

A los 12 días se aumentó la luz a 5500 luxes y se inició la aclimatación abriendo la parte apical de las bolsas de poli papel pero sin sacar las macetas de las bolsas. Las plantas injertadas fueron nuevamente con la solución nutritiva (Anexo 1). A los 13 días post injerto se hizo la primera poda de brotes laterales de la planta receptora (M-69).

A los 16 días post injertación se tomaron las medidas del tallo de las plantas injertadas y no injertadas a un centímetro de la cicatriz en el caso de las plantas injertadas y un centímetro debajo de los cotiledones de acuerdo con García y col (2010).

5.1.3 Confrontación del patrón resistente M-69, las plantas injertadas (M-69/Sonora Anaheim) y el cultivar susceptibles Sonora Anaheim con *Phytophthora capsici* Leo.

La cepa de *Phytophthora capsici* Leo.C7P8 fue proporcionada por el INIFAP y preparada 10 días antes de la inoculación sembrándola en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Una vez listo el inóculo, se aplicó directamente en la base del tallo por medio de discos de agar de 2.54 centímetros de diámetro de acuerdo con Cúndom (2004) (Figura 9).

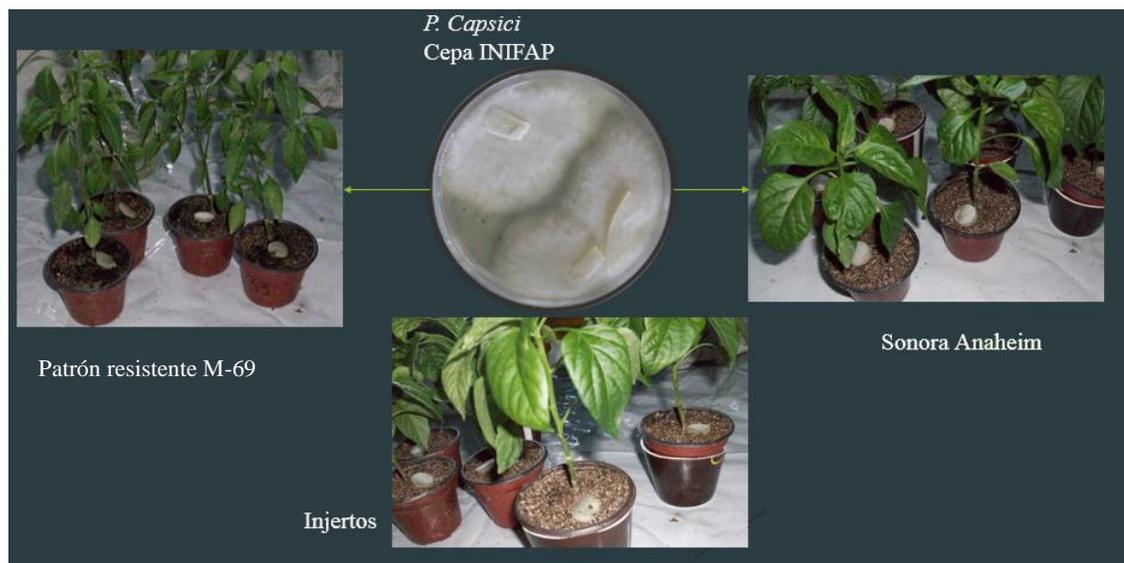


Figura 9. Establecimiento de la interacción planta-patógeno.

5.2 Identificación del perfil de expresión génica en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

5.2.1 Recolección de muestras y extracción de ARN total.

Una vez inoculadas las plantas con el patógeno *Phytophthora capsici*, se tomaron hojas de la parte apical a las 24 horas post inoculación y se congelaron con nitrógeno líquido, posteriormente fueron pulverizadas en un mortero para la extracción de ácidos nucleicos (Figura 10). La extracción del ARN se llevó a cabo usando el protocolo de Tizol® (Anexo 2).

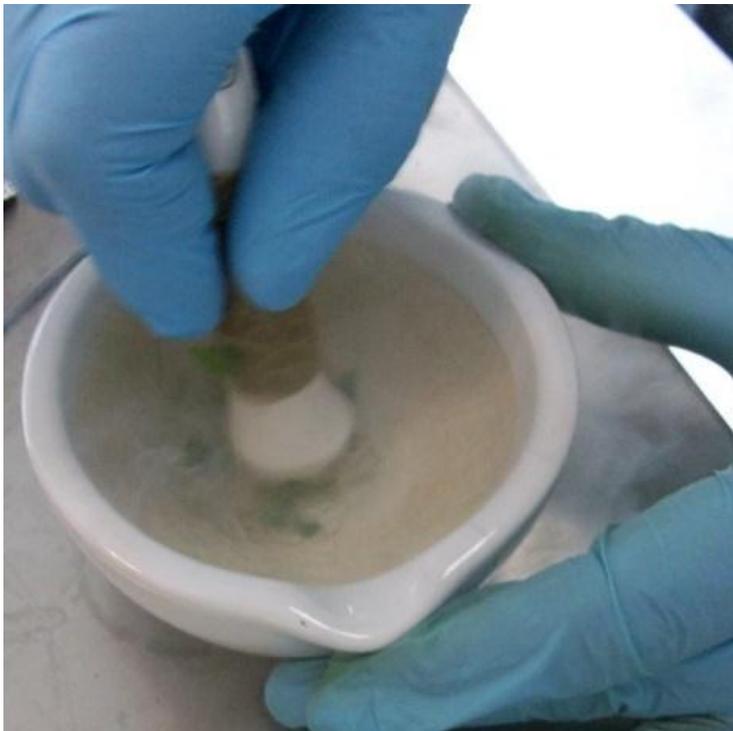


Figura 10. Molienda de las muestras vegetales con nitrógeno líquido.

5.2.2 Elaboración de microarreglos para la identificación del perfil de expresión génica.

Las muestras de ARN (anexo 3) fueron hibridadas en el Instituto de Medicina Genómica de acuerdo a su protocolo para su posterior procesamiento en la elaboración de microarreglos. Los microarreglos fueron elaborados por Affimetrix sobre el GeneChipTomatoGenomeArray™ número 900739. Las iteraciones entre los tratamientos para detectar cambios diferenciales en la expresión génica, después de 24 horas, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Iteraciones post inoculación con *P. capsici* leo

clave	Descripción
1	patrón resistente M-69 sin inóculo (<i>P. capsici</i>) VS patrón resistente M-69 resistente inóculada con <i>P. capsici</i>
2	Planta injertada sin inóculo (<i>P. capsici</i>) VS Planta injertada con inóculo (<i>P. capsici</i>)
3	Planta susceptible Sonora Anaheim sin inóculo (<i>P. capsici</i>) VS Planta susceptible Sonora Anaheim con inóculo (<i>P. capsici</i>)

Los datos fueron procesados con los programas: Bioinformático R y el estadístico JMP8. Para determinar la identidad de los genes encontrados se usaron las siguientes bases de datos: SOLGENOMICS, NCBI, TAIR, GENOME.JP, GENEVISIBLE, miBASE, UNIPROT, INTERPRO.

5.3 Identificación del perfil en la producción de compuestos volátiles en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim, asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

5.3.1 Captura y análisis de compuestos volátiles por medio del dispositivo Twister™.

A las 24 horas post inoculación con *P. capsici* se colocaron piezas de polidimetilsiloxano (Twister™) como medio de adsorción de compuestos gaseosos de acuerdo con Baltussen y col. (1999) sobre la superficie foliar en los tratamientos: patrón resistente M-69 con y sin inóculo; cultivar susceptible Sonora Anaheim con y sin inóculo y planta injertada M-69/Sonora Anaheim con y sin inóculo. Después de una hora de exposición, los dispositivos Twister™ se retiraron de la superficie foliar y se colocaron dentro de viales de cristal (Figura 11). Posteriormente fueron transferidos a un equipo de desorción termal en donde los analitos fueron termalmente liberados en un equipo para cromatografía de gases acoplado a masas.



Figura 11. Dispositivo Twister™ sobre la superficie de una hoja para captura de compuestos volátiles.

El análisis de compuestos volátiles en las iteraciones, fue hecho por la técnica de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS). Para tal efecto, Se usó un cromatógrafo Agilent 7010 acoplado a un Mass Hunter 702 de Agilent. La columna usada para la cromatografía fue una columna AnalyticalScience™ BP5MS de 30 m x 250 µm.i.d., 0.25 µm.

El cromatógrafo de gases acoplado a masas fue operado bajo el siguiente programa:

40°C por 3 minutos, posteriormente la temperatura se manejó en incremento de 2°C por minuto hasta 60°C; se mantuvo en ésta temperatura por dos minutos, a continuación se usó un incremento de 3°C por minuto hasta alcanzar 180°C y se mantuvo en ésta temperatura por 10 minutos isothermalmente. Durante la cromatografía se usó gas Helio con flujo constante de 1.2 ml por minuto

El programa para el crioenfoco (concentración por frío apara analitos de bajo punto de ebullición) comenzó a -100°C, posteriormente la temperatura se incrementó 12°C por minuto hasta 280°C, se mantuvo en ésta temperatura por 3 minutos.

El Twister™ fue colocado en una unidad de desorción termal de Gerstel con el siguiente programa: la temperatura de inicio fue de 25°C, posteriormente subió hasta 100°C por minuto hasta alcanzar 250°C y se mantuvo a ésta temperatura por 4 minutos.

El análisis de masas se ejecutó en modo *full-scan* con un rango de masa/carga (m/z) de 50-300 y una energía de impacto de electrones de 70ev. Los datos fueron analizados con el software MPP 13.1 de Agilent (los análisis estadísticos incluyeron ANOVA y una $p \leq 0.01$; foldchange ≥ 2 (FC)). Los compuestos fueron identificados por comparación de espectros de masas tentativamente usando las bibliotecas de Wiley 10N11.L y las librerías del NIST 14.L

La identificación de los compuestos volátiles producidos en las iteraciones se realizó haciendo uso de las bases de datos: PUBCHEM de NCBI, TOXNET del US National Lybrary of Medecine, webbook del NIST, Common Chemistry, The European Bioinformatics Institute.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento de la interacción planta-patógeno.

6.1.1 Determinación de compatibilidad en las plantas injertadas.

Después de 10 días posteriores al injerto, hubo un 6 % de incompatibilidad. En las plantas injertadas no compatibles se observó necrosis entre la parte aérea Sonora Anaheim y el patrón resistente M-69 como se observa en la figura 12.



Figura 12. Parte aérea del injerto con necrosis.

En estudios realizados sobre injertos, se ha determinado que para que se lleve a cabo la unión entre las dos partes, debe existir tolerancia fisiológica y por consecuencia, la fusión de los protoplastos de las plantas unidas por contacto (injertadas) en los primeros días de vida de las plantas (Nosrtog, 1981; Moore, 1984). Durante el proceso de injertación, se llevan a cabo eventos importantes: Entre las células rotas y colapsadas de la interface del injerto se forma una capa necrótica, se incrementa la actividad citoplasmática a lo largo de la capa de células adyacentes a las superficies cortadas habiendo acumulación de dictiosomas durante las primeras 6 horas después de la injertación iniciándose la

adhesión del injerto al patrón a las 24 horas post injertación por la división celular y da como resultado formación del callo (Moore, 1884), que fragmenta paulatinamente la capa necrótica formada a causa del corte a los 2 o 3 días post injertación. Después de la formación del callo celular en el punto de unión de un injerto, existe la diferenciación cambial que conlleva a la unión vascular presumiblemente por la producción de auxinas en un flujo basipetalo y la producción de exudados del floema y proteínas solubles (Moore, 1984; Pina, 2005) en la interface del injerto después de los 14 días post injertación (Nosrtog, 1981). En este caso, los injertos de M-69 y Sonora Anaheim comenzaron a unirse por completo posterior a los 10 días post inóculo, lo cual concuerda a lo descrito anteriormente.

El concepto “mensaje hormonal” establece que las hormonas se producen en una parte de la planta y afectan otra parte remota, de acuerdo a esto las auxinas se producen en los brotes apicales y son translocadas hacia la raíz, en donde interfieren con el desarrollo radicular, morfología y funcionamiento, así mismo las auxinas han mostrado influencia en la producción de citoquininas las cuales son producidas en la raíz y translocadas hacia los brotes apicales en donde controlan procesos importantes de desarrollo (Alonia y col., 2010).

En injertos no compatibles se presentan los primeros eventos antes mencionados, sin embargo, en lugar de producirse dictiosomas, se lleva a cabo la suberización en las células adyacentes colapsadas e inicia la senescencia del callo celular recién formado; generándose una capa necrótica y gruesa en la interface del injerto, por lo que no se lleva a cabo la rediferenciación celular y la abscisión ocurre durante los primeros días o entre tres a cinco semanas posteriores a la injertación según el caso (Norstog, 1981). La incompatibilidad se da por intolerancia fisiológica y ocurre cuando se injertan plantas de diferentes géneros o especies dando como resultado la interrupción del paso de iones y una respuesta hipersensible (también puede ser inducida por patógenos o por heridas, respuesta a toxicidad). Por lo tanto, la incompatibilidad es un ejemplo más del mecanismo de defensa en plantas (Nosrtog, 1981; Wang, 2011). En este

experimento se observó que hubo un bajo porcentaje de incompatibilidad en donde la capa necrótica formada y el desprendimiento de ambas partes del injerto, concordando con lo descrito por los autores mencionados.

En este caso, los injertos entre la accesión M-69 y Sonora Anaheim presentaron compatibilidad en un 94% por la presencia de callo celular en las uniones del injerto y del porta injerto (Figura 13). Esto concuerda con los hallazgos relacionados con la fisiología del injerto, pues así mismo se ha encontrado que la cantidad de asimilados es proporcional a la edad de los injertos compatibles, es decir, se reestablece el flujo por la conexión de los haces vasculares. Para comprobar este fenómeno, se ha observado que en plantas compatibles regadas con solución ^{14}C y carboxyfluoresceína (tinción fluorescente) se reestablece el flujo acropétalo, por otro lado, en injertos no compatibles el transporte es débil o inexistente (Schöning y Collmann, 1997).

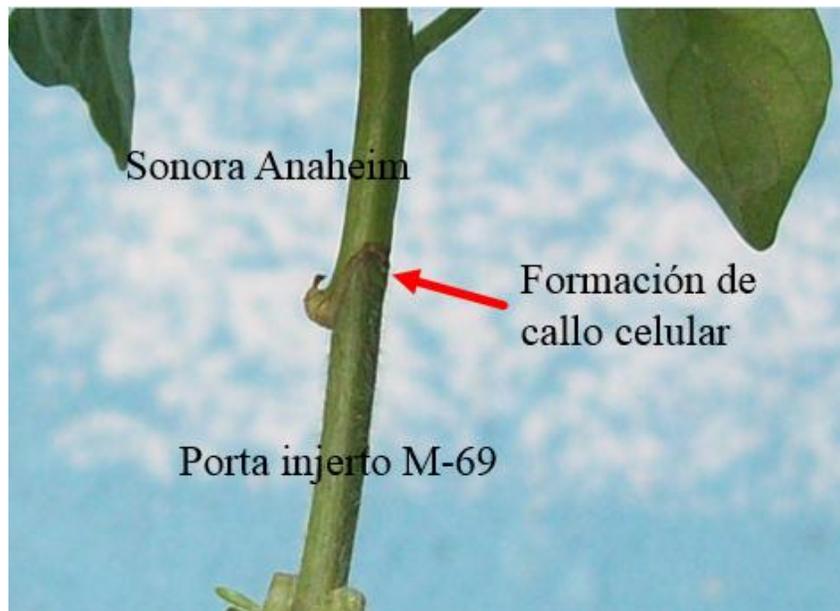


Figura 13. Unión de haces vasculares en el injerto y formación de callo celular.

En el análisis de varianza aplicado al grosor del tallo, se observaron diferencias significativas en las plantas injertadas con respecto a las no injertadas. En las plantas de la variedad comercial Sonora Anaheim sin injertar se obtuvo el mayor grosor con respecto a las plantas no injertadas del porta injerto M-69 y a las plantas injertadas entre ambos genotipos como se observa en la figura 14.

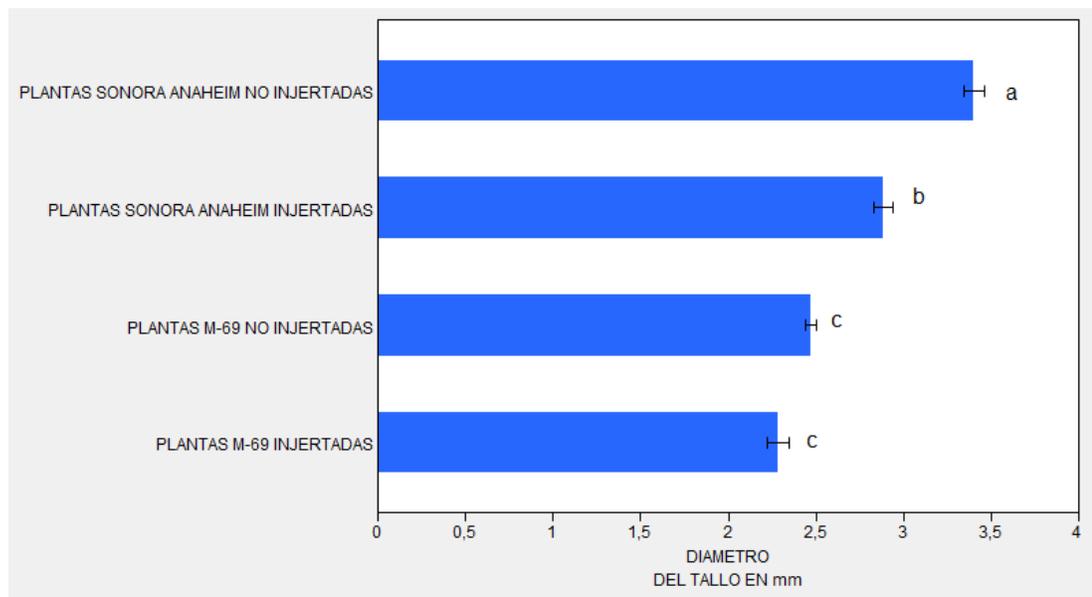


Figura 14. Análisis de varianza aplicado al diámetro de las plantas injertadas y no injertadas. $P < 0,05$, cv 19,3%. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Lo anterior sugiere que es posible la existencia de un efecto del patrón resistente M-69 sobre la variedad injertada Sonora Anaheim por la existencia de factores de crecimiento y otras moléculas responsables del funcionamiento óptimo en una planta como como nutrientes y agua. Así mismo, el porta injerto influye en aspectos morfológicos, como el grosor del tallo y hojas principalmente de la planta injertada, ya sea incrementando o disminuyendo su capacidad de absorción (Martínez y col., 2010). En otras palabras, los disturbios fisiológicos causados por la discontinuidad vascular durante la unión del injerto pueden llevar a la inhibición del crecimiento provocada por la restricción de la comunicación entre el porta injerto y el injerto (Martínez y col., 2010). En este caso se observa que las plantas de susceptibles del cultivar Sonora Anaheim injertadas presentaron una disminución significativa en el grosor de su tallo.

Al respecto, en plantas injertadas con CM-334 considerado como resistente a *P.capsici*, se observaron diámetros que oscilaron entre 2.13-2.89 milímetros en combinación con injertos de chile ancho y chilaca (Osuna y col., 2012), siendo cercanos a los diámetros obtenidos en el presente estudio, en donde se observó un diámetro promedio del porta injerto de 2.3 milímetros en combinación con Sonora Anaheim, por otro lado, en un estudio elaborado por García y col. (2010), se observó una reducción en el diámetro del tallo de CM334 sin injertar y un aumento al ser injertado con el cultivar Rebelde, caso contrario a lo sucedido en este estudio en plantas injertadas de M-69 y Sonora Anaheim en donde no hubo cambio significativo en el grosor del tallo del patrón resistente.

6.1.2 Incidencia y severidad de la enfermedad de la marchitez del chile.

Se presentó un 100% de incidencia de la enfermedad en las plantas susceptibles correspondientes al cultivar Sonora Anaheim (Figura 15). Por otra lado, no se presentó ningún síntoma relacionado con la incidencia de la enfermedad de la marchitez del chile en las plantas injertadas M-69/Sonora Anaheim, ni en el patrón resistente M-69 (Figura 16), puesto que ya se ha comprobado su resistencia (Urrutia, 2011) lo cual confirma en este estudio su alta resistencia a *P. capsici* causante de la enfermedad de la marchitez del chile.



Figura 15. Sintomatología de la enfermedad de la marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici*. Leo en el cultivar susceptible Sonora Anaheim. 1) Inicio de

clorosis, 2) Marchitamiento/defoliación, 3) Secadera, 4y 5) Muerte de la planta; 6) Acercamiento a la

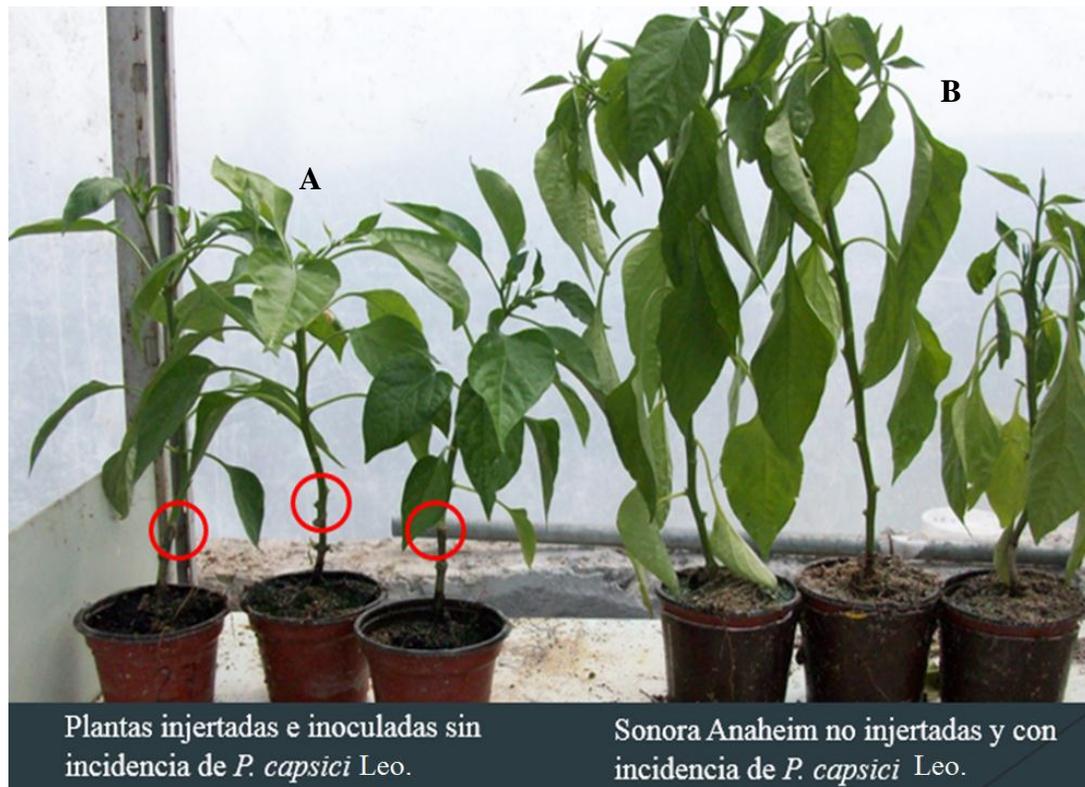


Figura 16. Comparación de síntomas en las plantas inoculadas con *P. capsici*. A) Plantas injertadas M-69/Sonora Anaheim sin síntomas de marchitamiento (circuladas en rojo), B) Plantas no injertadas Sonora Anaheim con los primeros síntomas de la enfermedad de la marchitez del chile.

El inicio de la de la sintomatología general de la enfermedad de la marchitez del chile, se presentó a los 7 días post inoculación en este experimento, sin embargo se ha reportado que la incidencia de la enfermedad de la marchitez del chile puede ocurrir hasta 15 días después de la inoculación de acuerdo a García y col. (2010), por lo que estas observaciones sugieren que la cepa C7P8 de *P. capsici* es muy agresiva.

A los 30 días post inoculación, las plantas susceptibles del cultivar Sonora Anaheim habían muerto. La sintomatología presentada por las plantas susceptibles fue clorosis, marchitamiento, defoliación, pudrición en la base del tallo y muerte de la planta. La severidad de la enfermedad fue alta como se muestra en la figura 17 en donde se cuantifica el área bajo la curva del progreso de la

enfermedad. En el caso de las plantas injertadas y la accesión M-69 descrita como resistente no se presentaron síntomas de la enfermedad de la marchitez del chile durante los 30 días en los que las plantas susceptibles murieron (Figura 17). El total de las plantas injertadas sobre M-69 mostraron resistencia contundente al ataque de *Phytophthora capsici* igual que las plantas injertadas sobre CM-334, tal como lo reporta García y col. (2010).

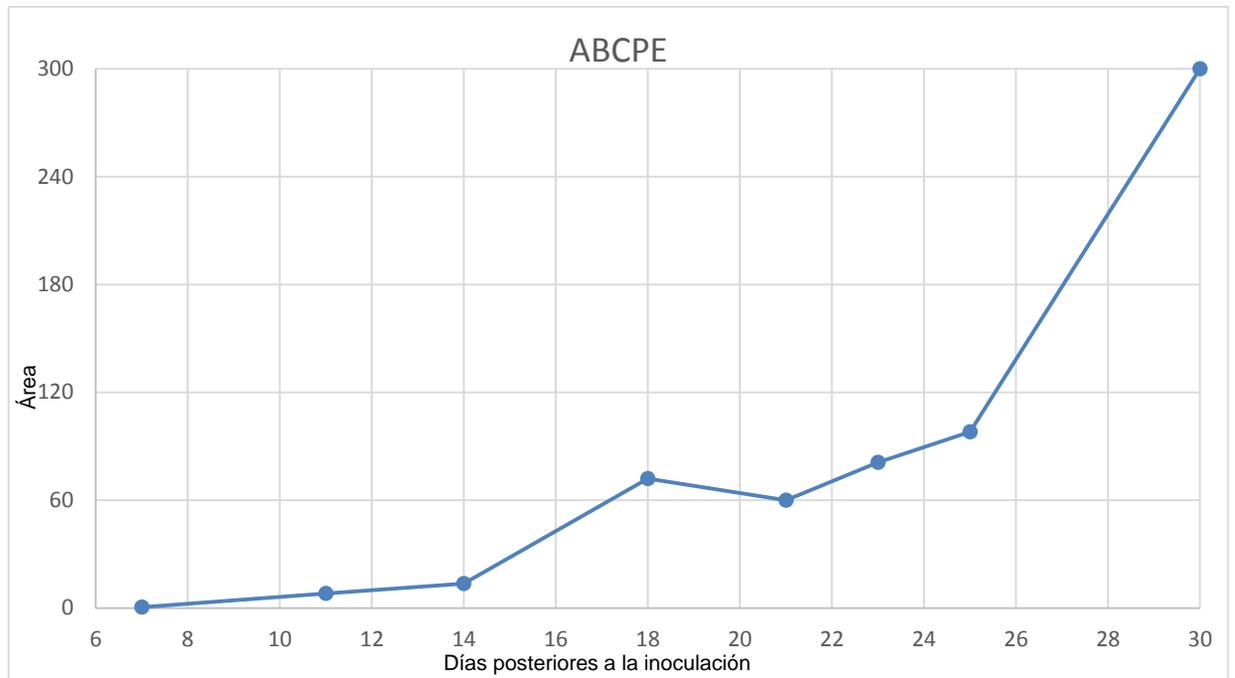


Figura 17. Severidad de la enfermedad de la marchitez del chile en 30 días post inoculación con *P. capsici*.

6.2 Identificación del perfil de expresión génica en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

Se detectaron 10, 101 genes en total, de los cuales sólo 507 fueron diferenciales para las tres iteraciones antes mencionadas. Al final se seleccionaron 45 genes en función de los regulados positivamente y negativamente en el patrón resistente M-69 para poder detectar genes de resistencia en éste y que mostraron un patrón similar de expresión parte aérea injertada y así mismo detectar si la parte aérea injertada tuvo similitud con el patrón de expresión del cultivar susceptible Sonora Anaheim. Los 507 genes encontrados como diferenciales fueron clasificados de acuerdo a la función biológica (ontología genética) como se muestra en la figura 18.

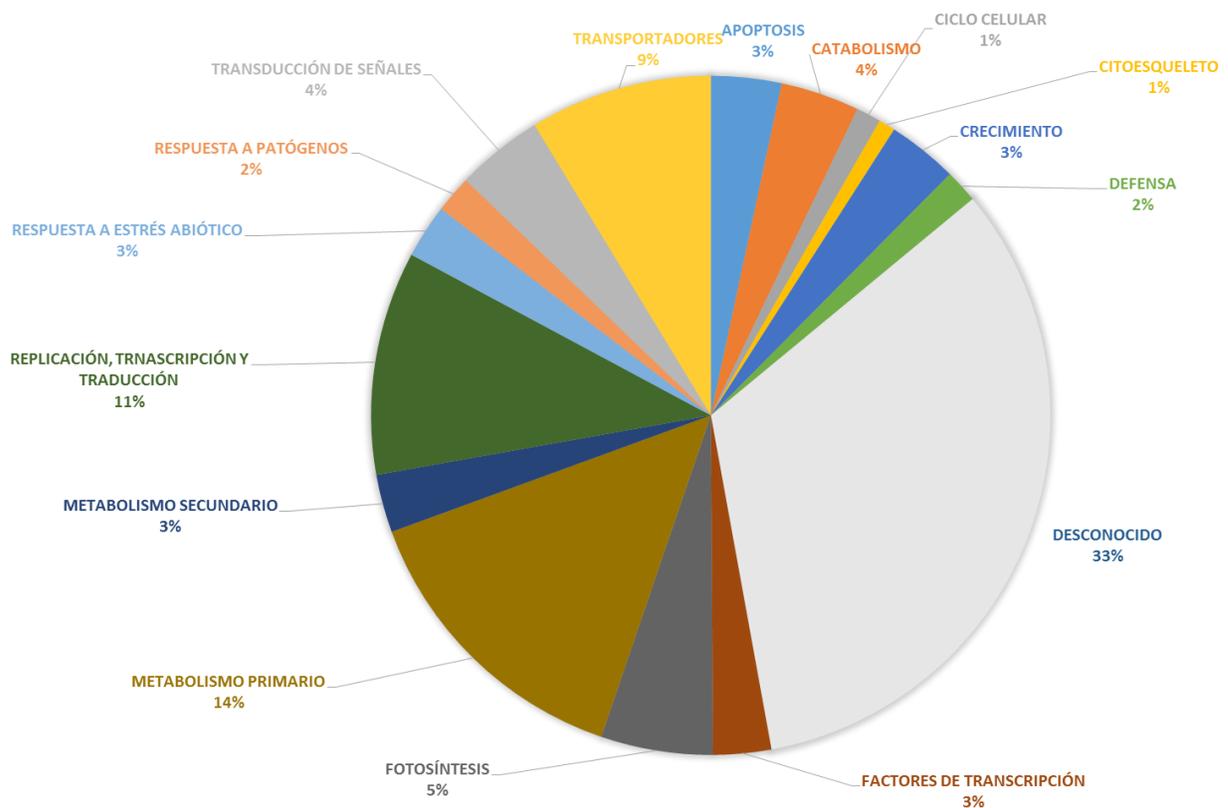


Figura 18. Clasificación general de los genes diferenciales encontrados en el experimento de acuerdo a su función biológica.

La clasificación general de los genes diferenciales expresados en este experimento, muestra que una gran cantidad de estos no tienen una función biológica precisada y además representan un porcentaje importante (33%). Por otro lado, los porcentajes de expresión en procesos biológicos como metabolismo primario 14%, procesos celulares 11%, transporte 9% y fotosíntesis 5% son importantes debido a que son indispensables para la homeóstasis de la planta; sin embargo, los porcentajes destinados a la respuesta a factores ambientales es bajo pues en defensa sólo hubo el 2%, de respuesta a patógenos 2% y de respuesta a estrés 3%. Al respecto, Richinis y col. (2010) encontraron que en la interacción de SCM334 y *P. capsici* 24 horas post inoculación, el 35% de los genes correspondieron a metabolismo primario, el 7% en homeóstasis de la planta, 8% destinado a transporte, respuesta a estímulos 17% y sólo el 2% a defensa. En este experimento se observó una tendencia parecida con respecto a los genes destinados para la defensa exclusivamente.

En cuanto a la expresión de genes *Up regulated* (“regulados positivamente”) y *Down regulated* (“regulados negativamente”) por cada caso, se observan diferencias de expresión entre las tres iteraciones. El resultado mostró pocos genes regulados positivamente y regulados negativamente en el patrón resistente M-69 en comparación con la planta injertada y la susceptible como se observa en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Número de genes diferenciales expresados a las 24 horas posteriores a la interacción con *P. capsici*.

patrón resistente M-69 sin inóculo VS patrón resistente M-69 resistente con inóculo			Planta injertada sin inóculo VS Planta injertada con inóculo			Planta susceptible Sonora Anaheim sin inóculo VS Planta susceptible Sonora Anaheim con inóculo		
Up	Down	Neutros	Up	Down	Neutros	Up	Down	Neutros
3	20	484	202	86	219	148	84	275

En las figuras 19, 20 y 21 se muestra a detalle el porcentaje de los genes regulados positivamente y regulados negativamente, así como su clasificación por función biológica correspondiente a cada iteración: el patrón resistente M-69, planta injertada M-69/Sonora Anaheim y la cultivar susceptible Sonora Anaheim. El color gris indica que no hubo cambio en la expresión genética (neutros o sin cambio), el color verde indica la expresión suprimida o regulados negativamente y el naranja indica una sobre expresión o regulados positivamente.

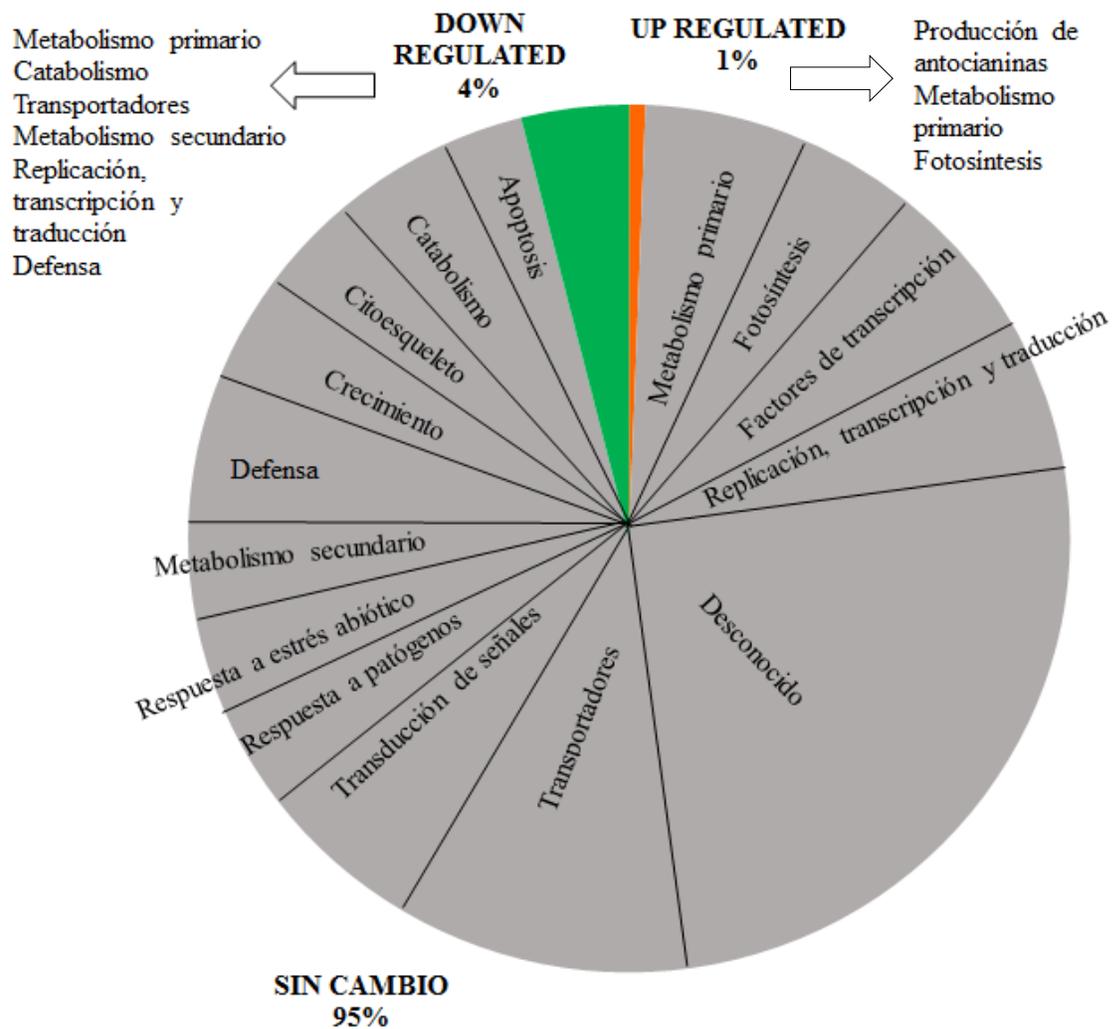


Figura 19. Porcentaje de la expresión genética diferencial en el patrón resistente M-69.

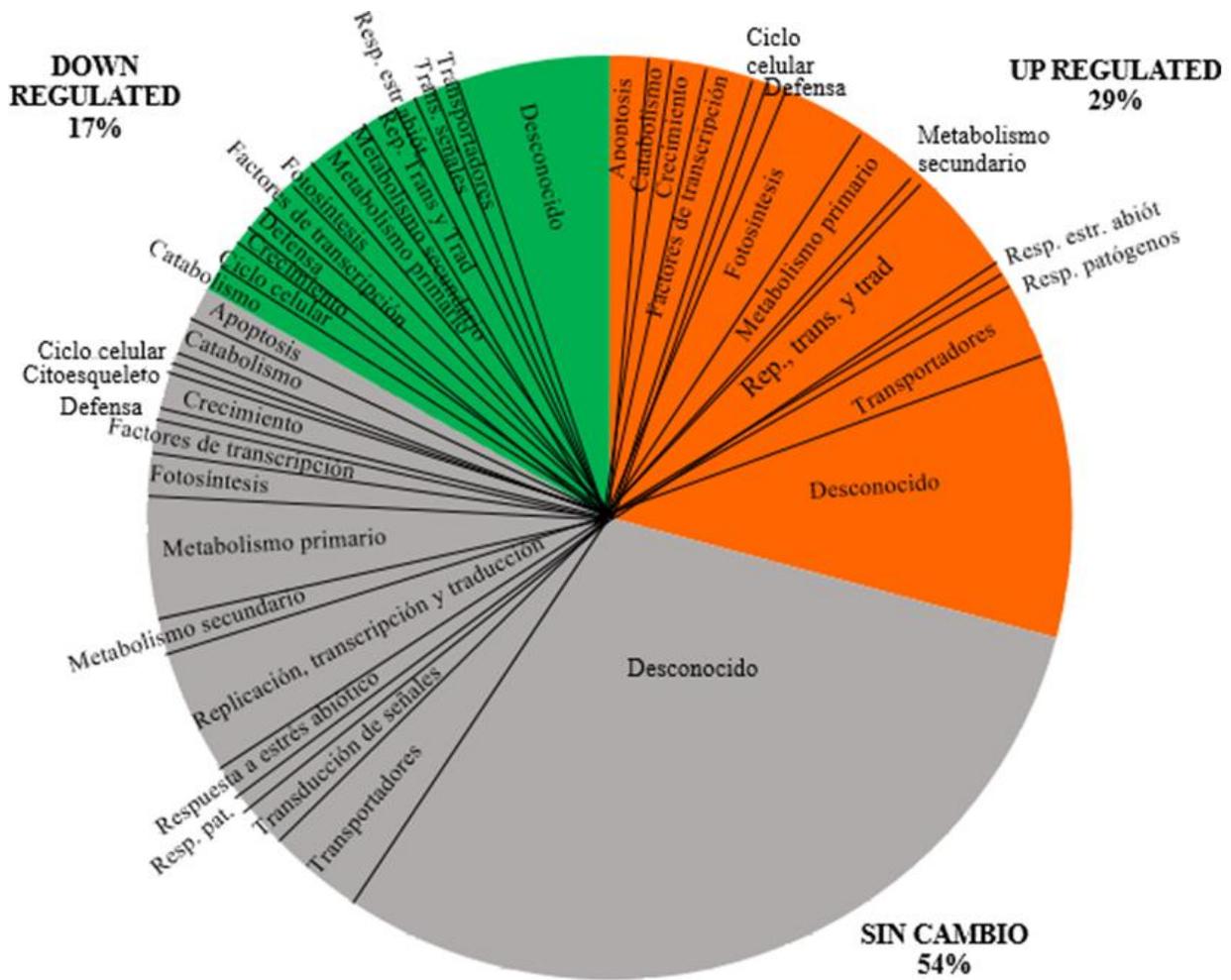


Figura 20. . Porcentaje de la expresión genética diferencial en las plantas injertadas (patrón resistente M-69/Sonora Anaheim susceptible).

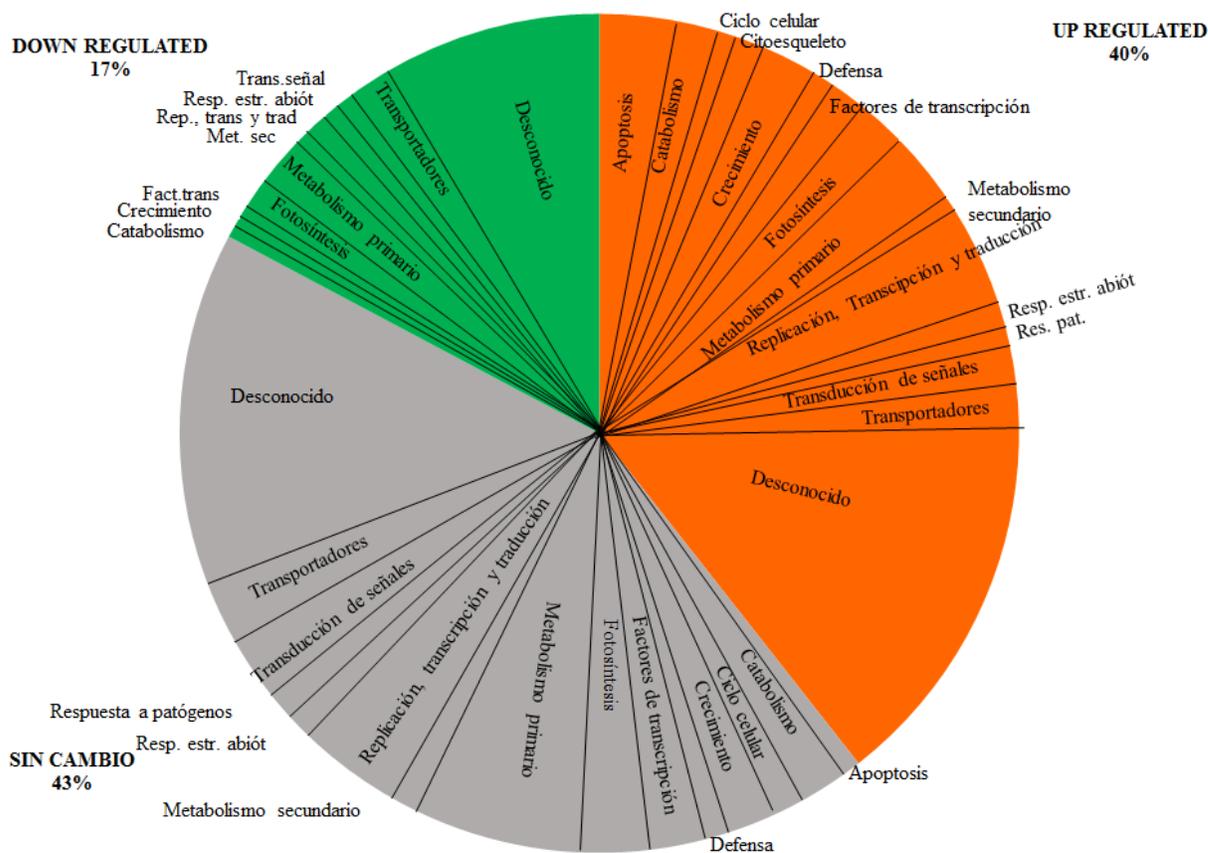


Figura 21. Porcentaje de la expresión genética diferencial en las plantas susceptibles Sonora Anaheim.

Al respecto con los porcentajes expresión, Jiang y col. (2009) observaron que en la interacción de la levadura *Cryptococcus laurentii*- tomate cherry, el porcentaje de genes relacionados con el metabolismo primario fue de 15% los cuales fueron regulados positivamente mientras que el 20% fueron regulados negativamente. En este mismo caso, de los genes con función de defensa, sólo el 8% fueron regulados positivamente y el 2% negativamente; el 1% de los genes de fotosíntesis fueron regulados positivamente mientras que el 8% fueron silenciados, además los genes con función biológica desconocida ocuparon el mayor porcentaje pues el 56% de estos fueron regulados positivamente mientras que el 46% fue regulado negativamente. En la interacción con *P. capsici*, en este estudio, la mayoría de los genes resultaron ser de función desconocida, lo cual coincide en el alto porcentaje de su expresión ya sea regulado positiva o negativamente;

así mismo el porcentaje de genes destinados a la defensa tiende a ser bajo en todos los casos sobre todo en el patrón resistente M-69. Al respecto, en un estudio hecho con *P. capsici*-SCM334 sólo el 17% de los genes se relacionaron con la respuesta a estímulos (Richinis, 2010).

En los diagramas de Venn obtenidos se muestra el número de genes que se comparten en las tres iteraciones. En la Figura 22 se observa que solo un gen regulado positivamente es compartido entre el patrón resistente M-69 y la planta injertada, a su vez ésta comparte 23 genes con la planta susceptible Sonora Anaheim. En la Figura 23 se observan las mismas iteraciones con los genes regulados negativamente y se observa que ningún gen se comparte con el patrón resistente M-69 y solo cinco genes se comparten entre la planta injertada y la planta susceptible Sonora Anaheim.



Figura 22. Número de genes regulados positivamente compartidos e individuales en las tres iteraciones en este experimento.

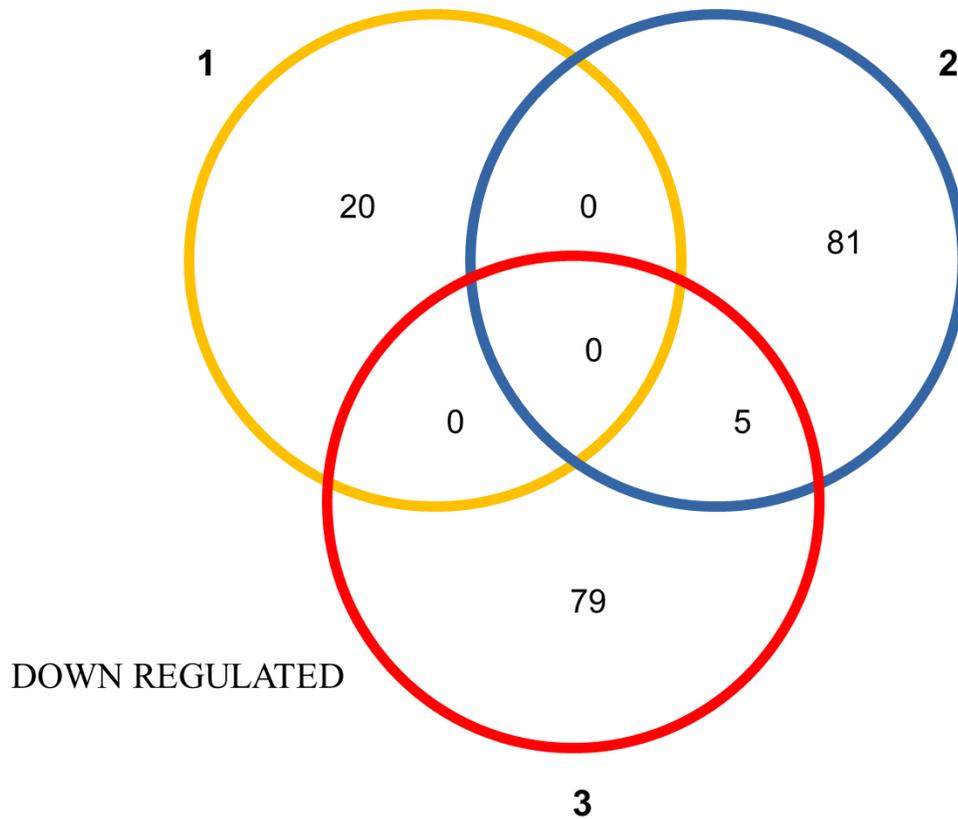


Figura 23. Número de genes regulados negativamente compartidos e individuales en las tres iteraciones en este experimento.

En el Cuadro 4 se muestran las anotaciones de 45 genes seleccionados de los 507 genes totales diferenciales regulados positivamente y negativamente en donde se muestran los valores numéricos obtenidos de los microarreglos por medio del *foldchange* ($FC -2 \leq 2$) es decir el número de veces que se expresa un gen en las tres iteraciones, de la misma forma, en la figura 24 se muestra el patrón de expresión genética en las tres iteraciones por medio de un *heatmap* utilizando los valores del cuadro 4.

Cuadro 4. Anotación de los genes identificados como diferenciales expresados en el patrón resistente (1), la planta susceptible injertada sobre el patrón resistente (2) y la planta susceptible Sonora Anaheim a las 24 horas post inoculación con *P. capsici* Leo. *genes relacionados con la respuesta a patógenos como hongos y bacterias, ▲ genes relacionados con respuesta a estrés.

Gen del microarreglo	Gen ortólogo de <i>A. thaliana</i>	Descripción funcional	Interacciones: <i>foldchange</i> por tratamiento (<i>up regulated</i> y <i>downregulated</i>)		
			1	2	3
Les.2993.3.1_at*	AT5G50850.1	función catalítica/ piruvato deshidrogenasa/ producción de metabolitos secundarios	-1,07513	1,4139657	-0,434499
Les.3267.2.S1_a_at	AT1G12780.1	UDP-glucosa 4-epimerasa que cataliza la interconversión de los nucleótidos UDP-glucosa UDP-galactosa vía intermediario UDP-4-ceto-hexosa	-1,05075	1,7968168	0,0023251
Les.494.3.S1_at▲	AT1G12780.1	Proteína de dimerización/respuesta a estrés/ regulación de la liberación de Ca ⁺ intracelular	-1,11094	0,772821	1,0851638
LesAffx.64437.1.S1_at*	AT4G15900.1	PRL1 represor basal de transcripción/ producción de antocianinas/ruta de señalización en la respuesta de defensa contra bacterias y hongos	-1,176817	1,1515693	-0,108566
Les.1013.1.A1_at▲	AT5G10100.1	Gen Aft productor de antocianinas/actividad trealosa-fosfatasa/respuesta a estrés por cambio de actividad celular (expresión genética, secreción, producción de enzimas)	1,1099699	-0,815546	0,6037684
LesAffx.53857.1.S1_at▲	AT4G15700.1	Familia de proteínas glutaredoxinas/homeostasis redox en la célula.	1,12272	1,7932665	0,9561715
LesAffx.65143.1.A1_at▲	ATCG00570.1	Citocromo b5597 del fotosistema II/ tolerancia a desecación	1,2464286	-0,354426	-0,643885
Les.210.1.S1_at▲	AT3G23730.1	Xiloglucano: Xiloglucosil-transferasa/biogénesis y organización de pared celular	-0,409811	1,0002656	1,1890614
Les.2183.2.S1_at	ATCG00480.1	Codificación de la sub unidad beta ATP sintasa en cloroplasto/hidrólisis de ATP acoplado al transporte de protones	-0,904613	1,6169733	2,8950987
Les.3016.1.S1_at	AT5G54270.1	Proteína estructural de clorofila B captadora de luz/molécula estructural	0,0440025	1,3572863	2,027733
Les.3322.2.S1_at	AT5G13630.1	Quelataza de Magnesio/procesos de biosíntesis de clorofila	-0,160179	1,2704454	1,3793275
Les.3378.3.S1_at▲	AT5G43330.1	Malatodeshidrogenasa/ procesos metabólicos de carbohidratos/ tolerancia a calor	-0,541215	1,2786291	1,0117053
Les.4008.2.S1_at▲	AT4G03210.1	Xiloglucan-endotransglucosilasa: biogénesis y organización de pared celular/enlaces glucosilicos/respuesta desecación y salinidad	-0,670168	1,545668	1,1048204
Les.4045.1.S1_at	AT1G15405.1	Desconocido	0,115514	-1,399612	1,9183529
Les.4345.2.A1_a_at	AT1G29910.1	Proteína 3 de unión de clorofila A y B	-0,178151	1,2103506	1,1825582
Les.4345.2.A1_x_at	AT1G29910.1	Proteína 3 de unión de clorofila A y B	-0,049906	1,4884185	1,2977094
Les.4345.3.S1_x_at	AT2G34430.1	Unión de clorofila/fotosíntesis/captura de luz en el fotosistema I y II	-0,015471	1,0230293	1,3955139
Les.4399.2.S1_at	ATCG00830.1	Proteína ribosomal 2 de cloroplasto/ constituyente de la unidad grande del complejo ribosomal	-0,687875	1,3803724	1,1120611

Les.5707.1.S1_at	AT5G66080.1	Familia de proteínas fosfatasa 2C del cloroplasto/proteína de desfosforilación	0,0786302	1,325536	2,3870976
LesAffx.10352.1.A1_at*▲	AT5G11200.1	Homologo al gen humano UAP56B/ helicasa DEAH box/respuesta celular a estímulos por daño al ADN/regulador de expresión genética	-0,418116	1,6184687	1,5197856
LesAffx.14665.2.S1_at	AT1G65220.1	Regulación de la iniciación de la traducción	-0,386906	1,380652	1,1052796
LesAffx.15226.1.S1_at	AT3G18600.1	Actividad helicasa dependiente de ATP/unión de ácidos nucleicos	-0,494105	1,040159	1,1283162
LesAffx.25436.1.S1_at*▲	AT5G47390.1	Regulación negativa de la actividad de la peroxidasa/reglador positivo del crecimiento celular/respuesta a cadmio, ácido abscísico, gibelinas, etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico	0,0560617	1,3012619	1,2279192
LesAffx.25797.1.S1_at▲	AT5G38630.1	Citocromo B561-1/actividad carbon-monóxido-oxigenasa/actividad oxidoreductasa/procesos de óxido-reducción	-0,749257	1,6147311	1,3851299
LesAffx.38907.2.S1_at*	AT3G51550.1	FERONIA/kinasa/respuesta a hongos/regulación negativa de la ruta de señalización de ácido abscísico/regulación negativa del crecimiento celular/respuesta a etileno/desarrollo radicular	-0,214974	1,0225309	1,6771615
LesAffx.39914.1.S1_at▲	AT5G54310.1	Activador de GTPasa/unión del AND/regulador del tráfico membranal y abscisión de órganos	-0,820019	-1,055956	1,3786157
LesAffx.48402.1.S1_at	AT4G15510.1	Centro de reacción del fotosistema II	-0,351533	1,870899	1,1225077
LesAffx.50170.1.S1_at▲	AT2G44300.1	Proteína relacionada con transporte de lípidos	0,1070339	1,5096019	2,3883348
LesAffx.61034.1.S1_at*▲	AT1G32540.2	Unión del ADN/ codificación de una proteína específica con 3 dominios dedos de zinc que actúan como reguladores positivos de muerte celular	-0,655898	1,651384	1,6096939
LesAffx.68259.2.S1_at	AT4G34460.2	Proteína beta de unión de GTP/unión de nucleótidos y proteínas/relacionado con la forma de los órganos	-0,043216	1,1830867	1,3907638
LesAffx.71307.1.S1_at*▲	AT5G58800.1	Familia de proteínas quinonareductasa/actividad oxido reductasa/respuesta a estrés oxidativo/regulación negativa de la transcripción	-0,495719	1,1699883	1,006974
LesAffx.846.2.S1_at*▲	AT4G19420.2	Pectin-acetil-transferasa/catividadcarboxil-esterasa/organización de la pared celular	-0,340575	1,1519463	1,0193796
LesAffx.163.1.S1_at	AT1G19600.1	Proteína carbohidrato-kinasa/fosforilación	0,0732147	1,2267961	-1,106068
Les.2692.1.A1_at*▲	AT1G22070.1	Respuesta de defensa a bacterias/respuesta hipersensible en plantas/regulación de la transcripción y templado de ADN/resistencia sistémica adquirida/ruta de señalización mediada por ácido salicílico	0,2004916	-1,032941	-0,148816
Les.2753.1.S1_at	AT4G29160.1	Formación intraluminal de vesículas/transporte vacuolar y de proteínas	0,155757	-0,132744	-1,061203
Les.2868.1.S1_at	AT5G45600.2	Homologo al gen humano GSA41/regulador negativo de la floración por la acetilación de la histona 4/regulación del fotoperiodo y el paso de estado vegetativo a reproductivo/regulación de transcripción y templado de ADN	0,2599752	-1,484969	-0,185055
Les.2876.2.S1_at▲	AT5G03720	<i>Solanum lycopersicum</i> factor de transcripción A3 por estrés al calor	-0,017302	-1,071753	-1,014291
Les.4691.1.S1_at	AT4G39690.1	Desconocido	0,3515115	-1,320981	-1,316264
LesAffx.44987.1.S1_at*	AT1G17050.1	SPS2 (Solanesildifosfato sintasa 2), trans-octapreniltransferasa/ biosíntesis de isoprenoides	-1,214009675	0,44062989	0,424676719
Les.2578.1.S1_at*▲	AT3G06650.1	ACLB-1; ATP citrato liasa/biosíntesis de metabolitos secundarios	0,250793346	1,016897883	0,039389134

Les.29.1.S1_at*▲	AT1G70310.1	SPDS2 (espermidina sintasa 2); espermidina sintasa	-0,022128789	1,151184031	-0,740177222
Les.3383.1.S1_at*▲	AT3G48990.1	Proteínas dependientes de AMP sintasa y ligasas (MalonilCoA sintasa)/transporte de lípidos, biosíntesis de metabolitos secundarios.	-0,553354814	0,790379246	-1,138463785
Les.3510.1.S1_at*▲	AT4G15560.1	CLA1, 1-deoxi-Dxilulosa-5-fosfato sintasa, biosíntesis de metabolitos secundarios	-0,419724454	0,578699099	1,041589874
Les.5017.1.S1_at*▲	AT3G46130.1	MYB111 factor de transcripción/ formación de flavonoles por consecuencia de procesos oxidativos de los intermediarios de los flavonoides flavonones y dihidroflavonoles.	0,403663132	-0,163047887	-1,097326431
Les.2182.3.S1_at*▲	AT2G22250.1	Prefenatoaminotransferasa (PAT) amino tranferasa clase 1 y 2/ metabolismo de la fenilalanina	-0,056002057	-0,27653942	1,420146449

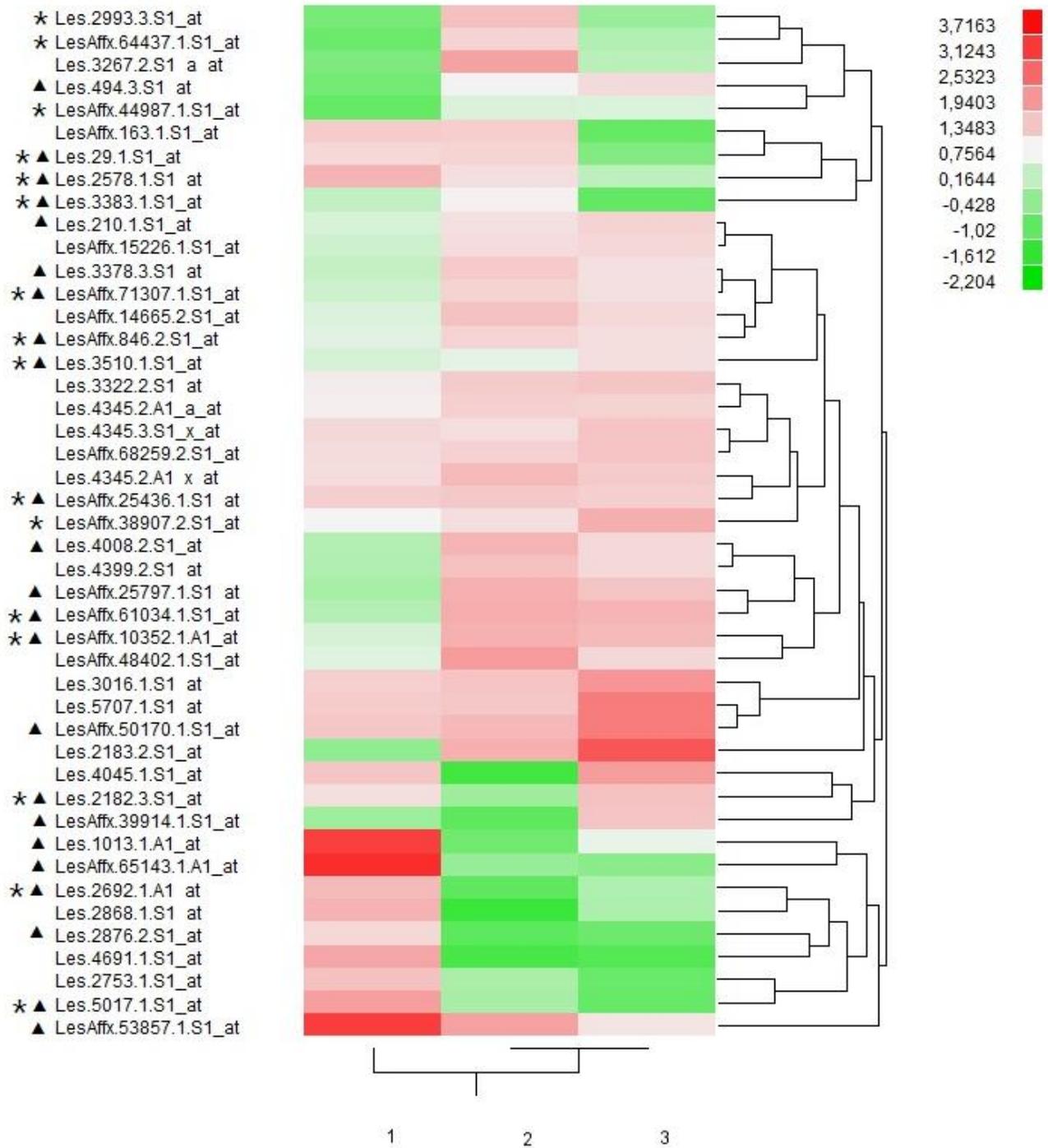


Figura 24. *Heatmap* de los genes identificados como diferenciales expresados en el patrón resistente M-69 (1), la planta susceptible injertada sobre el patrón resistente (2) y la planta susceptible Sonora Anaheim (3) a las 24 horas post inoculación con *P. capsici*.

En el *heatmap* se muestra el patrón de expresión genética diferencial entre los tres casos de iteración, en éste se observa que los genes regulados positivamente comparten el perfil de expresión principalmente entre la planta injertada y el cultivar susceptible Sonora Anaheim en 24 genes. Esto podría ser observado debido a que la planta injertada es el mismo genotipo susceptible Sonora Anaheim injertado solamente sobre otro genotipo distinto. Por otro lado, sólo 13 genes de la planta injertada tienen un patrón de expresión similar al del patrón resistente M-69.

Se observa también, que en la parte susceptible injertada hay expresión positiva en tres genes relacionados con la respuesta a patógenos y a estrés como AT4G15900.1 y AT5G50850 que no se encuentran expresados tanto en el patrón resistente M-69 ni en el cultivar susceptible Sonora Anaheim. Estos están involucrados en la producción de antocianinas y en metabolismo secundario general. Por otro lado, existe una regulación negativa del gen AT2G22250.1 en la parte susceptible injertada que está involucrado en el metabolismo de la fenilalanina la cual está involucrada en el metabolismo secundario de las plantas y el cuál se encuentra expresado en el patrón resistente y en el cultivar susceptible posiblemente, siendo posible que la regulación negativa en la parte aérea injertada no sea necesario expresar dicho gen puesto que está aislada del suelo infectado; así mismo hay represión del gen AT5G54310.1 en el patrón resistente M-69 y en la parte aérea injertada y que está involucrado con la abscisión de órganos como hojas, flores o frutos, no obstante el mismo gen está regulado positivamente en la variedad susceptible por lo que posiblemente la inoculación con *P. capsici* Leo., active su expresión indicando que el cultivar susceptible está en estado crítico de estrés a comparación del patrón resistente.

En el patrón resistente existe sobre expresión del gen AT5G10100.1 involucrado en la producción de antocianinas que producen la coloración de las plantas y además interactúan en la respuesta a estrés causado por insectos, patógenos y daños por luz ultravioleta (Qi y col., 2011; Shin y col., 2015). Los genes AT1G22070.1, AT5G03720, AT3G46130.1 están relacionados con el

transporte por vacuolización, la producción de flavonoides y estrés al calor los cuales se sobre expresados solamente en el patrón resistente M-69 por lo que se observa que existe mayor actividad en el metabolismo primario y en la defensa a comparación del cultivar susceptible Sonora Anaheim. Estos genes no se encuentran regulados positivamente en la planta injertada ni en la variedad susceptible Sonora Anaheim, además el gen AT4G15700.1 está sobre expresado en el patrón resistente M-69 el cual está relacionado con la homeóstasis redox en casos de alta exposición a la luz u otras fuentes que causen estrés oxidativo por liberación de radicales peróxido durante una reacción híper sensible por lo que es otro indicio que puede explicar la resistencia en M-69 (Grant, 2001; Awad1 y col., 2015; Sevilla y col., 2015) a comparación de la planta injertada y de la planta susceptible.

La síntesis de espermidina (AT1G70310.1) (fenolamidas y poliaminas) juega un rol importante como fitoalexina o fitoanticipina en resistencia a patógenos, resistencia a desecación, estrés salino e incluso a luz ultravioleta (Dong y col., 2015), así mismo se combina con otras moléculas como lignanos y proteínas para llevar a cabo otras funciones biológicas (Imamura y col., 2015). La espermidina también actúa como mediadora en la respuesta híper sensible como consecuencia de la disfunción mitocondrial por lo que se activa la actividad mitogénica de las proteínas MAPK que están relacionadas directamente con la defensa en las plantas y con la ruta de señalización de WIPK (proteína quinasa inducida por heridas) y la proteína Kinasa inducida por ácido salicílico (SIPK) (Berberich y col., 2015). En este experimento, la espermidina parece estar influenciada por el patrón resistente puesto que está regulada positivamente en ambos, patrón e injerto pero no en la variedad susceptible Sonora Anaheim del mismo modo el gen AT3G06650.1 se expresa de forma similar entre el patrón resistente M-69 y la parte aérea susceptible. Este gen codifica para la ATP citrato liasa que cataliza el citrato a oxalato y acetil coenzima A en el citosol de la célula y actúa como regulador en el cambio del metabolismo de carbohidratos a ácidos orgánicos, ácidos grasos, producción de isoprenoides, flavonoides, esteroides y

ceras. Éste proceso es importante para el crecimiento normal de las plantas y en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Gawryluk y col, 2015; Xu y col., 2015).

El gen AT3G48990.1 sólo tiene expresión positiva en la parte aérea injertada y codifica para malonil-CoAsintetasa la cual interviene en producción de ácidos grasos de cadena larga, metabolitos secundarios como flavonoides, ceras y es intermediario en conjunto con chalcona sintasa en la ruta de producción de fenilpropanoides (Kreuzaler, 1972; Lee, 2015; Sun y col., 2015; Sagar y col., 2015). Estos metabolitos están asociados a la interacción planta-patógeno y a estrés medio ambiental y herbivoría. En este experimento se observa que Este gen no se encuentra expresado en el patrón resiste M-69 y es silenciado en la variedad susceptible sonora Anaheim por lo que es muy posible que *P. capsici* influya en directa mente en la expresión de este transcrito importante en el fenómeno de la resistencia. Como se observa en los resultados los genes diferencialmente expresados positiva o negativamente están directamente relacionados con la defensa e indirectamente relacionados con la expresión de proteínas de resistencia como PR1 y PAL puesto que la expresión de intermediarios para ambas proteína pues en la interacción M-69-patógeno (*C. annuum-P. capsici*) se observó la expresión de los genes que codifican para las proteínas de resistencia PAL-1 y PR-1 a las 24 horas post inoculación manteniéndose la expresión hasta 35 días durante la interacción *C. annuum* con *P. capsici* Leo. (Urrutia, 2011).

6.3 Identificación del perfil en la producción de compuestos volátiles en el patrón resistente M-69, en el cultivar susceptible Sonora Anaheim y la planta injertada M-69/Sonora Anaheim, asociado a la interacción con *Phytophthora capsici* Leo.

En la interacción de los genotipos M-69, Sonora Anaheim y el injerto (M-69/Sonora Anaheim) se generaron diferentes compuestos volátiles a las 24 horas post inoculación como se muestra en la Figura 25, sin embargo éste patrón cambia a los 14 días post inoculación con el patógeno como se muestra en la Figura 26.

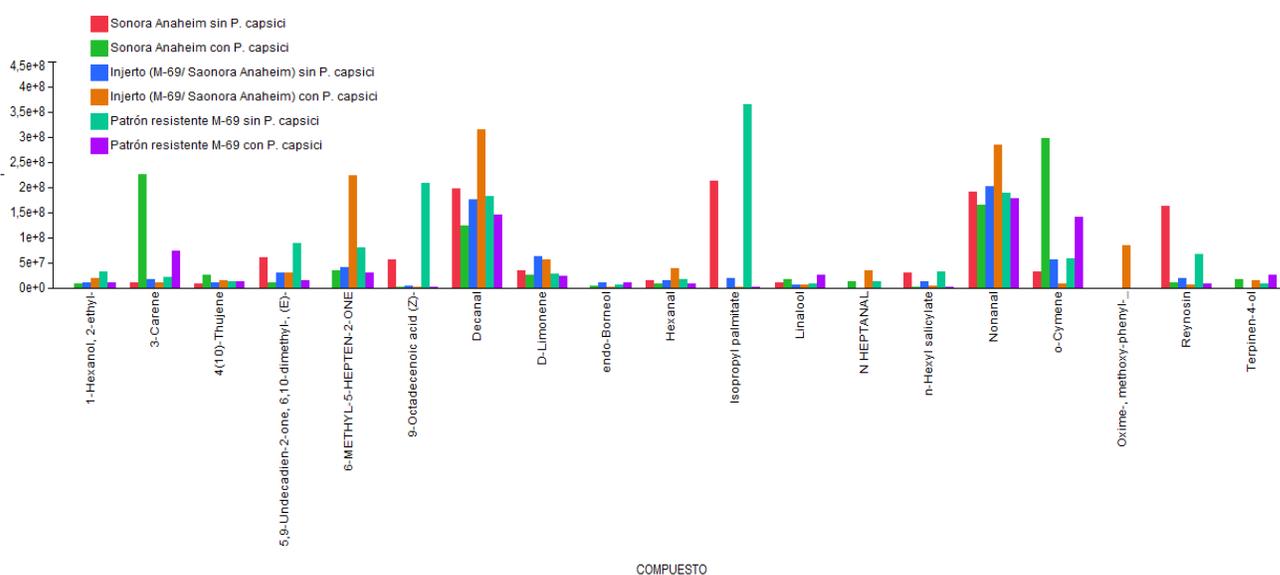


Figura 25. . Producción de compuestos volátiles a las 24 horas post inoculación con *P. capsici*. Se muestran las abundancias de los compuestos producidos por los genotipos M-69 (resistente), Sonora Anaheim (susceptible) y el injerto (M69/Sonora Anaheim).

Los compuestos volátiles más abundantes producidos en las 24 primeras horas post inoculación fueron careno, o-cimeno, por el cultivar susceptible Sonora Anaheim; el 6-metil5-hepten-2-ona, decanal, nonanal y metoxifeniloxima por la planta injertada patrón resistente M-69/Sonora Anaheim y el patrón M-69 decanal, nonanal y el o-cimeno.

El careno actúa como repelente de insectos y es producido en plantas coníferas resistentes a escarabajos fitófagos *Dendroctonus* ya que provoca toxicidad en ellos con efecto ovicida (Taff y col., 2015) sin embargo *Dendroctonus* cuenta con arsenal bacteriano en sus intestinos para poder degradar tal compuesto por lo que el careno puede funcionar como un atrayente para dicho fitófago (Cano y col., 2012; Boone y col., 2013; Roach y col., 2014). El o-cimeno es generado a partir de la aplicación exógena de ácido jasmónico o por la presencia de insectos chupadores como áfidos que a su vez inducen la misma respuesta en las plantas vecinas puesto que puede actuar como elicitador, activando el gen de la proteína PAL (Kishimoto y col., 2006; Navia y col., 2009; Cascone y col., 2015). Por otro lado, también posee actividad antibacteriana y antimicótica (Jeleń y col., 2005; Morandi 2015; Shahbazi, 2015).

El 6-metil5-hepten-2-ona (sulcatona) el cual es liberado a la atmósfera por las plantas e interactúa con el ozono, permanece en el ambiente de 10 minutos hasta 1.5 horas (Colmán y col., 2015) sin embargo, en esta interacción aún se pudo identificar en abundancia 24 horas después, por lo que posiblemente *P. capsici* favorece la producción de dicho compuesto. Este compuesto también tiene función como feromona atrayente de agregación del insecto *Platypusmutatus*, gusanos, curculionidos plagas de pinos, del café, escarabajos; así mismo este compuesto es componente del sabor y aroma del tomate, fresa y café (Quaglia y col., 2012; Jaramillo y col., 2013; Waclawczyk y col., 2015).

El nonanal es un atrayente de insectos benéficos como *Oriussimilis* que es un insecto depredador de áfidos, trips y ácaros (Sengonca y col., 2008; Yu y col., 2008), sin embargo también repele herbívoros y ejerce daño en las larvas que parasitan a las plantas que producen este tipo de compuestos (Hatano y col.,

2015). Este compuesto se encuentra en altas proporciones en el cacahuate *A. hypogaea* por lo que puede ser una herramienta para poder capturar insectos benéficos (Constanza y col., 2015). Otro efecto del nonanal es la estimulación del crecimiento de hongos patógenos causantes como *Uromyces* (Mendgen y col., 2006) sin embargo, éste compuesto genera la expresión de proteínas de resistencia del tipo PR1 pues se ha encontrado que aumenta la resistencia contra las bacterias *Pseudomonas syringae*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, así mismo inhibe la germinación de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* (Girón y col., 2012; Tao y col., 2014; Quintana y col., 2015).

El decanal inhibe el crecimiento de *Aspergillus flavus* sin embargo, esto genera un incremento en la virulencia de este patógeno por el aumento en la biosíntesis de aflatoxinas (Chang y col., 2014), por otro, la do se ha encontrado que inhibe el crecimiento de *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Hewavitharana y col., 2014) así mismo tiene función de kairomona en la atracción de *Cidya pomonella* en el manzano (El y col., 2013) y como parte de los compuestos volátiles producidos en el tomate por la infestación de mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* bajo condiciones de invernadero. El decanal activa la señal de respuesta en plantas no infestadas por mosca blanco por lo que se da una señal de alerta por la activación de las rutas de señalización del ácido salicílico y el silenciamiento de genes relacionados con respuesta a ácido jasmónico, etileno y fotosíntesis (López y col., 2012).

La metoxifeniloxima pertenece al grupo de las oximas cuyo metabolismo lleva a la producción de glucosinolatos. El carvacrol tiene propiedades antioxidantes, fungicidas contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp., *Candida* sp. (Sokovic y col., 2002; Suntres y col., 2013), *Pseudomonas* sp. (Oussalah y col., 2006), *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Oussalah y col., 2007; Nabavi y col., 2015; Kim y col., 2015). Por otro lado tiene potencial como alelopático (bioherbicida) pues se ha observado que inhibe la germinación de la lechuga *Lactuca*

sativa en 0.120% peso/volumen (Pinheiro y col., 2015). Todos los compuestos antes mencionados se producen durante la interacción con *P. capsici*, por lo que no se descarta que hay un efecto sobre éste sin embargo, esto no está directamente relacionado con la resistencia puesto que el cultivar susceptible Sonora Anaheim muere por la infección de *P. capsici* independientemente de la producción de dichos compuestos.

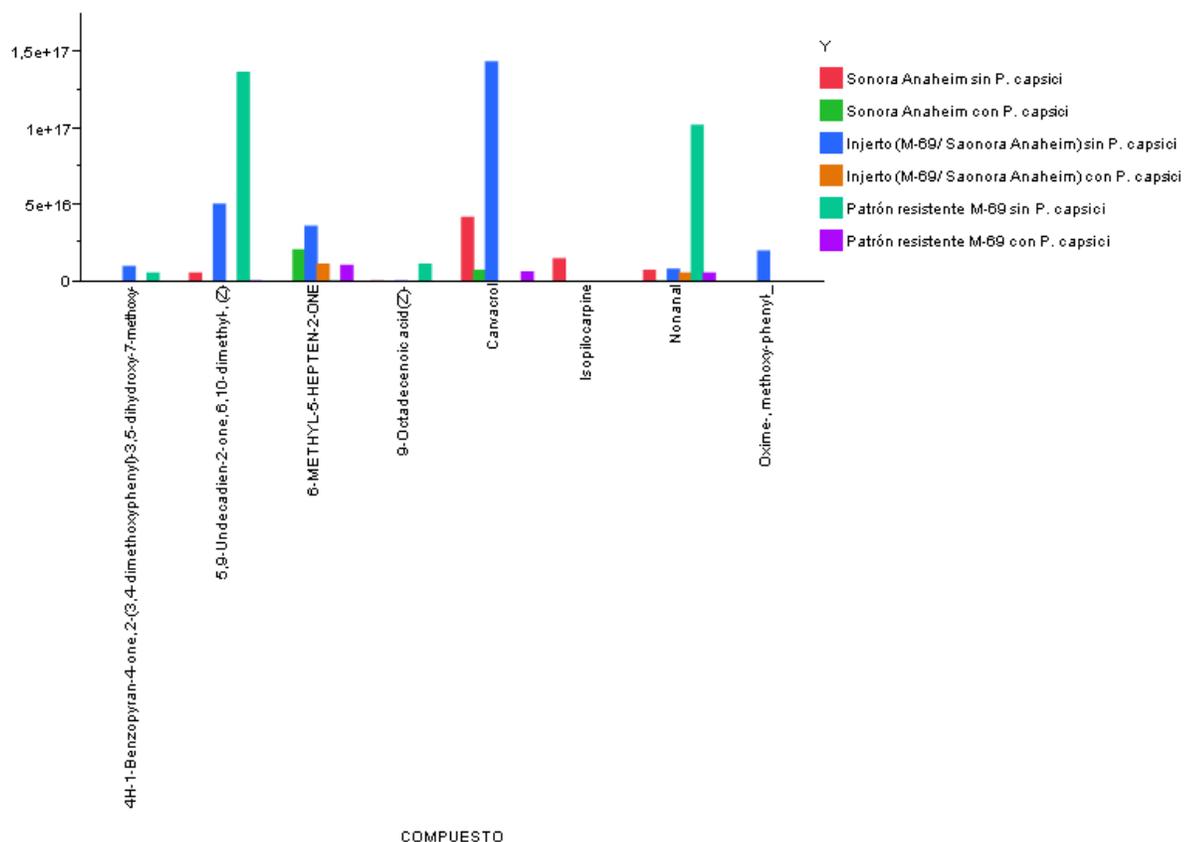


Figura 26. Producción de compuestos volátiles a las 14 días post inoculación con *P. capsici*. Se muestran las abundancias de los compuestos producidos por los genotipos M-69 (resistente), Sonora Anaheim (susceptible) y el injerto (M-69/Sonora Anaheim).

En las primeras 24 horas post inoculación se observa producción de un único compuesto en la planta injertada (metoxifeniloxima) el cuál puede explicar en parte la resistencia de esta combinación puesto que éste compuesto no se produce ni en el patrón resistente M-69, ni en el cultivar susceptible Sonora Anaheim por lo que se sospecha que se produce de *novo* en la planta injertada posiblemente como efecto de la injertación.

En la interacción con *P. capsici* después de 14 días el cultivar susceptible produjo 6-metil5-hepten-2-ona (sulcatona) y carvacrol; la planta injertada (patrón resistente M-69/cultivar susceptible Sonora Anaheim) 6-metil5-hepten-2-ona (sulcatona) y nonanal y el patrón resistente 6-metil5-hepten-2-ona (sulcatona), carvacrol y nonanal. En este caso se observa una coincidencia en la producción de un compuesto volátil asociados a la interacción con *P. capsici* Leo. por parte de la planta injertada y el patrón resistente M-69 pues en ambos se da la producción de nonanal el cual tiene propiedades fungicidas por lo que posiblemente hay un efecto evita el crecimiento de *P. capsici* Leo. y la colonización en el patrón resistente M-69, por otro lado se ha observado que el nonanal está asociado a la producción de proteínas de resistencia PR 1, 2 y 4 (Quintana y col., 2015).

En las plantas sin inóculo, también se observó cambio en la producción de compuestos volátiles. En el patrón resistente M-69 se elevó la producción de 5,9-Undecadien-2-ona, 6,10-dimethyl-, (Z)- (nerilacetona), 9- ácido octadecanóico(z)- y nonanal; en la planta injertada se produjo 4H-1-Benzopiran-4-ona, 5,9-Undecadien-2-ona (nerilacetonaócis-geranilacetona), carvacrol y metoxifeniloxima; en el cultivar susceptible Sonora Anaheim se produjo 5,9-Undecadien-2-ona (nerylacetone, cis-geranylacetone), carvacrol, isopilocarpina y nonanal. En este caso se observa que el patógeno afecta suprimiendo la producción de nonanal en el cultivar susceptible pues se produce en ausencia de este.

VII. CONCLUSIONES

El patrón de chile M- 69, resistente a *P. capsici* Leo, es compatible con el cultivar susceptible Sonora Anaheim.

El patrón de expresión genética en M-69 no fue el mismo que el presentado en la parte aérea susceptible injertada, ni tampoco fue similar al cultivar susceptible Sonora Anaheim, en la interacción con *Phytophthora capsici*, sin embargo, el patrón de expresión de algunos genes relacionados con la resistencia a la enfermedad, de la marchitez del chile, fue similar en el patrón resistente M-69 y en la parte aérea injertada. Por lo tanto, los datos sugieren que sí hubo incidencia del patrón M-69 en la expresión genética de la parte aérea susceptible injertada.

Por otra parte, el perfil de producción de compuestos volátiles asociados a la interacción *C. annuum-P. capsici* fue diferente en las tres iteraciones, patrón resistente M-69, Sonora Anaheim y su injerto, con y sin inóculo. Sin embargo, se generaron dos compuestos comunes, al inicio de la interacción y al final de la misma: metoxifeniloxima que se produjo en la planta injertada e inoculada y nonanal que se presentó en ambos, en el patrón resistente M-69 y en la parte aérea susceptible injertada. Lo anterior sugiere que hay influencia del patrón resistente sobre la parte aérea susceptible en la producción de compuestos volátiles asociados a la respuesta de defensa a *Phytophthora capsici*.

VIII. REFERENCIAS

- Acosta M. A. 2005. La técnica del injerto en plantas hortícolas. Horticom News (En línea).
- Agrios G. N. 2005. Fitopatología. Quinta edición. USA.
- Alonia B., Cohen R., Karnia L., Aktasc H., Edelstein M. 2010. Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae* 127: 119–126.
- Anaya L. J. L., González C M. M., Villordo Pineda E., Rodríguez G. R., Rodríguez M. R., Guevara G. R. G., Guevara O. L., Montero T. V., Torres P. I. 2011. Selección de genotipos de Chile resistentes al complejo Patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (3): 373-383.
- Andrews, J. 1995. Peppers the domesticated capsicums new edition. Austin, Texas, U. S. A. University of Texas Press, 186 p.
- Apodaca S. M. A., Zavaleta M. E., Osada S. K., García E. R., Valenzuela U. J. 2004. Pudrición de la Corona del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de fitopatología*. 22(1): 22-29.
- Arellano R. L. J., Rodríguez G. E., Ron P. J., Martínez R. J. L., Lozoya S. H., Sánchez M. J., Lépiz I. R. 2013. Evaluación de resistencia a *Phytophthora infestans* en poblaciones silvestres de *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (4): 753-766
- Atkinson N. J., Lilley C. J., Urwin P. E. 2013. Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology*, 162(4), 2028-2041.
- Atkinson N. J., Lilley C. J., Urwin P. E. 2013. Interaction of Volatile Compounds in Simultaneous Biotic and Abiotic Stresses. *Plant Physiology*, 162(4), 190-191.
- ATSDR: Resumen de Salud Pública, Bromo metano. 2013.

- Awad¹ J., Stotz¹ H. U., Fekete A., Krischke M., Engert C., Havaux M., Berger S., Mueller M. J. 2015. 2-Cys peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiology*. 167(4), 1592-1603.
- Baltussen E., Pat S., Frank D., I Cramers C. 1999. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations*. 11 (10): 737-747.
- Berberich, T., Sagor, G. H. M., Kusano, T. 2015. Polyamines in Plant Stress Response. Chapter 13 Polyamines: A Universal Molecular Nexus for Growth, Survival, and Specialized Metabolism. P:155-168
- Bonnet J., Danan S., Boudet C., Barchi L., Sage-Palloix A. M., Caromell B., Palloix A., Lefebvre. 2007. Are the polygenic architecture of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics*. 115: 253-264.
- Boone C. K., Keefover-Ring K., Mapes A. C. Adams A. S., Bohlmann J., Raffa K. F. 2013. Bacteria associated with a tree-killing insect reduce concentrations of plant defense compounds. *Journal of chemical ecology*. 39(7): 1003-1006.
- Bowers JH, Papavizas GC and Johnston SA (1990). Effect of soil temperature and soil-water matric potential on the survival of *Phytophthora capsici* in natural soil. *PlantDis*. 74: 771-778.
- Bravo D. V., Cruz M. E., Herrera L. G., Ramírez M. F. 2013. Uso De Plaguicidas En Cultivos Agrícolas Como Herramienta Para El Monitoreo De Peligros En Salud. *UNICIENCIA* 27 (1): 351-376.
- Cano-Ramírez C., Armendáriz-Toledano F., Macías-Sámano J. E. Sullivan B. T., Zúñiga G. 2012. Electrophysiological and Behavioral Responses of the Bark Beetle *Dendroctonus rhizophagus* to Volatiles from Host Pines and Conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*. 38:512–524 513.

- Cascone P., Iodice L., Maffei M. E., Bossi S., Arimura G. I., Guerrieri E. 2015. Tobacco overexpressing β -ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. *Journal of plant physiology*. 173: 28-32.
- Castro R. A., Fernández P. S. P., Osuna A. P. 2012. Mecanismos de defensa del chile en el patosistema *Capsicum annuum-Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:49-65.
- Chang P. K., Scharfenstein L. L., Mack B., Yu J., Ehrlich K. C. 2014. Transcriptomic profiles of *Aspergillus flavus* CA42, a strain that produces small sclerotia, by decanal treatment and after recovery. *Fungal Genetics and Biology*. 68: 39-47.
- Chen, H., Kim, H. U., &Weng, H. (2011). Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, is essential for growth and development of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 23(6): 2247-2262.
- Colmán E. G., Blanco M. B., Barnes I., Teruel M. A. 2015. Kinetics of the gas-phase reaction between ozone and three unsaturated oxygenated compounds: Ethyl 3, 3-dimethyl acrylate, 2-methyl-2-pentenal and 6-methyl-5-hepten-2-one at atmospheric pressure. *Atmospheric Environment*.109. 272-278.
- CONAPROCH, 2014. (19/03/20015). Consultado en <http://www.conaproch.com/memorias/demo/memorias.html>
- Constanza K., Tallury S., Whaley J., Sanders T., Dean L. 2015. Chemical Composition of the Essential Oils from Leaves of Edible (*Arachishypogaea* L.) and Perennial (*Arachisglabrata*Benth.) Peanut Plants. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18(3): 605-612.
- Cúndom M. A., Cabrera M. G. 2004. Primera determinación de *Phytophthora capsici*, patógeno de filodendro (*Philodendronscandens*) en argentina. *Agriculturatócnica (chile)* 64(4):421-425.

- Dong, X., Gao, Y., Chen, W., Wang, W., Gong, L., Liu, X., Luo, J. 2015. Spatiotemporal Distribution of Phenolamides and the Genetics of Natural Variation of HydroxycinnamoylSpermidine in Rice. *Molecular plant*, 8(1): 111-121.
- Drenth A, Janssen EM and Govers F (1995). Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathol.* 44: 86-94
- Du, Y., Gong, Z. H., Liu, G. Z., Chai, G. X., Li, C. (2014). Biological characteristics and mating type distribution of *Phytophthora capsici* from China. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 396-405.
- El S. A. M., Cole L., Revell J., Manning L. A., Twidle A., Knight A. L., Suckling D. M. 2013. Apple volatiles synergize the response of codling moth to pear ester. *Journal of chemical ecology*, 39(5), 643-652.
- Eshbaugh H. W. 1975. Genetic and Biochemical Systematic Studies of Chili Peppers (*Capsicum-Solanaceae*). *TorreyBotanicalSociety*. 102 (6): 396-403.
- Fernández H. E., Rojas M. R. I., Gómez R. O., Guevara O. L., Rivas D. M. E., Valadez M. E., Zavaleta M. E. 2012. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici*. *Interciencia*. 37 (5) pp. 370-376.
- Foster J. M. 2010 Resistance of Pepper to *Phytophthora* Crown, Root, and Fruit Rot Is Affected by Isolate Virulence. *PlantDisease* 94 (1): 24-29.
- García M. R., Pérez L. R. 2003. Fitoalexinas: Mecanismos de defensa en plantas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias forestales y del ambiente*. (1): 5-10.
- García R. M. R, Chiquito A. E., Loeza L. P. D., Godoy H. H., Villordo P. E., Pons H. J. L., González C. M. M., Anaya L. J. L. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre criollo de Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 44: 701-709.
- Gawryluk, R. M., Eme, L., Roger, A. J. 2015. Gene fusion, fission, lateral transfer, and loss: not-so-rare events in the evolution of eukaryotic ATP citrate lyase. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

- Gil O. R., Espanol C. P., Zueco J. C. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line SC 334. *Plant breeding* 107: 50-55.
- Girón C. P. S., Molina T., J., Heil M. 2012. Volatile dose and exposure time impact perception in neighboring plants. *Journal of chemical ecology*. 38(2): 226-228.
- Glosier B. R., Ogundiwin E. A., Sidhu G. S., Sischo D. R., Prince J. P. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162: 23-30.
- Godínez V. D., Rocha S. M., Sepúlveda G. E., Lara R. J., Rojas M. R., Zavaleta M. E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology*. 120: 299-303.
- González F. M., Hernández A., Casanova A., Depestre T., Gómez L., Rodríguez M. 2008. El injerto herbáceo: alternativa para el manejo de plagas del suelo. *Revista de Protección Vegetal*. 23(2): 69-74.
- Grant, C. M. 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular microbiology*, 39(3), 533-541.
- Hammerschmidt R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review of Phytopathology*. 37: 285-306.
- Hatano E., Saveer A. M., Borrero-Echeverry F., Strauch M., Zakir A., Bengtsson M., Dekker T. 2015. A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. *BMC biology*, 13(1): 1-15.
- Heldt H. W. 2007. *Plant Biochemistry* 3ed. San Diego, California U. S. A.

Hernández M. L. A., Bonilla H. E., Morales C. R. 2011. A multiple-filter-GA-SVM method for dimension reduction and classification of DNA-microarray data. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 32 (1): 32-39.

Hewavitharana S. S., Ruddell D., Mazzola M. 2014. Carbon source-dependent antifungal and nematocidal volatiles derived during anaerobic soil disinfestation. *European Journal of Plant Pathology*. 140(1): 39-52.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> Visitado el 10/10/2015.

<http://toxnet.nlm.nih.gov> Visitado el 10/10/2015.

<http://webbook.nist.gov> Visitado el 10/10/2015.

<http://www.atsdr.cdc.gov/es>. Visitado: 27/10/2013.

<http://www.commonchemistry.org> Visitado el 10/10/2015.

<http://www.ebi.ac.uk>. Visitado el 10/10/2015.

<http://www.genome.jp> Visitado el 10/10/2015.

<http://www.uniprot.org> Visitado el 10/10/2015.

<https://solgenomics.net>. Visitado el 10/10/2015.

<https://www.arabidopsis.org> Visitado el 10/10/2015.

Hu, X. M., Shi, C. Y., Liu, X., Jin, L. F., Liu, Y. Z., Peng, S. A. 2015. Genome-wide identification of citrus ATP-citrate lyase genes and their transcript analysis in fruits reveals their possible role in citrate utilization. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(1), 29-38.

Hwang-sung M., Kil-su J., Ji-eun H., Su-gyeong J., Byung-Soo K., 2015. Horticultural and Chemical Quality Characterization of Accessions Selected from Four Species of Capsicum. *Hort. Environ. Biotechnol.* 56(1):54-66.

- Imamura, T., Fujita, K., Tasaki, K., Higuchi, A., Takahashi, H. 2015. Characterization of spermidine synthase and spermine synthase—The polyamine-synthetic enzymes that induce early flowering in *Gentianatriflora*. *Biochemical and biophysical research communications*, 463(4): 781-786.
- Jaramillo J., Torto B., Mwenda D., Troeger A., Borgemeister C., Poehling H. M., Francke, W. 2013. Coffee berry borer joins bark beetles in coffee klatch. *PloS one*, 8 (9).
- Jeleń H. H., Krawczyk J., Larsen T. O., Jarosz A., Gołębniak B. 2005. Main compounds responsible for off-odour of strawberries infected by *Phytophthora cactorum*. *Letters in applied microbiology*. 40(4): 255-259.
- Kim S. G., Kim Y. H. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistance responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *The plant Pathology Journal* 25: 113-120.
- Kim S.A., Rhee M.S. 2016. Highly enhanced bactericidal effects of medium chain fatty acids (caprylic, capric, and lauric acid) combined with edible plant essential oils (carvacrol, eugenol, b-resorcylic acid, trans-cinnamaldehyde, thymol, and vanillin) against *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control*. 60: 447-454.
- Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R., Takabayashi J. 2006. Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 46(7): 1093–1102.
- Koc E. A, Sulun U., Cemil I., YelizKas, koArıci. 2011. Defence responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leo. *ScientiaHorticulturae* 128: 434–442.

- Kreuzaler F., Hahlbrock K. 1972. Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5, 7, 4'-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS letters*. 28(1): 69-72.
- Lamour KH and Hausbeck MK (2003). Effect of crop rotation on the survival of *Phytophthora capsici* and sensitivity to mefenoxam. *Plant Dis*. 87: 841-845
- Lee S. B., Suh M. C. 2015. Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant cell reports*. 34(4): 557-572.
- Lodha T. D. Basak J. 2011. Review: Plant–pathogen interactions: what microarray tells about it?. *Molecular Biotechnology*. Springer Science+Business Media.
- López Y. I. Á., Martínez G. N. A., Ramírez R. R., López M. G., Sánchez H. C., Délano F. J. P. 2012. Cross-kingdom effects of plant-plant signaling via volatile organic compounds emitted by tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infested by the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). *Journal of chemical ecology*. 38(11): 1376-1386.
- Marín-Loaiza J. C. Céspedes C. L. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista de Fitotecnia Mexicana*. 4 (30): 327 – 351
- Martínez B. M. C., Alcaraz L. C., Muries B., Mota C. C., Carvajal M. 2010. Physiological aspects of rootstock–scion interactions. *Scientia Horticulturae* 127: 112–118.
- Mendgen K., Wirsal S. G., Jux A., Hoffmann J., Boland W. 2006. Volatiles modulate the development of plant pathogenic rust fungi. *Planta*, 224(6): 1353-1361.
- Mohamed T. A., Talaat D., Rudwan M. A., Anas A. 2013. Morphological Changes on Sions due to Grafting Eggplant (*Solanum Melongena* L) and Pepper *Capsicum Annuum* (L) onto Tomato *Lycopersicon esculentum* L.as Rootstock. *Journal of Forest products & Industries*. 2(5): 30-35.

- Moore R. 1984. A model for Graft Compatibility-Incompatibility in Higher Plants. *American Journal of Botany*. 71 (5):752-758.
- Moradi M., Najafian S. 2015. Comparative analysis of the aroma chemicals of *Menthapiperita* L. using hydrodistillation and CombiPAL system techniques. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2(4): 89-94.
- Moran B. S. H., Aguilar R. V. H., Corona T. T., Zavaleta M. E. 2010. Resistencia a *Phytophthora capsici* LEO. de chiles nativos del sur de Puebla. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33 (4): 21-26.
- Muthukumar A., Eswaran A., Sangeetha G. 2011. Induction of systemic resistance by mixtures of fungal and endophytic bacterial isolates against *Pythium aphanidermatum*. *Acta Physiology Plant*. 33:193-1944
- Nabavi S. M., Marchese A., Izadi M., Curti V., Daglia M., Nabavi S. F. 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*. 60: 447-454.
- Navia G. W. G., Yuan J. S., Mauromoustakos A., Murphy J. B., Chen F., Korth K. L. 2009. *Medicago truncatula* (E)- β -ocimene synthase is induced by insect herbivory with corresponding increases in emission of volatile ocimene. *Plant Physiology and Biochemistry*. 47(5):416-425.
- Norstog K. 1981. Graft Compatibility-Incompatibility in plants. *BioScience*. 31(5): 389-391.
- Oda, M. 1999. Grafting of vegetable to improve greenhouse production. Food & Fertilizer Technology Center. Osaka Prefecture University. Extension Bulletin 480.
- Oelke M. L., Bosland P. W., Steiner P. 2003. Differentiation of races Specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal American Society Horticultural Science*. 128: 213-218.

- Okada K., Abe H., Arimura G. 2014. Jasmonates Induce Both Defensive and Infochemical Strategies in Monocotyledonous and Dicotyledonous Plants. *Plant and Cell Physiology Advance Access*. 2-17
- Okubara P. A., Dickman M. B., Ann E. Blechl. 2014. Molecular and genetic aspects of controlling the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia* and *Pythium*. *Plant Science*. 1-10
- Oliver, J. P., Castro A., Gaggero C., Cascón T., Schmelz E. A., Castresana C., Ponce de León I. 2009. *Pythium* infection activates conserved plant defense responses in mosses. *Planta*. 230:569–579
- Osuna A., Aguilar S. J., Fernández P. S., Godoy H. H., Corral D. B., Flores M., J. P., Borrego P. A. Olivas E. 2012. Injertos en chiles tipo Cayene, jalapeño y chilaca en el noroeste de Chihuahua, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 3(4):739-750.
- Oussalah M., Caillet. S., Saucier L., Lacroix M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236–244
- Oussalah M., Caillet. S., Saucier L., Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18: 414–420.
- Paxton J. D. 1981. Phytoalexins: a working redefinition. *Phytopathology*. 101:106-109.
- Pérez A. S., Cabezas M. D. 2005. La tecnología del microarreglo en la biología molecular. *Revista de protección vegetal*. 20 (3).
- Pérez A. S., Cabezas M. D., Domínguez R., Coto A. O., García C. H. 2012. Caracterización molecular de los genes *pr1* y *tpt1* en especies y variedades cubanas de tabaco (*Nicotiana glauca* L.) *Revista colombiana de biotecnología*. 14 (1): 191-199.

- Pickersgill B. 1971. Relationships between Weedy and Cultivated Forms in Some Species of Chili Peppers (Genus *Capsicum*). *Evolution*. 25 (4): 683-691.
- Pinheiro P. F., Vidal C. A., Thammyres de A. A., Galter I. N., Pinheiro C. A., Fontes P. A., Ramos O. C. M. Praça F. M. M. 2015. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthusamboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1-32.
- Pugliese A., Loizzo M. R., Tundis R., O'Callaghan Y., Galvin K., Menichini F., O'Brien N. 2013. The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chemistry* 141: 2606–2613.
- Qi T., Song S., Ren Q., Wu D., Huang H., Chen Y., Fan M., Peng W., Ren C., Xie D. 2011 The Jasmonate-ZIM-Domain Proteins Interact with the WD-Repeat/bHLH/MYB Complexes to Regulate Jasmonate-Mediated Anthocyanin Accumulation and Trichome Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* (23): 1795–1814.
- Quaglia M., Fabrizi M., Zazzerini A., Zadra C. 2012. Role of pathogen-induced volatiles in the *Nicotianatabacum–Golovinomycescichoracearum* interaction. *Plant physiology and biochemistry*. 52: 9-20.
- Quintana R. E., Morales V. A. T., Molina T. J., Ádame A. R. M., Acosta G. J. A., Heil M. 2015. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichumlindemuthianum*. *Journal of Ecology*. 103(1): 250-260.
- Richinis R. D., Micheletto S., O'Connell M. 2010. Gene expression profiles unique to chile (*Capsicum annum* L.) resistant to *Phytophthora* root rot. *PlantScience*. 178: 192-201.

- Rincón V J F, Velásquez V. R. 1999. Reacción de genotipos de Chile (*Capsicum annuum* L.) a pudriciones radicales en Zacatecas. *Horticultura Mexicana*. 7:130.
- Roach C. R., Hall D. E., Zerbe P., Bohlmann J. 2014. Plasticity and evolution of (+)-3-carene synthase and (-)-sabinene synthase functions of a Sitka spruce monoterpene synthase gene family associated with weevil resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 289(34): 23859-23869.
- Rochin W. Gámez M. N. Montoya B. L.C. Medina J. L.A. Efecto De Los Procesos De Secado Y Encurtido Sobre La Capacidad Antioxidante De Los Fitoquímicos Del Chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12 (2): 227-239.
- Sagar M., Pandey, N., Qamar N., Singh B., Shukla A. 2015. Domain analysis of 3 Keto Acyl-CoA synthase for structural variations in *Vitis vinifera* and *Oryzabrachyantha* using comparative modelling. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 7(1): 7-20.
- Santos, S. H., Goto, R. 2004. Enxertia em plantas de pimenta no controle da murcha de fitófтора em ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*. 22(1): 45-49.
- Schöning U. Kollmann R. 1997. Phloem translocation in regenerating *in vitro*-heterografts of different compatibility. *Journal of Experimental Botany*. 48 (307): 289-295.
- Sengonca C., Ahmadi K., Blaeser P. 2008. Biological characteristics of *Oriussimilis* Zheng (*Heteroptera*, Anthocoridae) by feeding on different aphid species as prey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115 (1): 32-38.
- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz E. A., Calderón, A., Lázaro, J. J., Jiménez A. 2015. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its

redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of experimental botany*. 10 (66): 2945–2955.

Shahbazi Y., Shavisi N., Karami N., Kakaei S. 2015. Chemical Composition and in Vitro Antibacterial Activity of *Ferulagoangulata* (Schlecht.) Boiss Essential Oil. *Pharmaceutical Sciences*, 21(1): 6-11.

Shin D. H., Cho M., Choi M. G., Das P. K., Lee S., Choi S., Park Yi. 2015. Identification of genes that may regulate the expression of the transcription factor production of anthocyanin pigment 1 (PAP1)/MYB75 involved in *Arabidopsis* anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell Reports*. 34(5):805-815.

SIACON 2012 (27/octubre/2013). Consultado en:http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15.

Sokovic M., Tzakou O., Pitarokili D. Couladis M.2002. Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung/Food*. 5 (46): 317– 320.

Suguita T., Kasunori Y., Tetsuji K., Kenichi Y., Yukiyo S., Ryutaro N., Shinji K., Atsushi T. 2006. QTL Analysis for Resistance to *Phytophthora* Blight (*Phytophthora capsici*. Leon) Using an Intraespecific Doubled-Haploid Population of *Capsicum annuum*. *Breeding Science*. 56: 137-145.

Sun W., Meng X., Liang L., Jiang W., Huang Y., He J., Wang L.2015. Molecular and biochemical analysis of chalcone synthase from *Freesia* hybrid in flavonoid biosynthetic pathway. *PloS one*. 10(3): 1-18.

Suntres Z. E., Coccimiglio J., Alipour M. 2013. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Food Science and Nutrition*. 2-34.

Taft S., Najar A., Erbilgin N. 2015. Pheromone Production by an Invasive Bark Beetle Varies with Monoterpene Composition of its Naïve Host. *Journal of chemical ecology*, 1-10.

- Taiz L. Zeiger. 2006. Plant Physiology. 3ed.
- Tao N., Jia L., Zhou H. 2014. Anti-fungal activity of Citrus reticulata Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. Food Chemistry. 153: 265–271.
- Thakur. 2007. Host Plant Resistance to Disease: Potential and limitations. Indian Journal of Plant Protection. 35 (1): 17-21
- Urrutia A. I. 2010. Porta injerto tolerante a patógenos de suelo. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología.
- Urrutia A. I. 2011. Resistencia a la pudrición de raíz en Chile: interacción accesión M-69-*Phytophthora capsici* Leo. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México. Tesis para obtener el grado de especialista en Ingeniería de Invernaderos.
- Van loon I. C., Van strien E. A. 2009. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 55: 85-97.
- Vela, E. Los chiles de México catálogo visual. Arqueología mexicana, edición especial. (32), 2009.
- Velázquez V. R.; Medina A. M. M; Macías V. L. M. 2004. La pudrición de la raíz del Chile (*C.annuum*. L) en el norte centro de México. Primera Convención Mundial del Chile. Fitosanidad .P 138-143.
- Wacławczyk-Biedroń W., Frąckowiak-Wojtasek B., Strub D., Rzechak M., Wojtasek, H. 2015. Synthesis of the aggregation pheromone of the Colorado potato beetle from its degradation product. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 25(17): 3560-3563.
- Wang J. E., Li D.W., Zhang Y. L., Zhao Q., He Y. M., Gong Z. H. 2013 Defence responses of pepper (*Capsicum annuum* L.) infected with incompatible and

- compatible strains of *Phytophthora capsici*. European Journal of Plant Pathology 136:625–638
- Wang Y. Q. 2011. Plant grafting and its application in biological research. Chinese Sci Bull. 56: 3511-3517.
- Wongpia A., Lomthaisong K. 2010. Changes in the 2DE protein profiles of chili pepper (*Capsicum annuum*) in response to *Fusarium oxysporum* infection. Science Asia. 36: 259-270.
- Xu P., Chen F., Mannas J. P., Feldman T., Sumner L. W., Roosinick M. J. 2008. Virus infection improve drought tolerance. New Phytologist. (180): 911-921.
- Yu H., Zhang Y., Wu K., Gao X. W., Guo Y. Y. 2008. Field-testing of synthetic herbivore-induced plant volatiles as attractants for beneficial insects. Environmental entomology. 37(6): 1410-1415.
- Zhang Y., Jia Q., Li D., Wang J., Yin Y., Gong Z. 2013. Characteristic of the Pepper CaRGA2 Gene in Defense Responses against *Phytophthora capsici* Leonian. International Journal of Molecular Sciences. 14: 8985-9004.
- Zheng, X., & Chen, J. (2009). Microarray analysis of gene expression profile induced by the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* in cherry tomato fruit. *Gene*, 430(1), 12-16.

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Solución nutritiva usada en este estudio.

Para preparar 200 litros de agua

Nitrato de calcio..... 100 gramos

Cloruro de calcio.....2 gramos

Nitrato de potasio..... 40gramos

Sulfato de potasio.....58gramos

Nitrato de magnesio....16gramos

Sulfato de magnesio....8gramos

Ácido fosfórico.....32 mililitros

Librel mix ®.....5gramos.

ANEXO 2

EXTRACCIÓN DE ARN POR REACTIVO TRIZOL ®

- 1- Obtener en un tubo eppendorf una muestra de 100 miligramos del tejido previamente molido con nitrógeno líquido.
- 2- Agregar un mililitro del Reactivo Trizol ® al tubo eppendorf que contiene la muestra del tejido molido e incubar a temperatura ambiente por un lapso de diez minutos.
- 3- Agregar 500µL de cloroformo isoamílico por cada mililitro del Reactivo Trizol ® usado.
- 4- Agitar vigorosamente por 15 segundos e incubar diez minutos a temperatura ambiente.
- 5-Centrifugar a 15, 000 rpm por 12 minutos a cuatro gados centígrados.
- 6- Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo.
- 7- Agregar 500µL de alcohol isopropílico y 50 µL acetato de sodio 3M por cada mililitro del Reactivo Trizol ® usado para precipitar el ARN.
- 8- Mezclar por inversión e incubar 18 horas a -20 grados.
- 9- Centrifugar a 15, 000 rpm por 10 minutos a cuatro grados centígrados y remover el sobre nadante.
- 10- Lavar la pastilla obtenida con un mililitro de etanol al 75% por cada mililitro del Reactivo Trizol ® usado y mezclar por vortex.
- 11- Volver a centrifugar a 7, 500 rpm por cinco minutos a cuatro grados centígrados.
- 12- Dejar secar el ARN por 10 minutos y disolver la pastilla seca en 50 µL de agua libre de RNAsas (agua DEPC).
- 13-. Almacenar a -70 grados centígrados para evitar su degradación.

ANEXO 3

Extracción ARN para la elaboración de microarreglos.

Las concentraciones obtenidas por el método del Trizol ® se muestran en el Cuadro 3. Dichas concentraciones fueron hibridadas en el Instituto de Medicina Genómica para su posterior uso en la elaboración de los microarreglos antes mencionados. Las concentraciones se reportan en microgramos por micro litro de extracto de ARN total.

Valores de las concentraciones de ARN obtenidas por Trizol ™

TRATAMIENTO	[] ARN ug/ul
M69_S/I	1435,83
M69_C/I	2218,22
INJ_S/I	1377,14
INJ_C/I	1374,92
SA_S/I	1067,29
SA_C/I	1814,24