



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería

**APLICACIÓN DE ELICITORES AS, QUITOSAN Y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN *Capsicum annuum*  
Y SU EFECTO DE RESPUESTA A ESTRÉS BIÓTICO**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ingeniería

**Presenta:**

M.C. Laura Mejía Teniente

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Presidente

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Secretario

Dr. Andrés Cruz Hernández  
Vocal

Dr. Mario Martín González Chavira  
Suplente

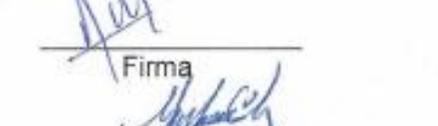
Dr. Gerardo Acosta García  
Suplente

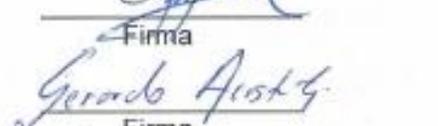
Dr. Aurelio Domínguez González  
Director de la Facultad

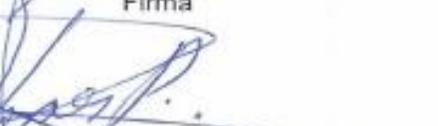
Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma

  
Firma





Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Mayo 2014  
México

## RESUMEN

Los patógenos de plantas son responsables de bajos rendimientos en la producción agrícola. Su control se realiza principalmente mediante métodos químicos y biológicos con frecuencia propuestas para reducir su impacto ambiental. Por otro lado, las interacciones planta-patógeno o planta-microorganismos, generan múltiples señales dentro de las plantas que activan el mecanismo de defensa, algunos de los cuales también puede ser inducida por elicitores. La señalización inducida por el inductor de planta sirve como una guía para desencadenar una serie de eventos intracelulares que terminan en la activación de las cascadas de transducción y las vías hormonales que finalizan en la resistencia inducida (IR) y en consecuencia la activación de la inmunidad planta al estrés ambiental. En este sentido, hemos empleado elicitores para generar esta IR en *Capsicum annuum* L. como sistema de estudio en las interacciones planta-inductor y planta-inductor-patógeno. En este trabajo se evaluó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno causado por el ácido salicílico (AS), el quitosano (QN), y los inductores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *Capsicum annuum* L. La producción de peróxido de hidrógeno después de la inducción con los elicitores, así como los análisis de actividades enzimáticas de catalasa (CAT) y fenilalanina amonio liasa (PAL) fueron analizados. También se realizó el análisis de la expresión génica de *cat1*, proteína relacionada con la patogénesis-1 (PR1), *mkk1*, *mk1*, *mk2*, *wrkyd*, *wrky1*, *npr1*, y *β-tub* fueron determinadas. Nuestros resultados muestran que el 6,7 y 10 mM concentraciones AS, 14 y 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indujeron una producción abundante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno. Tratamientos QN indujeron las mismas respuestas en menor proporción que los otros dos inductores. En conclusión, la aplicación de los elicitores AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas de *Capsicum annuum* L. activa el sistema de defensa de las plantas mediante la inducción de la expresión de los genes de defensa *pr1*, *wrkyd* y *mkk1* y el incremento en la producción de metabolitos secundarios como ácido cafeico, elágico, rosmarínico, rutina, quercetina y resveratrol.

**(Palabras clave:** elicitores, estrés biótico, estrés oxidativo, resistencia sistémica inducida)

## SUMMARY

Plant pathogens are responsible for large declines in agricultural production. Their control is carried out mainly by chemical and frequently proposed biological methods to reduce their environmental impact. On the other hand, plant-pathogen or microbe interactions generate multiple signals within plants activating defense mechanism, some of which can also be induced by elicitors (protective molecules). Elicitor-induced plant signaling serves as a guide to a series of intracellular events that end in activation of transduction cascades and hormonal pathways triggering induced resistance (IR) and consequently activation of plant immunity to environmental stresses. In this sense, we have employed elicitors to generate this IR in *Capsicum annuum* L. as study system in plant-elicitor and plant-elicitor-pathogen interactions. In this work, we evaluated the endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production caused by salicylic acid (SA), chitosan (QN), and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitors in *Capsicum annuum* L. Hydrogen peroxide production after elicitation, catalase (CAT) and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activities, as well as gene expression analysis of *cat1*, *pal*, pathogenesis-related protein 1 (*pr1*), *mkk1*, *mk1*, *mk2*, *wrkyd*, *wrky1*, *npr1*, *y* *β-tub* were determined. Our results displayed that 6.7 and 10 mM SA concentrations, and, 14 and 18 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations, induced an endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gene expression. QN treatments induced the same responses in lesser proportion than the other two elicitors. In conclusion, the application of AS, QN and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitors in plants *Capsicum annuum* L. activates the defense system of plants by inducing the expression of defense genes *pr1*, *wrkyd* and *mkk1*, increased production of secondary metabolites such as caffeic acid, ellagic, rosmarinic, rutin, quercetin and resveratrol.

**(Key words:** elicitors, biotic stress, oxidative stress, induced systemic resistance)

## DEDICATORIAS

***La presente está dedicada a mi familia, y en especial a mi hijo Oscarito, que llegó en una gran etapa de mi vida y que voltea mi mundo de cabeza. Esto es por tí y para tí mi niño. ¡Te amo pequeñin!***

## AGRADECIMIENTOS

*A CONACYT, por la beca autorizada que me mantuvo con solvencia para mis estudios de posgrado.*

*A INIFAP Campo Experimental Bajío, por las facilidades permitidas para la realización del presente proyecto.*

*A CINVESTAV Unidad Irapuato, por la disposición de sus instalaciones para la realización de etapas experimentales.*

*Al Dr. Ramón por el excelente ser humano que es, y por la confianza que tuvo en mí para la realización del presente proyecto y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación. Gracias por su comprensión, consejos.*

*Al Dr. Irineo, al Dr. Andrés, al Dr. Gerardo y el Dr. Mario, que junto con el Dr. Ramón formaron parte de mi enseñanza, y sobre todo porque de cada uno de ustedes aprendí a querer volar y hacer cosas por nuestra sociedad.*

*A Angela, por su valiosa amistad. Gracias Ange por ser mi AMIGA!!!*

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Generalidades de <i>Capsicum</i> spp. ....	3
2.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> L. ....	4
2.2 Patógenos de <i>Capsicum</i> spp. ....	4
2.3 Estrés biótico.....	5
2.3.1 Tolerancia al estrés biótico	6
2.4 Sistema inmune de las plantas .....	6
2.5 Mecanismos de defensa .....	9
2.5.1 Defensa activa	10
2.5.2 Respuesta hipersensible	11
2.5.3 Resistencia sistémica adquirida	11
2.5.4 Resistencia sistémica inducida	12
2.5.5 Resistencia inducida por heridas	13
2.6 Elicitores.....	13
2.6.1 Eventos de señalización celular inducidos por elicitores	15
2.6.2 Inducción de resistencia mediante el uso de elicitores	16
2.6.2.1 Ácido salicílico y su actividad inductiva	17
2.6.2.2 Actividad antimicrobiana de quitosán	18
2.6.2.3 Participación del peróxido en el mecanismo de defensa	19
2.7 Genes relacionados al estrés biótico.....	21
2.7.1 Proteínas relacionadas a la patogénesis (PR)	21
2.7.2 Catalasa	23
2.7.3 Fenilalanina amonio liasa	23
2.7.4 Factor de transcripción WRKYd	24
2.7.5 Proteínas quinasas activadas por mitógenos	26

2.8	Fenoles y flavonoides.....	28
<b>3</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>31</b>
4.1	Objetivos específicos .....	31
<b>5</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
5.1	Material biológico .....	32
5.1.1	Plantas de <i>Capsicum annuum</i> L.	32
5.1.2	Cepa silvestre de geminivirus <i>PepGMV</i>	32
5.1.3	Cepa de <i>Phytophthora capsici</i>	34
5.1.4	Cepa bacteriana <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria	34
5.1.5	Quitosan	34
5.2	Métodos .....	35
5.2.1	Germinación de plantas <i>Capsicum annuum</i> L.	35
5.2.2	Determinación de la concentración de elicitores	35
5.2.3	Tratamiento con elicitores y determinación de oportunidad de aplicación	36
5.2.4	Determinación de indicadores oxidativos	38
5.2.4.1	Tinción citoquímica con 3,3-Daiaminobenzidina (DAB)	38
5.2.4.2	Cuantificación endógena de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y actividades enzimáticas	38
5.2.4.3	Análisis de la expresión génica de <i>cat1</i> , <i>pal</i> y <i>pr1</i> en interacciones planta-elicitor	44
5.2.4.4	Determinación de compuestos fenólicos	45
5.2.4.5	Análisis estadístico del estrés oxidativo	47
5.2.5	Evaluación de susceptibilidad patogénica a <i>Phytophthora capsici</i> en plantas <i>C. annuum</i> L.	48
5.2.6	Interacción planta-elicitor-patógeno	49
5.2.6.1	Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con <i>Phytophthora capsici</i>	49
5.2.6.2	Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con geminivirus <i>PepGMV</i> y evaluación fenotípica	52
5.2.6.3	Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria ( <i>Xcv</i> )	55
5.2.7	Análisis de expresión génica en interacciones planta-elicitor-patógeno	56
5.2.8	Determinación de metabolitos secundarios	58
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
6.1	Indicadores fenológicos y de estrés oxidativo .....	60
6.1.1	Análisis de diámetro de tallo y altura de la planta de <i>C. annuum</i> L.	60
6.1.2	Detección de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con DAB en plantas de <i>C. annuum</i> L. inducidas con elicitores	64
6.1.3	Análisis cuantitativo del contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> endógeno en plantas de <i>C. annuum</i> L. inducidas con elicitores	66

6.1.4 Actividad específica catalasa (CAT) en <i>C. annuum</i> L. por efecto de la aplicación de elicitores.	73
6.1.5 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)	78
6.1.6 Patrón de expresión génica de <i>cat</i> , <i>pal</i> y <i>pr1</i> en <i>C. annuum</i> L.	83
6.1.7 Análisis de fenoles y flavonoides totales inducidos en la interacción planta-elicitor.	88
6.2 Indicadores fenotípicos y de expresión génica de las interacciones planta–elicitor–patógeno.....	95
6.2.1 Interacción <i>C. annuum</i> L–Elicitor–Geminivirus	96
6.2.2 Análisis de metabolitos secundarios de la interacción <i>C. annuum</i> L–Elicitor–Geminivirus	101
6.2.3 Interacción <i>C. annuum</i> L–Elicitor– <i>P. capsici</i>	102
<b>7 CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>8 REFERENCIAS</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO I. PROTOCOLOS</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO II. SOLUCIONES</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO III. ANÁLISIS DE VARIAZA INDICADORES FENOLÓGICOS</b>	<b>137</b>
<b>ANEXO IV. TENDENCIAS DE INDICADORES OXIDATIVOS DEL ANÁLISIS EXPLORATORIO</b>	<b>141</b>
<b>ANEXO V. ANÁLISIS DE VARIAZA DE CONTENIDO DE PERÓXIDO Y ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE <i>C. annuum</i> L.</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO VI. ANÁLISIS DE VARIAZA DE CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE <i>C. annuum</i> L.</b>	<b>169</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Origen y distribución geográfica de <i>Capsicum</i> spp. ....	3
Figura 2.2. Respuesta inmune primaria en la interacción planta-patógeno.....	9
Figura 5.1. Mapa de restricción de los componentes A (pBS::ComA) y B (pBS::ComB) del PepGMV en el plásmido bluescript SK +.....	33
Figura 5.2. Esquema de distribución de tratamientos para la aplicación de elicitors en el cuarto de germinación. ....	39
Figura 5.3. Curva de calibración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con kit colorimétrico. ....	40
Figura 5.4. Descomposición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mediado por catalasa.....	41
Figura 5.5. Curva de calibración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para determinación de actividad catalasa. ....	41
Figura 5.6. Curva de calibración de ácido cinámico. ....	42
Figura 5.7. Curva de calibración de BSA para cuantificación de proteína.....	43
Figura 5.8. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles..	46
Figura 5.9. Curva de calibración de rutina, para determinación de flavonoides. ...	47
Figura 5.10. Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con <i>Phytophthora capsici</i> .....	49
Figura 5.11. Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con PepGMV .....	53
Figura 5.12. Inoculación de <i>C. annuum</i> L. con <i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria. ....	56
Figura 6.1. Efecto de los elicitors en el crecimiento de <i>C. annuum</i> L. al día 42 post primera aplicación.....	63
Figura 6.2. Efecto de los elicitors en el diámetro de tallo de <i>C. annuum</i> L. al día 42 post primera aplicación.....	63
Figura 6.3. Reacción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con DAB 12 h después de la aplicación de elicitors. ....	65
Figura 6.4. Dinámica de producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en variedad Don Benito de <i>C. annuum</i> L., por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitors.....	68
Figura 6.5. Dinámica de actividad específica de CAT en <i>C. annuum</i> L. var. Don Benito, por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitors..	75
Figura 6.6. Dinámica de actividad específica de PAL en <i>C. annuum</i> L. var. Don Benito, por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitors..	79
Figura 6.7. Patrón de expresión de los genes <i>cat1</i> , <i>pal</i> y <i>pr1</i> de <i>C. annuum</i> L. var. Don Benito, inducidos con la aplicación de elicitors..	84
Figura 6.8. Contenido total de fenoles en <i>C. annuum</i> L. inducidos por la aplicación de elicitors. ....	89
Figura 6.9. Contenido total de flavonoides en <i>C. annuum</i> L. inducidos por la aplicación de elicitors..	93
Figura 6.10. Fenotipo de susceptibilidad de <i>C. annuum</i> L. a <i>P. capsici</i> . ....	96
Figura 6.11. Movimiento viral del PepGMV en plantas de <i>C. annuum</i> L. inducidas con elicitors.....	100
Figura 6.12. Cambio de expresión de la ruta MAP quinasa de <i>C. annuum</i> L. inducidas con elicitors. ....	101
Figura 6.13. Análisis de expresión de la ruta MAP quinasa por inducción de elicitors en la interacción Planta-Elicitor- Oomiceto.....	105

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Elicitores usados en la resistencia inducida para el control de enfermedades.....	17
Tabla 5.1. Diseño de tratamientos de aplicación de elicitores.....	37
Tabla 5.2. Secuencia de oligonucleótidos relacionados al estrés oxidativo y biótico (Mejía-Teniente et al., 2013). ....	45
Tabla 5.3. Diseño de tratamientos para inoculación con <i>P. capsici</i> C7P8F7. ....	49
Tabla 5.4. Escala de severidad de síntomas de <i>C. annuum</i> L. a <i>P. capsici</i> (Morán-Bañuelos et al., 2010).....	52
Tabla 5.5. Diseño de tratamientos para inoculación con geminivirus PepGMV. ...	53
Tabla 5.6. Escala de severidad de síntomas de <i>C. annuum</i> L. a geminivirus (Torres-Pacheco et al., 2010).....	54
Tabla 5.7. Oligonucleótidos usados en los análisis de expresión génica de la ruta MAPK evaluados en la interacción planta-elicitor-patógeno.....	57
Tabla 6.1. Severidad de síntomas en plantas de <i>C. annuum</i> L. a PepGMV .....	97
Tabla 6.2. Concentración de compuestos fenólicos en plantas de <i>C. annuum</i> L. tratadas con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18 mM.....	102
Tabla 6.3. Severidad de síntomas de la interacción <i>C. annuum</i> L- <i>P. capsici</i> de la 1ra. Inoculación a los 5 dpa de elicitores.....	103
Tabla 6.4. Severidad de síntomas de la interacción <i>C. annuum</i> L- <i>P. capsici</i> de la 2da. Inoculación a los 10 dpa de elicitores. ....	104

## 1 INTRODUCCIÓN

*Capsicum* spp es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia de las solanáceas; el fruto es empleado principalmente como condimento en diversos platillos gastronómicos, mientras que en la industria se utiliza para la producción de oleorresinas, pigmentos naturales y fármacos (Guzmán-Maldonado et al., 2002).

Con una producción de 2.24 millones de toneladas (alrededor de 147,000 Ha sembradas) que representan un valor comercial de 8 mil millones de pesos, nuestro país ocupa el segundo lugar a nivel mundial como productor de esta hortaliza antecedido de China que contribuye con una producción de 25'015,498 Ton (SAGARPA, 2010).

Uno de los principales factores que afecta el rendimiento de este cultivo son las enfermedades causadas por agentes fitopatógenos como la generada por el Oomiceto *Phytophthora capsici* (marchitez del chile; González-Chavira et al., 2002; Rico-Guerrero et al., 2002), por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (mancha bacteriana Orellana-Benavides et al., 2003) y las causadas por geminivirus, siendo estas últimas las que afectan principalmente los cultivos de chile debido a su rápida distribución por el insecto vector que las transmite. En México, el rizado amarillo del chile fue la primera enfermedad asociada a geminivirus. Esta enfermedad es producida por el virus huasteco de la vena amarilla de chile (PHYVV, *Pepper Huasteco Yellow Vein Virus*) y por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV, *Pepper Golden Mosaic Virus*) los cuales causan pérdidas parciales o totales del cultivo (Torres-Pacheco et al., 1996). Para ilustrar la magnitud de la problemática se estima que tan sólo por estrés de origen biótico las pérdidas a escala mundial son de poco más de 42.1% (Agrios, 2005).

El uso de mecanismos de defensa en plantas, particularmente la expresión y regulación de la resistencia de amplio espectro asociada al fenómeno ISR (resistencia sistémica inducida) y SAR (resistencia sistémica adquirida),

puede funcionar como una alternativa viable para el diseño de estrategias de control de patógenos, con la finalidad de producir plantas con mayores niveles de resistencia ya que las estrategias basadas en la regulación de los mecanismos naturales de repuesta al ataque de patógenos, representa una forma más viable y duradera que producir plantas genéticamente modificadas.

La resistencia inducida es una forma de defensa activa que involucra la expresión diferencial de genes y cambios metabólicos que ocurren como consecuencia de un proceso de reconocimiento específico entre la planta y el patógeno (Madriz-Ordeñana, 2002). Por otro lado, los elicitores son moléculas que inducen la respuesta de protección en las plantas ante cualquier tipo de estrés (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Zhao et al., 2005; Boller y Felix. 2009; Holopainen et al., 2009). Además, se ha observado que las plantas tratadas con elicitores generalmente desarrollan resistencia en el hospedero, debido a que la aplicación de estos sobre la superficie de la planta activa múltiples vías de señalización de defensa intracelular (Ođjacova and Hadjiivanova, 2001; Garcia-Brugger et al., 2006; Bent and Mackey, 2007; Holopainen et al., 2009).

Por lo tanto y debido a que no se ha establecido aún un mecanismo de defensa inducible sostenible como alternativa al uso de pesticidas, se requiere determinar la expresión génica diferencial y los cambios metabólicos que esta conlleva, en el modelo vegetal *Capsicum annuum* L. susceptible a enfermedades, en presencia de los elicitores AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; con la finalidad de generar estrategias de control que permitan aumentar el rendimiento de este cultivo que se ve afectado por organismos antagonistas y disminuir el uso constante de agroquímicos en los cultivos de interés comercial.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de *Capsicum* spp.

El chile (*Capsicum* spp), proviene de la palabra náhuatl chilli; es una hortaliza que tiene una larga tradición en la dieta de la población mexicana, por lo que es uno de los atributos que la identifica y ha sido apreciado como condimento desde tiempos prehispánicos dado que fue la base de la alimentación de las culturas de Mesoamérica junto con la calabaza, el frijol y el maíz. Se sabe que tuvo origen entre Perú y Bolivia (**Figura 2.1**) y fue domesticado por primera vez en México, ya que las evidencias más antiguas de semillas de chile se remontan a los años 7,000 A.C y se localizaron en las zonas de Ocampo, Tamaulipas y Coxcatlán, Puebla en la República Mexicana, distribuyéndose de América hacia Europa, África y Asia por los conquistadores españoles y portugueses, convirtiéndose así en un cultivo de uso y distribución mundial (Molina-Torres et al., 2001; CONAPROCH, 2005).

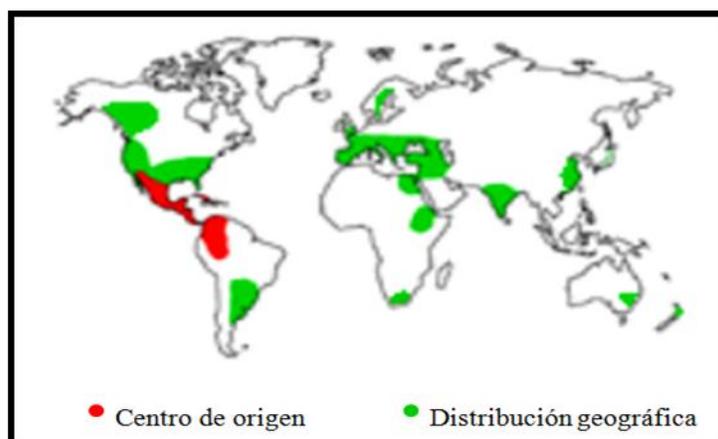


Figura 2.1. Origen y distribución geográfica de *Capsicum* spp (CONAPROCH, 2005).

Además de la importancia gastronómica que ha adquirido el chile en varios países después de México, el chile también se caracteriza por su contenido

de vitamina A y vitamina C, por ser fuente importante de pigmentos naturales y de compuestos de uso farmacológico como los capsaicinos, además de ser utilizados también como materia prima para la obtención industrial de oleorresinas (Molina-Torres et al., 2001; Guzmán-Maldonado et al., 2002).

En México, existe una gran diversidad de chiles tanto cultivados como silvestres; todos los chiles pertenecen a la familia de las Solanáceas y al género *Capsicum*, las especies cultivadas en México son: *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens* y *Capsicum annuum*, de las cuales ésta última es la más importante, ya que *C. annuum* agrupa la mayor diversidad de chiles como el serrano, el jalapeño, el poblano, el morrón, entre otros (Pickersgill, 1984; Pozo-Campodónico et al., 1991).

### 2.1.1 Clasificación taxonómica de *Capsicum annuum* L.

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Capsicum</i> spp
Especie:	<i>Capsicum annuum</i> L.

### 2.2 Patógenos de *Capsicum* spp

Una de las enfermedades de este cultivo es “la marchitez del chile”, causada por el Oomiceto *Phytophthora capsici*, a esta enfermedad se encuentran asociados un grupo de microorganismos fitopatógenos de varias especies de

*Fusarium*, *Rhizoctonia solani* y el oomiceto *Pythium spp.* (Muñoz-Sánchez et al., 1998; González-Chavira et al. 2002; Rico-Guerrero et al., 2004).

Cabe señalar, que no solo este cultivo es atacado por hongos y oomicetos, sino también por bacterias y virus; principalmente por *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* que origina la enfermedad conocida como mancha bacteriana (Orellana-Benavides et al., 2003) mientras que las enfermedades causadas por geminivirus son las que mayor efecto tienen en el cultivo de chile, debido a su rápida distribución por el insecto vector que las transmite. En México, este cultivo se ve afectado principalmente por enfermedades de origen viral causadas por los geminivirus PHYVV y PepGMV (Torres-Pacheco et al., 1996; Godínez-Hernández et al., 2001; Anaya-López et al., 2003 a, b).

### **2.3 Estrés biótico**

El estrés es usualmente definido como un factor externo que ejerce una alteración de homeostasis en la planta, dando lugar a una serie de respuestas bioquímicas o fisiológicas que define un estado particular diferente de un organismo al observado bajo condiciones optimas (Benavides-Mendoza, 2002; Peters et al., 2004; Susuki et al., 2005; Taiz y Zeiger, 2006).

El estrés biótico se define entonces como el estrés que ocurre como resultado de la demanda realizada por la planta por otros organismos vivos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, insectos y heridas (Peterson y Higley, 2001; Fujita et al., 2006). La respuesta al estrés es iniciada cuando la planta reconoce el estrés a nivel celular, activando rutas de transducción de señales que transmiten información por medio de células individuales y por toda la planta, conduciendo cambios en la expresión de varias redes de genes (Gorovits y Czosnek, 2007).

El estrés biótico es uno de los factores principales que afecta un amplio rango de cultivos de ciertas especies y disminuye tanto el rendimiento como la calidad del cultivo, la adaptación y aclimatación de los estreses ambientales, resulta de eventos integrados que ocurren en todos los niveles de organización, es decir, a nivel anatómico, morfológico, celular, bioquímico y molecular (Benavides-Mendoza, 2002; Taiz y Zeiger, 2006).

### **2.3.1 Tolerancia al estrés biótico**

El concepto de estrés se encuentra estrechamente relacionado con la tolerancia al estrés, debido a que éste último se refiere a la capacidad de la planta para hacer frente con cierto éxito al ambiente desfavorable que la rodea y permanecer en un estado particular de estrés sin sufrir cambios significativos en su fenotipo (Benavides-Mendoza, 2002; Fujita et al., 2006; Mittler, 2006; Taiz y Zeiger, 2006).

Bajo este contexto, la investigación agrícola se ha centrado en los últimos años a estudiar la relación entre la inducción de las vías de señalización y la respuesta de defensa de las plantas al estrés ambiental. Esto debido a que la relación que existe entre el estrés biótico y el rendimiento de la planta afecta directamente en las decisiones económicas, así como el desarrollo de prácticas de control (Roberts et al., 2002; Suzuki et al., 2005; He et al., 2007; Gorovits y Czosnek, 2008).

## **2.4 Sistema inmune de las plantas**

La mayoría de los microorganismos asociados a plantas son patógenos que dañan el crecimiento y reproducción de la misma; por lo que las plantas responden generalmente a la infección haciendo uso del sistema inmune innato

que las caracteriza (Jones y Dangl, 2006). Esto es, puede reconocer y responder a moléculas comunes de varias clases de microorganismos, incluyendo no patógenos. O responder a factores de virulencia de patógenos, ya sea directamente o a través de sus efectos sobre el hospedero (Jones y Dangl, 2006).

Las plantas con frecuencia difieren en su resistencia a patógenos microbianos. Esto se debe a la velocidad e intensidad de reacción y tipo de respuesta que genere el sistema inmune de la planta; cuando ésta entra en contacto con las moléculas del patógeno a las cuales responde este sistema. Es decir, las plantas resistentes responden más rápido y más vigorosamente a los patógenos que las plantas susceptibles (Taíz y Zeiger, 2007).

En general, el término “inmunidad” se refiere al estado fisiológico de tener suficientes defensas biológicas para evitar una infección, una enfermedad o cualquier invasión biológica no deseada. Esta definición se aplica a todos los sistemas eucarióticos multicelulares, por lo que es apropiado describir la habilidad que tienen las plantas para enfrentar infecciones microbianas como una respuesta “inmune” (Jones y Dangl, 2006; Zipfel et al., 2008; Castro-Mercado y García-Pineda, 2009). Por lo tanto, la *respuesta inmune primaria de la planta* se define como la inmunidad disparada por el reconocimiento de estructuras invariables de la superficie microbiana llamadas patrones moleculares asociados a – patógenos o microbios (PMAPs/MAMPs) a través de proteínas receptoras llamadas receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), las cuales son importantes para guiar la inmunidad a la infección microbiana es todas las especies de plantas (Chisholm et al., 2006; Jones y Dangl, 2006; Bittel y Robatzek, 2007, Castro y García, 2009; Boller y Felix, 2009; Postel y Kemmerling, 2009).

Las estructuras PAMPs son normalmente los componentes esenciales de toda clase de patógenos, como la flagelina bacteriana y la quitina fúngica. Las plantas también responden a moléculas endógenas liberadas por la invasión de patógenos, tales como la pared celular o fragmentos cuticulares llamados patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs) (Lotze et al., 2007; Matzinger, 2007;

Zipfel et al., 2008; Postel y Kemmerling, 2009). A su vez, la estimulación de PRRs guía a la inmunidad disparada por PAMP (PTI) (Dodds y Rathjen, 2010). Las respuestas intracelulares asociadas con PTI incluyen cruzamiento rápido de flujo iónico a través de la membrana plasmática, activación de la ruta de señalización MAP cinasa, producción de especies reactivas de oxígeno, cambio rápido en la expresión génica y reforzamiento de la pared celular (Zipfel, 2008). Junto con la PTI, una segunda clase de percepción involucra el reconocimiento por receptores intracelulares de moléculas virulentas del patógeno llamadas efectores; este reconocimiento induce inmunidad disparada por el efector (ETI) (Postel y Kemmerling, 2009; Dodds y Rathjen, 2010).

Este modo de reconocimiento conduce a la dinámica co-evolutiva entre la planta y el patógeno que son completamente diferentes de PTI como el marcado contraste con PAMPs, los efectores son característicamente variables y prescindibles (Dodds y Rathjen, 2010). Generalmente, la PTI y la ETI dan lugar a respuestas similares, aunque la ETI es cualitativamente más fuerte y rápida e involucra una forma de muerte celular programada llamada respuesta hipersensible (HR) (Zipfel, 2008). Por otro lado, PTI es generalmente más efectiva contra patógenos no adaptados en un fenómeno llamado resistencia del no-hospedero, mientras que ETI es activa contra patógenos adaptados. Sin embargo estas relaciones no son exclusivas y dependen de las moléculas elicitoras presentes en cada infección (Figura 2.2) (Boller y Felix, 2009; Zipfel, 2009; Dodds y Rathjen, 2010; Mejía-Teniente et al., 2010).

Las respuestas inmunes inducidas por los PAMP son importantes para la inmunidad a la infección microbiana en todas las especies vegetales (Bittel y Robatzek, 2007). El bloqueo de esta inmunidad por efectores microbianos (que conduce a la susceptibilidad disparada por efector) se considera como una estrategia clave de los patógenos exitosos para crecer y multiplicarse en las plantas hospederas (Alfano y Collmer, 2004).

Por otra parte, los genes de resistencia (R), son genes del hospedero que participan en la defensa contra una gran variedad de patógenos, codifican para

receptores proteicos que se unen a moléculas específicas generadas por los patógenos (elicitors) e incluyen proteínas, péptidos, membrana externa o procesos de secreción (Taíz y Zeiger, 2007). Además de este reconocimiento gen por gen mediado por genes de resistencia (R) de la planta con los correspondientes genes de avirulencia (Avr) del patógeno, la resistencia del no hospedero es activada por el reconocimiento del patógeno específico o por moléculas de señalización derivadas de la pared celular de la planta (elicitors exógenos o endógenos respectivamente) (OđjacoVa y Hadjiivanova, 2001).

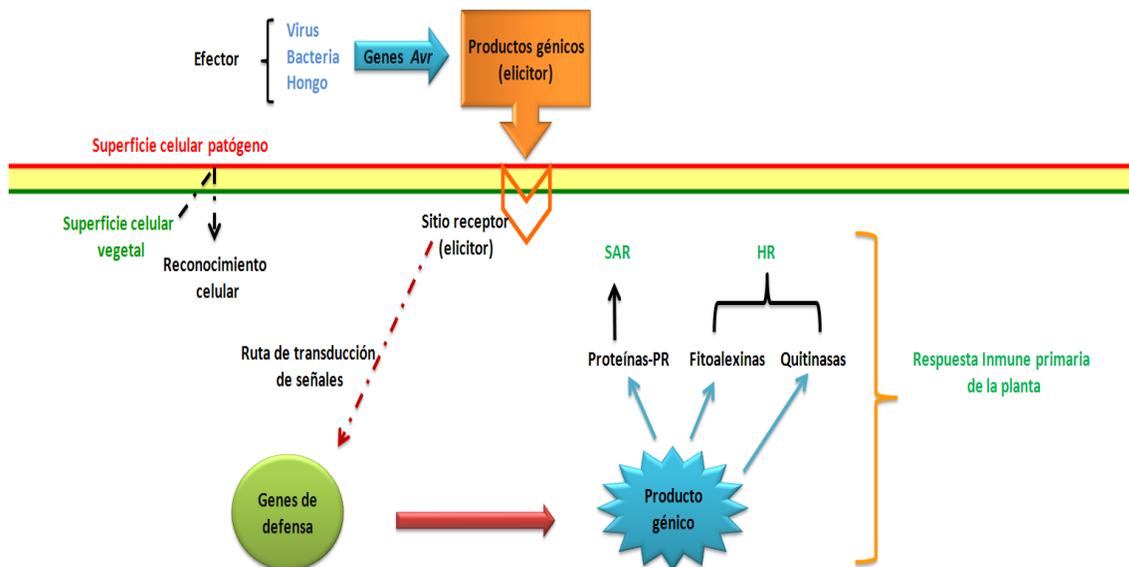


Figura 2.2. Respuesta inmune primaria en la interacción planta-patógeno (Mejía-Teniente et al., 2010).

## 2.5 Mecanismos de defensa

Debido a que las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos, las interacciones planta-patógeno pueden presentar varios tipos de asociaciones que dependen principalmente del contenido energético de cada organismo. Por lo tanto y dado que el ataque de patógenos es una condición

desfavorable, la planta activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (Madriz-Ordeñana, 2002).

Generalmente, los mecanismos de defensa de las plantas están basados en la prevención, tolerancia o resistencia (Thakur, 2007); dichos mecanismos, se activan de diferente manera, de acuerdo al tipo de patógeno que este atacando a la planta (necrótrofo o biótrofo) (Jalali et al., 2002). Estos mecanismos pueden ser *constitutivos*, es decir, mecanismos de defensa que proveen de *forma pasiva* resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o preformada se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos (barreras físicas) por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos de defensa químicos constitutivos como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (Madriz-Ordeñana, 2002). A diferencia de los mecanismos constitutivos, los mecanismos *inducidos* de defensa, también llamados de *resistencia inducida*, se activan solamente como una respuesta al ataque de patógenos (Collinge et al., 1994). A continuación se describen algunos de los mecanismos de defensa de mayor estudio entre la comunidad científica.

### **2.5.1 Defensa activa**

El mecanismo de defensa activa se basa en la optimización de los recursos de la planta, es decir, invierte sus recursos metabólicos en su desarrollo, crecimiento y multiplicación; en lugar de gastar su contenido energético en sistemas preestablecidos. Este mecanismo se caracteriza por activar un sistema de defensa solo cuando es realmente necesario (Fornoni et al., 2004). La activación de una defensa eficaz por parte de la planta se basa en la rapidez con la que es capaz de reconocer la presencia del patógeno (Fornoni et al., 2004). Esto se logra debido a que las plantas emplean una elevada cantidad de señales originadas por microorganismos y factores del medio ambiente, activando así los

mecanismos de defensa. También puede lograrse mediante agentes externos, como elicitores específicos y no específicos. Tanto los elicitores no específicos como los específicos son los primeros compuestos reconocidos por la planta para que se dé la activación de la cascada de señalización y por tanto la respuesta de defensa (Ebel y Cosio, 1994). Los primeros inducen respuesta de defensa en un gran número de especies vegetales; mientras que los específicos inducen la reacción de defensa contra un patógeno muy específico, y es producido únicamente por el patógeno.

### **2.5.2 Respuesta hipersensible**

La Respuesta Hipersensible (HR) se activa una vez que las células epidérmicas han sido invadidas y penetradas por algún patógeno y se caracteriza por lesiones necróticas de tejido. Las células hipersensibles ubicadas más al interior de la epidermis, al detectar al organismo patógeno inducen su muerte celular programada, este es un mecanismo utilizado por algunos hospederos con la finalidad de evitar la diseminación del patógeno intra o extracelularmente, además, en ocasiones llegan a originar la muerte del patógeno. Posteriormente la planta sintetiza compuestos como lignina y compuestos antimicrobianos con el fin de resguardar la zona afectada (Wolpert et al., 2002). Además, la HR está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) (Heath, 2000).

### **2.5.3 Resistencia sistémica adquirida**

La Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus iniciales en inglés), se puede definir como la resistencia a subsecuentes ataques por patógenos y se

puede detectar en partes de la planta infectada y no infectada (Ross, 1961), teniendo una íntima relación con la Respuesta Hipersensible.

La SAR, dentro del mecanismo de transducción de señales, no necesariamente obedece la interacción gen a gen, una vez que se activa el mecanismo la resistencia se activa por toda la planta, transfiriéndose esa información a lo largo y ancho de la planta vía floema, contra atacando a una amplia variedad de patógenos por un tiempo que va desde algunas semanas hasta meses (Kuc, 1982; 2001; Ryals, et al., 1992; 1996).

En estudios recientes, se ha confirmado que el AS es una molécula que induce la resistencia en plantas a una variedad de patógenos como virus, hongos y bacterias, en donde el AS interviene con proteínas como NPR1, la cual tiene la capacidad de trasladarse hasta núcleo y activar factores de transcripción como TGA que inducen la expresión de genes implicados en la resistencia (Kuc, 1982; Yalpani et al., 1991; Whitham et al., 1994; Durrant et al., 2004). Lo interesante aquí, es que es posible activar la SAR de manera externa sin la necesidad de que esté presente el patógeno, mediante la aplicación de los compuestos como Ácido Salicílico, Ácido Jasmónico ó Metil-Jasmonato, Oxido Nítrico, y Etileno. Se han descrito 3 rutas Biosintéticas para el AS, cada una de ellas es capaz de inducir SAR, la primera de ellas es la vía citoplásmica o vía del Fenil-propanoide, la segunda vía es la del Cloroplasto y la tercera es la vía alterna de la Vacuola, que hasta el momento ha sido la mayormente descrita (Kawano et al., 2004). Cada una de estas rutas es capaz de activarse en presencia de algún patógeno.

#### **2.5.4 Resistencia sistémica inducida**

La resistencia sistémica inducida (ISR), se caracteriza por estar mediada por vías metabólicas sensibles a ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) y ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico AS (Pieterse y Van Loon, 1999). Otro tipo de ISR, se desarrolla a partir de la colonización de las

raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR) (Vallaland y Goodman, 2004).

La ISR es bien conocida en la relación planta-insecto plaga, en la cual como ya mencionamos, todo gira en torno al AJ que como mensajero secundario realiza un trabajo muy similar a la inducción de resistencia local y luego se generaliza en la planta. El análisis conjunto de la actividad de AS y AJ realizado por Staswick y Lehman (2000) mostró que no deben usarse ambos productos simultáneamente, porque existe una acción de bloqueo que inhibe ciertas reacciones de defensa. Es importante notar que el modo de acción del AJ para el control de insectos plaga resulta más eficaz que otros mediadores como ET o AS empleados aisladamente (Staswick y Lehman 2000).

### **2.5.5 Resistencia inducida por heridas**

La resistencia inducida por herida (WIR, por sus siglas en inglés), se activa tras el ataque de una planta por insectos que causan daño/herida, como los insectos comedores. Es una resistencia sistémica y duradera, pero no es de amplio espectro, ya que protege frente a otros insectos comedores. La activación de la WIR depende de la ruta regulada por la hormona JA. La señal sistémica de la WIR es el péptido denominado sistemina. Igualmente, se ha identificado el receptor celular de la sistemina, que es una RLK (Receptor-Like Kinase) (Vallaland y Goodman, 2004).

## **2.6 Elicitores**

Las plantas tratadas con elicitores generalmente desarrollan resistencia en el hospedero, debido a que la aplicación de estos sobre la superficie de la

planta activa múltiples vías de señalización de defensa intracelular (Odjacova y Hadjiivanova, 2001; Garcia-Brugger et al., 2006; Bent y Mackey, 2007; Holopainen et al., 2009).

Los elicitores son moléculas muy estables que inducen la respuesta de protección en las plantas, son de bajo peso molecular, y sintetizados como tales o liberados de precursores poliméricos durante la infección (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Zhao et al., 2005; Boller and Felix. 2009; Holopainen et al., 2009). Su variabilidad es inferior a la del resto del patógeno, por lo cual han sido “elegidas” por plantas y animales como las “huellas deladoras” de los diferentes grupos de patógenos (Somssich y Hahlbrock, 1998; Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Zhao et al., 2005; Dodds y Rathjen, 2010).

El Elicitor precisa ser reconocido en la planta por un receptor (proteína), que activa la expresión de genes de defensa. Existen dos grupos de elicitores, los biogénicos y los abiogénicos. Los elicitores biogénicos se dividen a su vez en dos grupos, exógenos y endógenos. Los exógenos son aislados de patógenos o su medio de cultivo, mientras que los endógenos son aislados de tejidos de la misma planta (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Zhao et al., 2005; Bent y Mackey, 2007). Por su parte, los elicitores abiogénicos son iones de metales pesados, inhibidores de algunas etapas metabólicas, radiaciones UV, algunas clases de antibióticos y fungicidas (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002). Comparado con los elicitores biogénicos, los elicitores abiogénicos inducen las reacciones de defensa de la planta cuando son administrados en dosis relativamente altas, por su parte, los elicitores biogénicos son activos a muy bajas dosis. Cuando son aplicados, causan síntomas no visibles de demanda y acumulación de compuestos de estrés tóxico que sensibilizan el tejido de la planta y mejoran su resistencia a subsecuentes infecciones (Ozeretskovskaya et al., 1994; Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Bent y Mackey, 2007; Boller y Felix. 2009).

La estructura química de los elicitores está conformada por glicoproteínas, polipéptidos, oligosacáridos, polisacáridos, compuestos que contienen lípidos u otros compuestos (Odjacova y Hadjiivanova, 2001). Algunos elicitores proteínicos

son directamente producidos por bacterias u hongos patógenos, mientras que los oligosacaridos biológicamente activos son liberados del patógeno y pared celular de plantas por las hidrolasas secretadas de ambos organismos.

Este método de resistencia inducida por elicitores se caracteriza primordialmente por las ventajas que presenta: A) Seguridad ecológica, ya que el método se basa en la inducción del potencial natural inmunológico de la planta hospedera y no en la supresión de fitopatógenos. B) Tiene un efecto sistémico y prolongado. C) Participación de múltiples sistemas de defensa en la resistencia inducida, lo que hace la adaptación de los patógenos a especies protegidas, casi imposible. D) Inducción de resistencia no específica para diversos patógenos como hongos, bacterias, virus, nematodos, etc., (Ozeretskovskaya y Vasyukova, 2002; Zhao et al., 2005; Dodds y Rathjen, 2010). Por lo tanto, es importante aprender como perciben las plantas la presencia de patógenos e inician la defensa.

### **2.6.1 Eventos de señalización celular inducidos por elicitores**

Tanto el estrés biótico como los elicitores conducen a una serie de eventos intracelulares con el propósito de activar y mejorar la respuesta inmune primaria de la planta, y en ambos casos, el reconocimiento molecular es necesario para iniciar la vía de señalización. Los primeros eventos asociados tanto con PTI y ETI son la fosforilación de proteínas o activación de proteínas de membrana plasmática, movilizar o generar directa o indirectamente diversas moléculas de señalización tales como el flujo rápido de iones calcio de almacenaje externo, oxido nítrico, especies reactivas de oxígeno (Garcia-Brugger, et al., 2006; Castro y García, 2009; Postel y Kemmerling, 2009; Dodds y Rathjen, 2010). Particularmente, la activación temprana de genes involucrados en la biosíntesis de fitohormonas modifica el balance hormonal, conduciendo a cambios transcriptómicos apropiados (Garcia-Brugger, et al., 2006).

En síntesis, en la ruta de señalización guiada por las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) se encuentran todos los componentes de transducción de señales que transfieren señales de receptores extracelulares a respuestas celulares en eucariotas, y sirven como un regulador central altamente conservado de crecimiento, muerte, diferenciación, proliferación y respuestas al estrés (Nakagami et al., 2005; Fiil et al., 2009; Dodds y Rathjen, 2010). Una cascada típica de MAPK consiste de un complejo modular de cinasa activada por MAPK cinasa (MAPKKK) las cuales se fosforilan a MAPK cinasa (MAPKK) que se vuelven a fosforilar hasta llegar a MAPK (Nakagami et al., 2005; Saucedo and Gavilanes, 2005; Garcia-Brugger et al., 2006; Vlot et al., 2009; Dodds y Rathjen, 2010). Estas rutas regulan la actividad de varios sustratos, tales como factores de transcripción y proteínas cinasas. Importantemente, las cascadas MAPK han sido implicadas tanto en PTI como en ETI y la expresión de genes tempranos o tardíos, sugiriendo que las repuestas en general son las mismas pero varían en magnitud (Tao et al., 2003; Pitzschke et al., 2009).

### **2.6.2 Inducción de resistencia mediante el uso de elicitores**

La resistencia inducida es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios claros en el metabolismo provocados por la expresión diferencial. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998). El efecto de resistencia inducida (IR) promovido por elicitores ha sido evaluado tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Entre los elicitores comúnmente usados en la inducción de resistencia para el control de enfermedades se encuentran el ácido salicílico (AS), el quitosan (QN), el metil jasmonato (JM) y acibenzolar-S, un análogo de AS que se asocia con la acumulación de AS y proteínas relacionadas a patogénesis (PR) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Elicitores usados en la resistencia inducida para el control de enfermedades.

Enfermedad	Agente causal	Cultivo	Elicitor	Referencia
<b>Marchitamiento por Fusarium</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. Melonis	Melón	Metil Jasmonato	Buzi et al., 2004
<b>Oidio</b>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei	Cebada	ASM, Quitosano	Faoro et al., 2008 Iriti et al., 2008;
	<i>Erysiphe necator</i>	Uva	Quitosano	Vitalini et al., 2009
<b>Tizon ampuloso</b>	<i>Exobasidium vexans</i>	Té	ASM, AS	Ajay and Baby, 2010
<b>Ataque de raíz por cochinilla</b>	<i>Armadillium vulgare</i>	Lechuga	AS, AJ	Tierranegra-García et al., 2011
<b>Fusariosis de la espiga</b>	<i>Fusarium graminearum</i>	Trigo, cebada y <i>A.thaliana</i>	AS, AJ	Makandar et al., 2010

### 2.6.2.1 Ácido salicílico y su actividad inductiva

El ácido salicílico (AS) es una fitohormona ubicua en plantas que genera un impacto significativo sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, fotosíntesis, transpiración, intercambio iónico y transporte de electrones, así como cambios específicos en la anatomía de las plantas, hojas y en la estructura del cloroplasto.

Además de lo anterior, el AS es una molécula de señalización endógena que media el mecanismo de defensa de la planta contra patógenos e induce la producción y acumulación de PPRs que están involucradas en la inducción de resistencia (Alvarez, 2000; Darby et al. 2000).

Mayers et al (2005) mostraron que el AS induce resistencia al virus del mosaico del pepino (CVM) en plantas de *Arabidopsis thaliana* y chayote. Lo anterior, debido a que el tratamiento previo (5 días) con AS (1 y 2 mM

respectivamente para cada planta) indujo la inhibición del movimiento sistémico del CMV así como retraso de síntomas. En chayote observaron el mismo comportamiento, sin embargo, el movimiento del virus célula-célula fue menor que en *A. thaliana*; esto se puede atribuir a que se generó una resistencia a la replicación del virus en el tejido infectado o bien a la inhibición sistémica de circulación del virus.

Por otro lado, Anand et al., (2007) llevaron a cabo la aplicación exógena de AS (5mM) en plantas de *Nicotiana benthamiana* previas a la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Llegaron a la conclusión que la aplicación exógena de AS induce la defensa de la planta mediada por esta fitohormona; debido a que se observaron que se disminuía la susceptibilidad a esta bacteria del suelo; comparada con la planta control donde se observaba un fenotipo totalmente susceptible. Además, la aplicación exógena de AS a cultivos de *A. tumefaciens* disminuye su crecimiento, virulencia y adherencia a células vegetales (Anand et al., 2007).

#### **2.6.2.2 Actividad antimicrobiana de quitosan**

El quitosan, es un polisacárido lineal compuesto de cadenas  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) distribuidas aleatoriamente. Se extrae mediante la desacetilación de la quitina, principal elemento estructural del exoesqueleto de los crustáceos. Esta molécula tiene potencial uso en la agricultura en lo que concierne al control de enfermedades de plantas debido a que se ha mostrado que inhibe el crecimiento y toxicidad de hongos. Además, se ha visto que activa la respuesta de defensa en plantas contra virus y bacterias; aumentando la acumulación de fitoalexinas y proteínas PR en la planta (El-Hadrami et al., 2010).

Vasyukova et al (2001) mostraron que el quitosan soluble en agua de bajo peso molecular y a una concentración de 1000  $\mu$ g/ml, indujo resistencia sistémica

y local en papa (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) a *Phytophthora infestans* y nemátodos respectivamente. También mostraron que el quitosano indujo la acumulación de fitoalexinas en el tejido de la planta hospedera, además de estimular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La activación del mecanismo de protección en el tejido de la planta, e inhibió el crecimiento de diferentes patógenos como el Oomiceto *Phytophthora infestans* y el nematodo de raíz *Meloidogyne incognita*.

Por su parte, Kulikov et al (2006) evaluaron el efecto del peso molecular del quitosano y su habilidad para suprimir la infección sistémica del virus del mosaico moderado del frijol en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Mostraron que las plantas tratadas con las fracciones de quitosano (1.2–40.4 kDa) así como la concentración de aspersión usada (10 y 100 µg/ml); inhibía la acumulación del virus y propagación sistémica. Concluyendo que el grado de resistencia antiviral inducida por el quitosano incrementaba cuando disminuía el peso molecular del mismo.

### **2.6.2.3 Participación del peróxido en el mecanismo de defensa**

Uno de los mecanismos de defensa que han desarrollado las plantas es la utilización y modificación del oxígeno molecular ( $O_2$ ) para convertirlo en derivados con un alto grado de toxicidad hacia microorganismos potencialmente patógenos (García-Pineda et al., 2004). El estallido oxidativo es una de las reacciones más rápidas de defensa al ataque de patógenos ya que constituye la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (reactive oxygen intermediates, ROI), principalmente superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en el lugar donde el patógeno fue reconocido (Apostol et al., 1989). El  $H_2O_2$  activa o inactiva proteínas involucradas con transducción de señales para la expresión de genes relacionados con tolerancia a diversos tipos de estrés incluyendo estrés oxidativo, hídrico y derivado de patógenos (McAinsh et al., 1996; Moon et al., 2003; Apel y Hirt, 2004; Pitzschke et al., 2006). Debido a que este puede atravesar la

membrana vegetal, el  $H_2O_2$  es capaz de actuar como molécula de señalización de una célula a otra participando en varias rutas y particularmente en aquellas que involucran MAPKs (Saucedo-García y Gavilanes-Ruíz, 2005; Benezzer- Benezzer et al., 2008).

El ritmo de producción de ROS (por sus siglas en inglés de Reactive Oxygen Species) es elevado radicalmente cuando las plantas están bajo estrés, en comparación con los bajos niveles de producción de estas moléculas en condiciones óptimas de crecimiento de la planta. El aumento de la producción de estos compuestos, es parte importante de la respuesta de defensa de las plantas para hacer frente a factores bióticos o abióticos que provoquen estrés, pues están involucrados en eventos como el reforzamiento de la pared celular y la activación de genes de defensa (Orbán y Boká, 2013). Entre las ROS, el compuesto más estudiado es el  $H_2O_2$  debido a su estabilidad y su capacidad de difusión a través de membranas, lo que le permite desempeñar un papel fundamental en la generación y modificación de respuestas de defensa (Orbán y Boká, 2013). El  $H_2O_2$  es producido como una de las primeras respuestas del sistema de defensa de las plantas, para conseguir resistencia o tolerancia a diferentes tipos de estrés, debido a que interviene en la activación o inactivación de proteínas involucradas en la transducción de señales para la expresión de genes relacionados con la tolerancia a estrés de tipo oxidativo, hídrico, y estrés derivado de patógenos (Orozco et al., 2001; Apel y Hirt, 2004). Sirve como un mediador clave de activación de ABA, una fitohormona con importantes funciones en la respuesta adaptativa a estrés tanto de tipo biótico como abiótico y es capaz de actuar como molécula de señalización de una célula a otra participando en varias rutas, especialmente en aquellas que involucran Proteínas Cinasa Activadas por Mitógenos (Benezzer et al., 2008; Munemasa et al., 2013). Además, es sabido que durante una interacción compatible entre planta-patógeno, los niveles de  $H_2O_2$  incrementan dramáticamente, al igual que las respuestas de defensa estructurales, en donde el  $H_2O_2$  actúa como co-factor para reforzar la pared celular a través de uniones cruzadas de polímeros, lo cual hace posible el endurecimiento

y por lo tanto impide la penetración y proliferación de los patógenos. (Camarena y de la Torre, 2007; Fones y Preston, 2011; Chen et al., 2012; Yang et al., 2013).

Por todo lo anterior, es necesario determinar la concentración y oportunidad adecuada de peróxido de hidrógeno para poderlo usar como agente elicitor y evaluar el efecto de protección que ejerce en plantas contra patógenos.

## **2.7 Genes relacionados al estrés biótico**

### **2.7.1 Proteínas relacionadas a la patogénesis (PR)**

Las proteínas relacionadas con la patogénesis son un grupo de proteínas *de novo* que se inducen en plantas como respuesta al ataque de algún patógeno, el cual provoca la activación de genes mediante el mecanismo SAR (Van Loon et al., 2006). Los principales grupos de proteínas *PR* (*PR1-PR5*) se han caracterizado por técnicas genéticas y moleculares, y separado por extracción ácida, a pH 2.8, en hojas de tabaco infectado con el geminivirus *PepGMV* y de acuerdo a ello, se clasificó como *PR1* a las proteínas de migración electroforética más rápida (Antoniw et al., 1980). Este grupo de proteínas es el más abundante, pues ha alcanzado hasta 1-2 % de las proteínas totales de las hojas. Debido a que aún se desconoce la función específica de las proteínas tipo *PR1*, se ha hecho una comparación en varios taxones vegetales, y ha indicado que la familia *PR1* es altamente conservada en las plantas, por lo que se sugiere que comparten un origen evolutivo y poseen una actividad esencial para el funcionamiento y la supervivencia de los seres vivos. Los genes que derivan las proteínas *PR1* son genes relacionados con la defensa, conocidos como dependientes de la vía de AS y su expresión es regulada positivamente por *NPR1* (Heil y Bostock, 2002; Edreva, 2005; Hyong et al., 2007). Cabe señalar, que la activación de estas proteínas puede ser inducida por la aplicación de elicitores como AS, ácido jasmónico, etileno, quitina o quitosán, los cuales también pueden aumentar el nivel de resistencia a patógenos de las plantas.



### **2.7.2 Catalasa**

La catalasa (*CAT*) es una homoproteína tetramérica, presente en todos los organismos aeróbicos, que existe como múltiples isoenzimas codificadas por genes nucleares que se encuentran principalmente en los peroxisomas y glioxisomas. Las isoenzimas de catalasa difieren en propiedades bioquímicas, así como en su especificidad, pero su función principal probablemente implica conversión de ácidos grasos, además de su relación con la lignificación y la fotorrespiración (Xing et al., 2007; Soares et al., 2010).

Diversos estudios han demostrado que existe un vínculo entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y procesos tales como el crecimiento, el desarrollo y la respuesta a estrés biótico y abiótico. Asimismo las ROS y la SAR están relacionadas por la regulación de retroalimentación positiva, ya que la producción de ROS es parte de la red de señalización para la inducción de SAR. Para contrarrestar la toxicidad o estrés oxidativo que ROS puede causar, las plantas han desarrollado un sistema de defensa de enzimas antioxidantes altamente eficiente, entre las cuales se incluye la catalasa, que participa en el aumento a la tolerancia a diferentes factores de estrés y es una de las enzimas predominantes que actúa un mediador de la respuesta de defensa, ya que la reducción de su actividad se relaciona con la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es decir la expresión del gen *CAT* puede ser inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de patógenos y AS, lo cual es importante en el establecimiento de SAR (Xing et al., 2007; Camarena y de la Torre, 2007; Soares et al., 2010; García y Rivera, 2011; Guevara et al., 2012).

### **2.7.3 Fenilalanina amonio liasa**

La fenilalanina-amonio-liasa (*PAL*, por sus siglas en inglés de Phenylalanine ammonia-lyase) es una enzima constitutiva que actúa en la vía de

fenilpropanoide en plantas superiores. Está implicada en la síntesis de fitoalexinas, que son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular. La expresión de *PAL* puede ser inducida por elicitores como AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su activación genera un aumento en el contenido fenólico en las plantas, lo que sugiere que es una respuesta asociada con la resistencia a enfermedades (Martínez et al., 2001; Van Loon et al., 2006; Singh et al., 2009; Mejía et al., 2013). Esta enzima actúa entre el metabolismo primario y secundario, ya que cataliza el primer paso en la desaminación responsable de la conversión de la fenilalanina (Phe) a ácido trans-cinámico, el cual es un intermediario en la vía para la producción de flavonoides, cumarinas y ligninas (Figura 7) (Zhao et al., 2005; Song y Wang, 2009).

*PAL*, también participa de modo determinante en la generación de compuestos fenólicos y estructuras de defensa. Es probable que en su regulación esté implicada la interacción contra microorganismos patógenos y que sea clave en la activación de los mecanismos de defensa vegetales ya que es la enzima que regula los diferentes metabolitos obtenidos en la biosíntesis de fenilpropanoides (Ardila et al., 2007).

#### **2.7.4 Factor de transcripción WRKYd**

Las proteínas WRKY, constituyen una gran familia de factores de transcripción codificados en todas las plantas superiores. Las funciones precisas que desarrollan aún no se han aclarado, sin embargo se conocen al menos 72 miembros en *Arabidopsis thaliana* y 100 en arroz (Park et al., 2006, Dang et al., 2013). Estos factores de transcripción se caracterizan por una secuencia de aminoácidos WRKYGQK en su extremo N-terminal, la cual es una región conservada de 60 aminoácidos que presenta un dedo de zinc en el C-terminal. Aunque los miembros de la familia de los genes *WRKY* comparten un número diferente de dominios WRKY, las interacciones entre proteínas WRKY pueden resultar en homocomplejos o heterocomplejos, que alteran la regulación transcripcional y de esta manera pueden servir como nodos entre las distintas

funciones fisiológicas a través de la regulación de los distintos grupos de genes (Oh et al., 2008; Lim et al., 2011; Chen et al., 2012). Es posible que estas funciones incluyan la senectud, el desarrollo de tricomas, de semillas y la biosíntesis de metabolitos secundarios, sin embargo, en la mayoría de los miembros WRKY, sus posibles funciones en la señalización siguen siendo en gran medida desconocidas, especialmente en plantas que no son modelo de estudio (Oh et al., 2008; Lim et al., 2011; Li et al., 2012; Dang et al., 2013).

Los factores WRKY tienen papeles importantes como reguladores positivos y negativos a través de la regulación transcripcional o de la interacción proteína-proteína en los aspectos de la respuesta de defensa de las plantas (Huh et al., 2012). Pueden tener la función de factor de transcripción en cascadas de señalización relacionadas con la defensa, éstas se han visto involucradas en varios procesos de las plantas, incluyendo la respuesta al estrés biótico o abiótico. También están implicados en la fuerte y rápida respuesta a inductores de resistencia a enfermedades, en la señalización de ROS, como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la respuesta a heridas y daño por patógenos, como virus, bacterias y hongos (Park et al., 2006; Rushton et al., 2010; Chen et al., 2012).

Los elementos conservados de los factores de transcripción WRKY reconocen una secuencia específica de TTGAC conocida como caja W, la cual se encuentra dentro de los promotores de muchos genes relacionados con la defensa, tales como los genes *PR*, y por lo tanto son necesarias para inducir su expresión (Park et al., 2006; Oh et al., 2008; Lim et al., 2011; Nuruzzaman et al., 2014).

Los factores de transcripción WRKY se han clasificado en tres grupos (I, II, y III), el grupo II se compone de varios subgrupos (IIa, IIb, IIc, IId y IIe) basados principalmente en diferentes estructuras primarias (Chen et al., 2012; Huh et al., 2012). El grupo WRKY IIa se ha descrito como regulador positivo y negativo en la defensa de la planta. Algunos miembros de este grupo contienen un motivo asociado con la función de represión, sin embargo en *Capsicum annuum* existe un gen codificado por el grupo IIa, designado factor de transcripción *Capsicum annuum* WRKYd (*CaWRKYd*), el cual no contiene estos motivos, lo que sugiere

que desempeña un papel positivo en la defensa. Además se ha observado que su expresión aumenta por tratamientos hormonales relacionados con la defensa de las plantas y durante el silenciamiento de éste se ha afectado la expresión de los genes *PR* (Huh et al., 2012).

Diversas investigaciones han demostrado que los factores de transcripción WRKY presentan tanto autorregulación, como regulación cruzada, por lo que pueden llevar a cabo sus funciones en diversas vías de señalización a través de la interacción física con diferentes proteínas, como MAP quinasas, MAP quinasa quinasas, calmodulina, histonas deacetilasas, entre otras. Recientemente se ha hecho evidente, el papel de los factores específicos WRKY que están asociados con la defensa inducida en la cascada de señalización de protein quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Rusthon et al., 2010). Durante la respuesta al estrés y las señales de transducción, las proteínas WRKY actúan río abajo de diversas MAPKs y parecen estar reguladas en varios niveles en los que implica la fosforilación por éstas proteínas (Agarwal y col, 2011; Chen et al., 2012).

### **2.7.5 Proteínas quinasas activadas por mitógenos**

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) constituyen una importante vía de señalización muy conservada utilizada para traducir estímulos extracelulares en respuestas intracelulares en organismo eucariotas; incluidos animales, levaduras y plantas (Asai et al., 2008; Liang et al., 2013). La cascada MAPK se ha caracterizado ampliamente en plantas y algunas otras especies. Ésta es formada por tres módulos de quinasas; MAPKKK, MAPKK y MAPK, que están vinculados de diversas maneras a receptores río arriba y abajo (Jonak et al., 2002; Asai et al., 2008). Ésta vía interviene en transductores de señales a través de la fosforilación e integra la información del entorno celular a la respuesta transcripcional y centros de respuesta metabólicas (Asai et al., 2008; Liang et al., 2013). Las vías de señalización MAPK participan en la regulación del crecimiento y muerte celular, la diferenciación, el ciclo celular y las respuestas a una diversidad de estímulos ambientales bióticos o abióticos como el frío, el calor,

radiación UV, sequía, ROS y ataque de patógenos (Jonak et al., 2002; Pitzschke et al., 2009), por ello las MAPKs actúan con receptores o sensores de transducción de estímulos extracelulares para lograr una adaptación de las respuestas intracelulares asociada con la resistencia adquirida basal y SAR (Qiu et al., 2008; Liang et al., 2013). Debido a que la detección de las señales de estrés y su transducción en las respuestas adecuadas es crucial para la adaptación y supervivencia de las plantas, el papel de la cascada de MAPK es muy importante en la señalización, además de ser un paso esencial en el establecimiento de la resistencia a los patógenos (Pitzschke et al., 2009).

Existen pruebas tanto bioquímicas como genéticas que indican que la expresión de múltiples miembros de la familia de las MAPK en una célula puede contribuir a la especificidad de las señales de transmisión y permitir la integración de las señales en respuesta a diversos estímulos fungiendo como puntos de divergencia entre ellos (Ichimura et al., 2002; Jonak et al., 2002; Qiu et al., 2008; Liang et al., 2013). Uno de los objetivos de las cascadas MAPK cuyas actividades están directa o indirectamente reguladas por la fosforilación con MAPK son los factores de transcripción de unión al ADN. De este modo éstas cascadas pueden regular la expresión génica en respuesta a señales extracelulares. (Qiu et al., 2008).

Las MAPKs se pueden clasificar en grupos en función de su dominio conservado S/TxxxxxS/T y otros sitios específicos (Asai et al., 2008; Liang et al., 2013). Una MAPKK (MKK1) conocida también como MAPK o ERK quinasa o MEK ha sido identificada como un inductor de la respuesta a estrés biótico y abiótico como parte de una cascada de señalización. La expresión del gen MKK1 puede ser inducida por heridas, frío, sequía y alto estrés salino o la aplicación de elicitores derivados de patógenos tales como la flagelina y la laminarina, así como por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ichimura et al., 2002; Asai et al., 2008; Qiu et al., 2008; Liang et al., 2013). Además de acuerdo a algunos estudios la cascada en donde interviene MKK1 en conjunto con otras MAPKs podría ser un mecanismo importante para la regulación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de las plantas, las interrupciones de ésta pueden llevar a un exceso de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posteriormente a la muerte

celular. Por ello se creó que el  $H_2O_2$  sirve como una señal de estrés río arriba en la cascada de MKK1 a manera de retroalimentación negativa para la regulación del nivel de  $H_2O_2$  (Mészáros et al., 2006; Gao et al., 2008).

## 2.8 Fenoles y flavonoides

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas, esenciales para su crecimiento, reproducción y en la protección frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa en condiciones de estrés como infecciones, radiaciones UV, entre otros. Éstos forman un grupo heterogéneo de más de 10 000 compuestos con distintas características y numerosas funciones en plantas, entre las que se encuentran la defensa de las plantas, la regulación del metabolismo y la síntesis de la lignina (Taiz y Zeiger, 2006). Este tipo de compuestos son sintetizados por dos rutas; la ruta de ácido malónico, que aunque es importante fuente de fenoles en hongos y bacterias, no lo es tanto en plantas; y la ruta del ácido shiquímico que es la responsable de síntesis de la mayoría de los fenoles en las plantas, los cuales derivan de la fenilalanina en una reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL). El incremento en la síntesis de compuestos fenólicos, en algunas especies vegetales como la lechuga, está relacionado con la acumulación de AS y el metil jasmonato (Taiz y Zeiger, 2006; Tierranegra et al., 2011; García y Rivera, 2011).

Las plantas superiores presentan en gran proporción, principalmente en hojas, flores y fruto, un grupo de componentes polifenólicos conocidos como flavonoides (flavonas, flavonoles, antocianinas, etc), metabolitos secundarios que se encuentran altamente correlacionados con la capacidad antioxidante de la planta y la defensa de éstas (Arnnok et al., 2012; Cheng et al., 2013). Las vías de biosíntesis de flavonoides parecen estar reguladas principalmente a nivel transcripcional, se encuentran en el límite de metabolismo primario y secundario, ya que se sintetizan por la combinación de las vías de fenilpropanoides y de policétidos. La ruta de fenilpropanoides proporciona el p-cumaroil-CoA, mientras que la vía de policétido es responsable de la elongación de la cadena mediante la

utilización de la malonil-CoA reductasa como la unidad de condensación. Debido a sus funciones ecológicas y fisiológicas en respuesta a factores ambientales, los genes de biosíntesis de flavonoides han evolucionado hasta convertirse en una de las vías más ampliamente extendidas en las plantas y son actualmente necesarios para cumplir con los requerimientos para la adaptación a las diferentes presiones ambientales en las que crecen las plantas (Saito et al., 2013).

### 3 HIPÓTESIS

Los elicitores Acido Salicílico, Quitosan y Peróxido de Hidrógeno activan genes de respuesta a varios tipos de estrés biótico, generando resistencia inducida en la planta *Capsicum annuum* L.

## 4 OBJETIVO

Determinar el efecto de protección que ejercen los elicitors AS, Quitosan y  $H_2O_2$  a estrés biótico en el sistema *Capsicum annuum* L.

### 4.1 Objetivos específicos

1. Determinar la concentración y oportunidad de aplicación de cada elicitor para *Capsicum annuum* L.
2. Determinar la cantidad de  $H_2O_2$  y actividad enzimática en plantas inducidas con elicitors.
3. Evaluar la respuesta fenotípica a estrés biótico inducida por elicitors en *Capsicum annuum* L.
4. Determinar el patrón de expresión genica de la interacción *Capsicum annuum* L.–elicitor–estrés biótico.

## **5 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Material biológico**

#### **5.1.1 Plantas de *Capsicum annuum* L.**

Las semillas de *Capsicum annuum* L. variedad Don Pancho y Don Benito, fueron proporcionadas por el INIFAP-Campo Experimental Bajío. Las plantas obtenidas para los ensayos correspondientes se germinaron y mantuvieron en el cuarto de germinación perteneciente al laboratorio de biotecnología del Área de Biosistemas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro.

#### **5.1.2 Cepa silvestre de geminivirus *PepGMV***

Para la inoculación viral se emplearon los componentes A y B del geminivirus *PepGMV*, los cuales fueron proporcionados gentilmente por CINVESTAV-Unidad Irapuato. Estos componentes virales se encuentran clonados en el plásmido bluescript SK + (pBS) en construcciones diméricas. Los componentes A y B del *PepGMV* son digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* respectivamente (Figura 5.1), para dar lugar a un fragmento de aproximadamente 2.9 Kb correspondiente al pBS (2958 pb) y a dos monómeros de ADN viral con un tamaño aproximado de 2.6 Kb que corresponden al tamaño del componente A (2613 pb) y B (2595 pb).

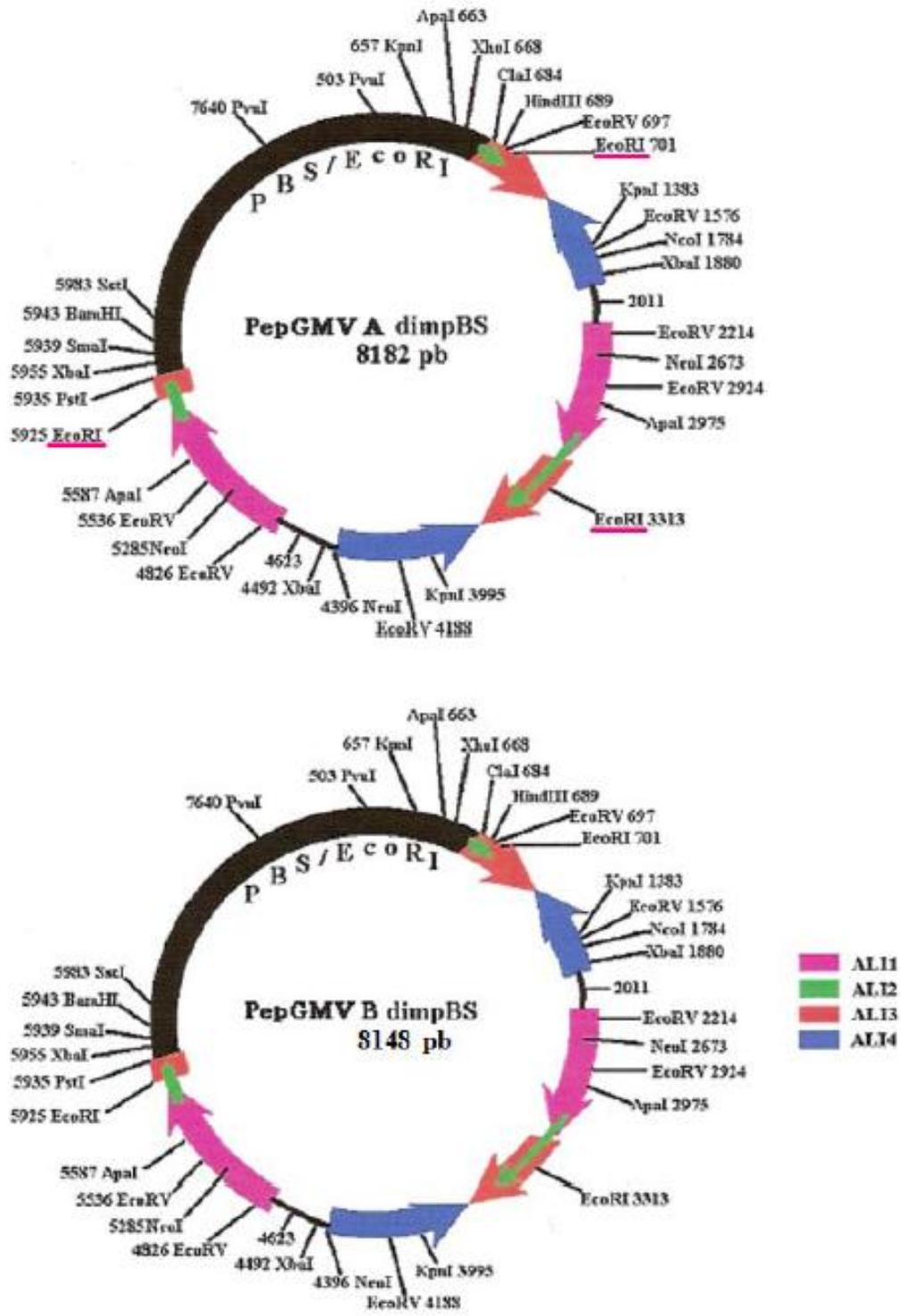


Figura 5.1. Mapa de restricción de los componentes A (pBS::ComA) y B (pBS::ComB) del PepGMV en el plásmido bluescript SK + (León-Galván, 2004).

### **5.1.3 Cepa de *Phytophthora capsici***

Para la inoculación con el Oomyceto *Phytophthora capsici*, se usó la cepa C7P8F7 preservada en medio de cultivo papa dextrosa al 1.5% a 25°C (PDA, Anexo II). Dicha cepa fue gentilmente proporcionada por INIFAP Campo Experimental Bajío. Es un aislado de Dolores Hidalgo, Guanajuato, México, que presentó la mayor virulencia entre 32 aislados monozoospóricos obtenidos en un estudio realizado por el INIFAP, sobre la variabilidad genética de *P. capsici* en Guanajuato.

### **5.1.4 Cepa bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *vesicartoria***

Se empleó la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicartoria* preservada en medio de cultivo YPG (Anexo II), para la inoculación de *C. annuum* L. en las interacciones planta-elicitor-patógeno. Esta bacteria fue proporcionada gentilmente por el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica de San Luis Potosí.

### **5.1.5 Quitosan**

El quitosan empleado en la presente investigación, es derivado de quitina de camarón, tiene 1836.277 g/mol de peso molecular, con grado de desacetilación del 95 %. Fue gentilmente proporcionado por la FESC-UNAM.

## **5.2 Métodos**

La metodología que a continuación se describe, se dividió en dos segmentos principales. El primer segmento se estableció para determinar el estrés oxidativo y oportunidad de aplicación del elicitor en *C. annuum* L. El segundo fue establecido para evaluar el efecto de protección que genera el elicitor en interacciones planta-elicitor-patógeno, mediante el análisis del fenotipo y expresión de genes relacionados al estrés biótico, así como la producción de metabolitos secundarios generados por esta interacción.

### **5.2.1 Germinación de plantas *Capsicum annuum* L.**

Las semillas de las variedades Don Benito y Don Pancho de *C. annuum* L. fueron tratadas con 200 ppm de KNO<sub>3</sub> (Anexo II) para estimular la germinación. Después de la germinación, las plántulas de *C. annuum* L. se crecieron en vasos de unicel de 250 mL con substrato peat moss en un cuarto de germinación con fotoperiodos de 16 h luz–8 h oscuridad a 25°C. Las plantas fueron regadas con solución Stainer al 50% (Anexo II; Stainer, 1984).

### **5.2.2 Determinación de la concentración de elicitores**

De acuerdo a lo descrito en antecedentes, las concentraciones de ácido salicílico (AS) que han tenido un efecto antimicrobiano se encuentran en un rango de 1-10 mM, las de quitosan (QN) van de 10-1000 µg/mL, y las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), empleadas experimentalmente en el grupo de Biosistemas, se encuentran en un rango de 10-18 mM (Mayers et al., 2005; Anand et al., 2007; Vasyukova et al., 2001; Kulikov et al., 2006; Tierranegra-García et al., 2011). Tomando en cuenta lo anterior, se determinó la concentración de cada elicitor usando como base la concentración más alta de cada uno de ellos. A partir

de esta concentración máxima se establecieron la concentración mínima y media para cada elicitor. Estableciéndose entonces para AS las concentraciones 0.1, 6.7 y 10 mM. Para QN, 10, 670 y 1000 µg/mL y para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> las concentraciones establecidas fueron 6, 14 y 18 mM (Anexo II). Las soluciones de QN fueron previamente hidrolizadas de acuerdo a lo descrito por Lizárraga-Paulín et al. (2011).

### **5.2.3 Tratamiento con elicitores y determinación de oportunidad de aplicación**

El tratamiento con los elicitores se realizó de manera foliar en plantas de *C. annuum* L. de 8-10 hojas verdaderas de edad fenológica. Las plantas control fueron tratadas sólo con agua. Dos aplicaciones únicas fueron llevadas a cabo en tiempos diferidos, con el objetivo de generar una dinámica de estrés oxidativo y evaluar la duración del efecto inductivo en la planta. Lo anterior, para poder establecer a través de la dinámica oxidativa una oportunidad de aplicación. La generación *in situ* y cuantificación endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las actividades enzimáticas de catalasa (CAT) y fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés de *phenylalanine ammonia lyase*), la expresión de los genes *cat1*, *pal*, *pr1* y *gpdh*, así como la determinación total de fenoles y flavonoides; fueron las variables de respuesta evaluadas en la dinámica oxidativa. Cabe señalar, que también se midieron indicadores fenológicos como altura y diámetro de la planta. La aplicación de elicitores se llevó a cabo tanto en la variedad Don Benito como en la variedad Don Pancho de *C. annuum* L., siguiendo un diseño de tratamientos completamente aleatorio (Tabla 5.1, Figura 5.2). El muestreo fue realizado entre dos periodos de tiempo, de acuerdo a las dos aplicaciones únicas de elicitores que se llevaron a cabo. Para el primer muestreo respecto a la primera aplicación, las muestras fueron tomadas inmediatamente después de la primera aplicación (idpa) de elicitores en el día cero, así como a las 2, 4, 8 y 12 h post aplicación (hpa); y al día 1, 2, 3, 4, 5, 10 y 30 post aplicación (dpa) de elicitores. Subsecuentemente, la segunda aplicación de elicitores se hizo en el día 42 después de la primera

aplicación, cuando las plantas tenían una edad fenológica de 12-16 hojas verdaderas. El muestreo correspondiente a esta aplicación, se realizó segundos antes y después de la segunda aplicación, así como al día 1, 3, 4 y 5 dpa. La colecta foliar fue hecha de hojas apicales en ambos estadios fenológicos de las plantas analizadas.

Tabla 5.1. Diseño de tratamientos de aplicación de elicitores.

Tratamiento	Descripción	Elicitor	Concentración	Repeticiones	Unidad Experimental
T1	V1E1C1	AS	0.1 mM	3	3
T2	V1E1C2		6.7 mM	3	3
T3	V1E1C3		10 mM	3	3
T4	V1E2C1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6 mM	3	3
T5	V1E2C2		14 mM	3	3
T6	V1E2C3		18 mM	3	3
T7	V1E3C1	QN	10 µg/mL	3	3
T8	V1E3C2		670 µg/mL	3	3
T9	V1E3C3		1000 µg/mL	3	3
T10	V2E1C1	AS	0.1 mM	3	3
T11	V2E1C2		6.7 mM	3	3
T12	V2E1C3		10 mM	3	3
T13	V2E2C1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6 mM	3	3
T14	V2E2C2		14 mM	3	3
T15	V2E2C3		18 mM	3	3
T16	V2E3C1	QN	10 µg/mL	3	3
T17	V2E3C2		670 µg/mL	3	3
T18	V2E3C3		1000 µg/mL	3	3
T19	V1E0C0	Agua	-	3	3
T20	V2E0C0		-	3	3

V= variedad, E= elicitor, C= concentración

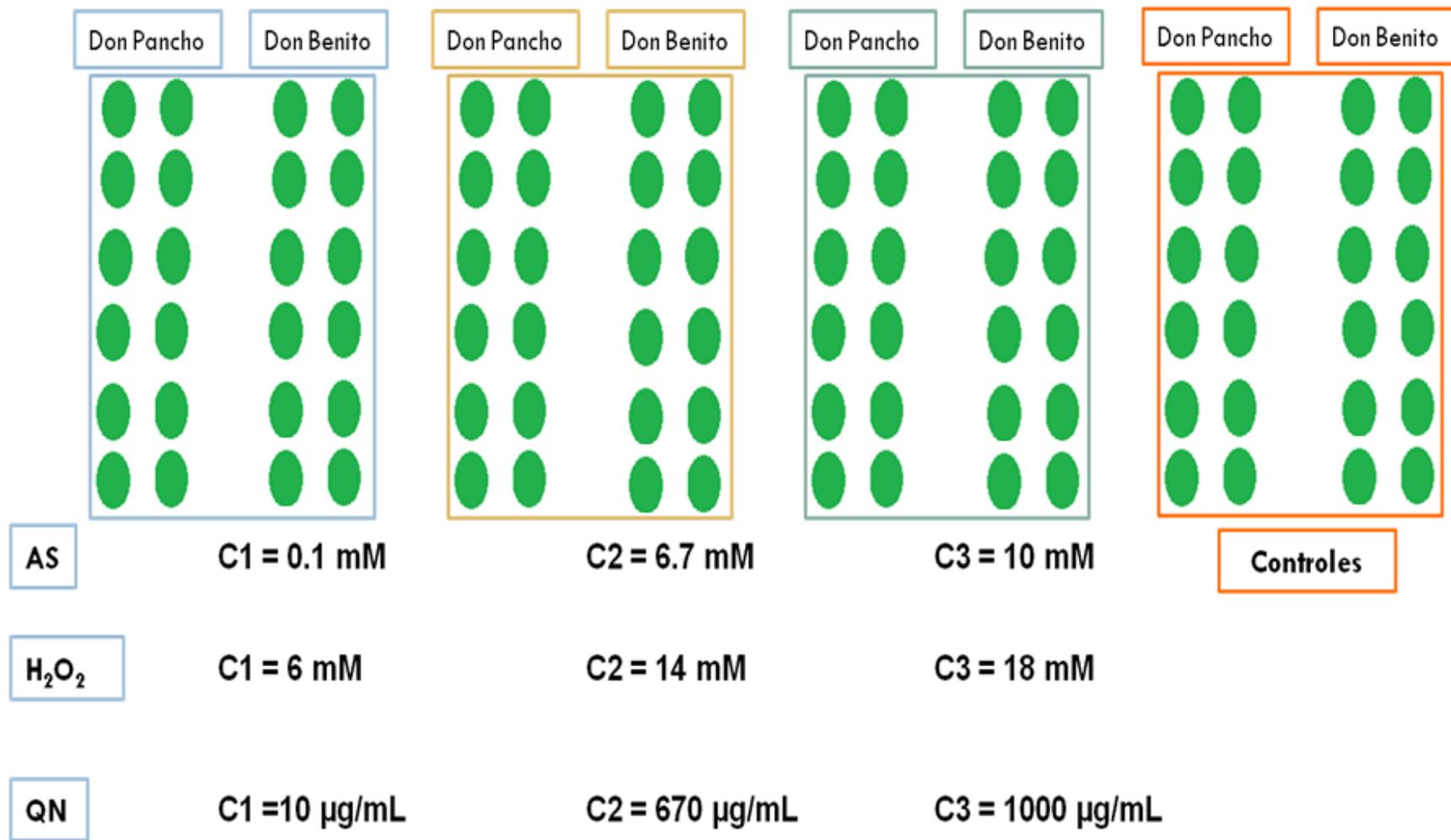


Figura 5.2. Esquema de distribución de tratamientos para la aplicación de elicitores en el cuarto de germinación.

## **5.2.4 Determinación de indicadores oxidativos**

### **5.2.4.1 Tinción citoquímica con 3,3-Diaminobenzidina (DAB)**

Esta tinción, es una técnica cualitativa que permite localizar histológicamente la generación *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La 3,3- diaminobenzidina (DAB) captura el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y lo polimeriza instantánea y localmente dando un polímero visible de color café rojizo. Cabe mencionar que la inestabilidad del peróxido de hidrógeno es sobrellevada por la alta estabilidad del polímero formando con el DAB (Thordal Christensen et al., 1997). La tinción se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Thordal Christensen et al (1997) con las siguientes modificaciones: las hojas apicales de las plantas fueron cortadas con un bisturí desde la base del tallo, y sumergidas en una solución de 1mg/mL de DAB/MOPS 10 mM (Anexo II) por un periodo de 8 h cubiertas de la luz a 25 °C. La solución fue acidificada con HCl concentrado hasta obtener un pH 3.8 necesario para solubilizar DAB. Transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con metanol en baño maría para agilizar la despigmentación de la hoja y presente la tinción histológica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente, el material vegetal se almacenó en glicerol al 50% para su conservación y observación visual y en estereoscopio de la tinción. Cabe mencionar que la modificación que se hizo al método, fue en el regulador, ya que en lugar de usar 2-N- morfilino ácido etanosulfónico (MES) se utilizó 3-N- morfolino ácido propanosulfónico (MOPS 10 mM), dado que comparten características similares de pH por ser reguladores de sistemas biológicos.

### **5.2.4.2 Cuantificación endógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividades enzimáticas**

Para la cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y determinación de actividades enzimáticas, fue necesaria la preparación de extractos crudos foliares, los cuales se describen a continuación.

#### **5.2.4.2.1 Preparación del extracto crudo foliar de *Capsicum annuum* L.**

Los extractos fueron obtenidos de acuerdo a Sibanda y Okoh (2008), para lo cual 50 mg de tejido foliar fueron macerados con nitrógeno líquido hasta pulverizar. Posteriormente, el tejido pulverizado fue homogenizado con dos lavados en acetona (2.5 mL por lavado) en tubos falcon de 15 mL. La homogenización se realizó por inversión del tubo (5-6 veces) y se almacenó a 4°C por 24 h. Transcurrido el tiempo, el sistema se transfirió a tubos Eppendorf y fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 minutos para asegurar la precipitación del tejido. El sobrenadante, que fue descartado, contiene clorofila y otros compuestos orgánicos que pudiesen interferir en la reacción. Posteriormente, el precipitado se resuspendió mediante vortex en 1.5 mL de regulador de fosfatos pH 7.0 (0.05M) y centrifugado a 13000 rpm durante 15 minutos para asegurar la extracción proteica y enzimática. Finalmente el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C para las pruebas posteriores.

#### **5.2.4.2.2 Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con Hydrogen Peroxide Assay Kit**

La cuantificación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó de acuerdo al protocolo Hydrogen Peroxide Assay Kit (National Diagnostic) que es un método colorimétrico y cuantitativo para la determinación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en sistemas biológicos y químicos. La prueba está basada en la formación de un complejo entre naranja de xilenol y hierro férrico, el cual es producido por la oxidación dependiente peróxido de hierro férrico. Esta reacción se cuantifica colorimétricamente, detectando pequeñas cantidades de peróxido (15 ng/mL).

El procedimiento se llevó a cabo en microplaca para optimizar el número de reacciones del kit. La indicada modificación se hizo sin alterar las especificaciones del proveedor que pudieran interferir con el resultado. Brevemente, 100 µL de extracto de planta fue mezclado con 90 µL de la solución

substrato de Hydrogen peroxide que contiene hierro férrico y naranja de xilenon. La solución substrato se preparó con los componentes A (89.1  $\mu\text{L}$ ) y B (0.9  $\mu\text{L}$ ) que vienen en el kit. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir el viraje total de amarillo a azul. Transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo la lectura en un espectrofotómetro para microplaca a una absorbancia de 532 nm. Se utilizó regulador de fosfatos pH 7 (0.05 M, Anexo II) como blanco de reacción, debido a que este es el disolvente del extracto crudo. También se realizó una curva de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentración conocida (Figura 5.3) con los reactivos del kit para correlacionarla con la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno generado por la presencia de elicitores en *C. annuum* L.

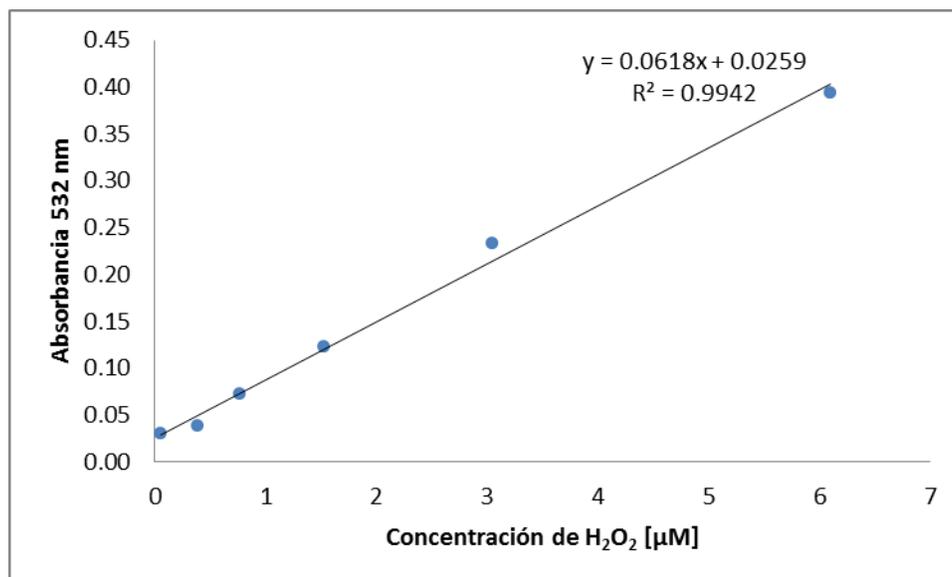


Figura 5.3. Curva de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  con kit colorimétrico.

#### 5.2.4.2.3 Actividad catalasa (CAT)

La actividad catalasa (CAT) se llevó a cabo con la finalidad de determinar indirectamente la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado por los elicitores AS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y QN en *C. annuum* L. Lo anterior, debido a que la enzima catalasa es una enzima

presente en los peroxisomas de las células de todos los tejidos animales y vegetales, caracterizada por su alta capacidad de reacción. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno, descomponiéndolo en agua y oxígeno, liberando energía en forma de calor (Figura 5.4, Franco et al., 1999).



Figura 5.4. Descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediado por catalasa (Franco et al., 1999).

Brevemente, la actividad CAT fue determinada espectrofotométricamente monitoreando la oxidación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm como lo descrito por Chandlee et al., (1983). La mezcla de reacción consistió de 1 mL de extracto crudo foliar y 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.022 M. El blanco fue preparado de la misma manera, excepto que en lugar de extracto foliar, se adicionó 1 mL de regulador de fosfatos 0.05 M pH7. Una alícuota del extracto crudo foliar fue usada para determinar el contenido total de proteína mediante el método de Bradford (1976) utilizando albumina de suero bovino como estándar y una curva de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 5.5). La actividad específica de la enzima, fue expresada como los  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidado por mg de proteína por minuto ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína/min).

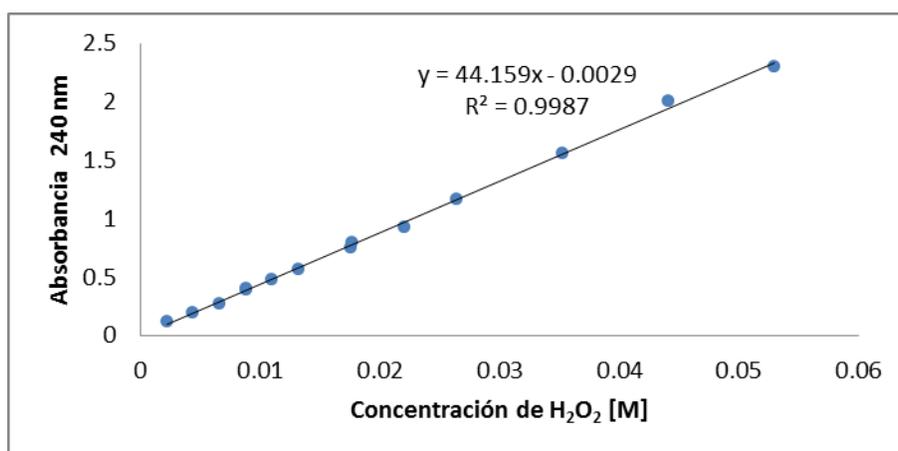


Figura 5.5. Curva de calibración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para determinación de actividad catalasa.

#### 5.2.4.2.4 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)

Para determinar la actividad PAL, los extractos de planta fueron preparados similarmente usando regulador de boratos 0.1 M pH 8.8 (Anexo II). La actividad PAL fue determinada espectrofotométricamente a 290 nm por la formación de ácido trans-cinámico, de acuerdo al método descrito por Gerasimova et al. (2005). La curva de calibración se hizo usando diferentes concentraciones de ácido cinámico (Figura 5.6). La mezcla de reacción estuvo constituida de 100  $\mu$ L de extracto de planta y 100  $\mu$ L de la solución L-fenilalanina 60  $\mu$ M/mL. La mezcla fue incubada a 37°C por 1 h y transcurrida la incubación, la reacción fue parada por la adición de 50  $\mu$ L de TCA 1M (Anexo II). La concentración de proteína fue medida de acuerdo al método descrito por Bradford (1976). La actividad enzimática se expreso como la cantidad de ácido cinámico producido en  $\mu$ mol/mg proteína/h.

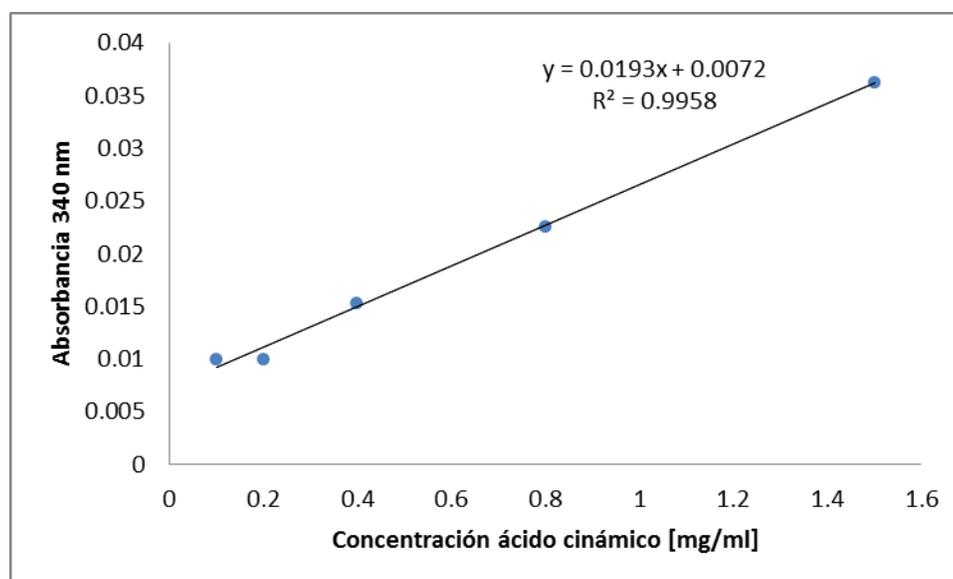


Figura 5.6. Curva de calibración de ácido cinámico.

#### 5.2.4.2.5 Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (microplaca)

La determinación de la cantidad total de proteína se efectuó por el método de Bradford (1976), el cual consiste en la unión del colorante azul de Comassie G-250 a las proteínas, formando un complejo visible a 595 nm. Fue necesario hacer una curva de calibración de proteína, utilizando diluciones de una proteína de concentración conocida (albumina de suero bovino, BSA), con la finalidad de que esta curva sirviera como referencia para correlacionar el contenido de proteína total en las muestras problema (Figura 5.7). Para la cuantificación de la proteína total de la muestra, se preparó la mezcla de reacción empleando 200  $\mu$ L de reactivo de Bradford 1:5 (Anexo II) y 40  $\mu$ L del extracto crudo foliar obtenido anteriormente. La mezcla de reacción se efectuó directamente dentro de los pozos de la microplaca. Una vez preparadas las mezclas, se dejaron incubar aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro para microplacas a una absorbancia de 595 nm.

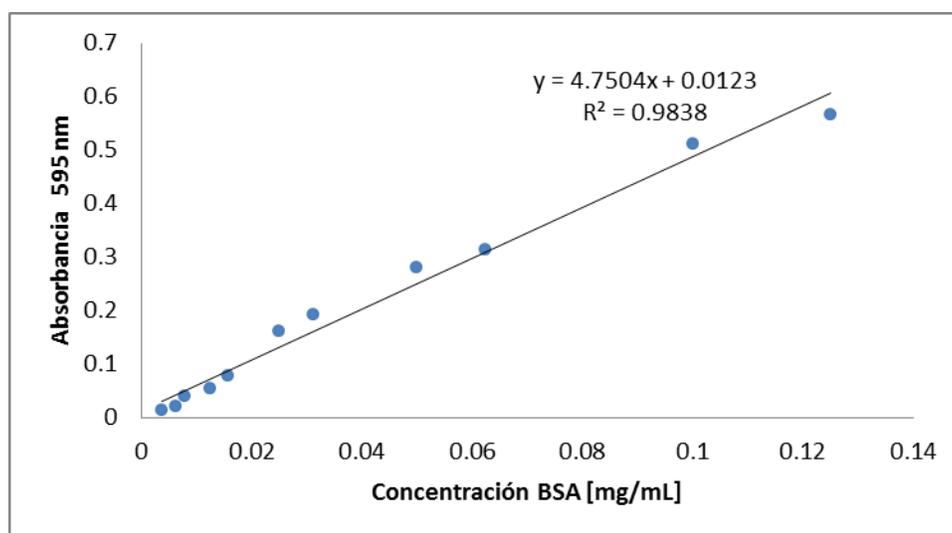


Figura 5.7. Curva de calibración de BSA para cuantificación de proteína.

#### 5.2.4.3 Análisis de la expresión génica de *cat1*, *pal* y *pr1* en interacciones planta-elicitor

El análisis de expresión génica fue realizado mediante la Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Tal análisis fue conducido en el tiempo 0, 24, 72 y 120 horas post aplicación (hpa) de elicitores referente a la primera aplicación, así como al día 42 después de la primera aplicación de los tratamientos con elicitores (Tabla 5.1). El análisis de *cat1*, *pal* y *pr1* también tuvo lugar en el tiempo 0, 24, 72 y 120 hpa después de la segunda aplicación de elicitores, la cual se realizó en el día 42 post primera aplicación de tratamientos con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN. Lo anterior, con el objetivo de conocer si se mantiene o incrementa la expresión de los genes relacionados a estrés oxidativo como *cat1* y estrés biótico como *pal* y *pr1* después de la segunda aplicación, y; su relación con la dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por efecto de la interacción *C. annuum* L.-elicitor. La extracción de ARN total fue requerida para la síntesis de ADN complementario (ADNc), y posterior análisis de la expresión génica mediante RT-PCR de los genes en cuestión. Para la extracción de ARN se usó el método del TRIZOL<sup>®</sup> Reagent de Invitrogen, siguiendo la metodología del proveedor (Anexo I). La síntesis de ADNc se hizo a partir de 700 ng de ARN total, mediante First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific (Anexo I). Finalmente, para la amplificación de los genes *cat*, *pal* y *pr1* de *C. annuum* L. sus secuencias fueron obtenidas de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), para el diseño de oligonucleótidos específicos (Tabla 5.2). Las condiciones de amplificación usadas para la PCR fueron las siguientes: 30 ciclos de 95 °C por 30 s; 65 °C por 2 min; y 72 °C por 1 min. Los productos de PCR fueron visualizados sobre geles de agarosa al 1.2 % en el fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems Mini BIS Pro.

Tabla 5.2. Secuencia de oligonucleótidos relacionados al estrés oxidativo y biótico (Mejía-Teniente et al., 2013).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	No. accesión GenBank
<b>CaCAT-F</b>	GTCCATGAGCGTGGAAGCCCCGAAT	841	AF227952
<b>CaCAT-R</b>	CGCGATGCATGAAGTTCATGGCACC		
<b>CaPAL-F</b>	TGGTGGATTTTTTCGAGTTGCAGCCG	831	EU616575
<b>CaPAL-R</b>	TGGCAAAGCGCCACGAGATAGGTTG		
<b>CaPR1-F</b>	CTTTTGCTATATTTCACTCAACACAAGCCC	522	AF053343
<b>CaPR1-R</b>	TGCTGGATTTATTTTCCTTTTAACACATGA		
<b>CaGPDH-F</b>	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC	255	AJ246011
<b>CaGPDH-R</b>	GATCAACCACAGAGACATCCACAG		

#### 5.2.4.4 Determinación de compuestos fenólicos

Una vez realizado el análisis de expresión génica, se procedió a efectuar la determinación de compuestos fenólicos, fenoles y flavonoides totales, para los tratamientos descritos en la Tabla 5.1. Se eligieron las muestras de los tiempos 2 hpa y 5 días post aplicación (dpa) referentes a la primera aplicación de elicitores, así como la muestra previa y posterior a la segunda aplicación de elicitores del día 42. Estos periodos de tiempo fueron elegidos, con base en los resultados obtenidos de contenido endógeno de peróxido hidrógeno y expresión génica. Debido a que los fenoles y flavonoides son de naturaleza polar, se llevó a cabo una extracción metanólica de acuerdo a lo descrito por Cardor-Martínez et al. (2002). Brevemente, 200 mg de tejido foliar de *C. annuum* L. fue molido con nitrógeno líquido y homogenizado en 10 mL de metanol absoluto. El homogenizado se protegió de la luz y fue sujeto a agitación constante, a una velocidad de 150 rpm a 20°C por 24 h y posteriormente centrifugado a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado bajo oscuridad a -20°C hasta su análisis. Posterior a la extracción metanólica, el contenido de fenoles totales fue determinado por el método Folin-Ciocalteu de acuerdo a lo descrito por

Nurmi et al. (1996), adaptado para usarse en microplacas por Vergara-Castañeda et al. (2010). Brevemente, la mezcla de reacción estuvo constituida por 40  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico, 460  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogenizó la mezcla mediante vórtex por 5 min y se adicionaron 1250  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCO}_3$  al 20% (Anexo II). Se dejó reposar la mezcla de reacción durante 2 h en la oscuridad. Transcurrido el tiempo de reposo, se leyeron las placas a 760 nm en el equipo iMark™ Microplate Absorbance Reader de Biorad. La cantidad de fenoles totales (CFT) fue expresada como los miligramos-equivalentes de ácido gálico (AG) por gramos de peso fresco (mg-Eq AG/g peso fresco). Para lo cual se generó una curva de calibración de ácido gálico (Figura 5.8).

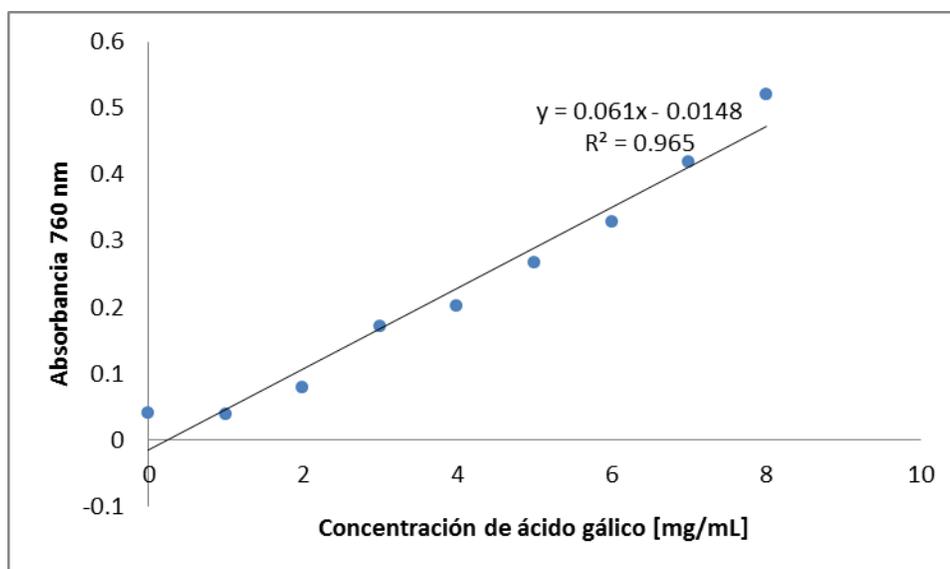


Figura 5.8. Curva de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles.

En cuanto a la determinación del contenido de flavonoides totales (CFVT), ésta se realizó mediante espectrofotometría de acuerdo a lo descrito por Hairi et al. (1991) y adaptado para microplacas por Oomah et al. (2005). Rápidamente, 50  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico se mezclaron con 180  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de la solución 2-aminoetildifenilborato al 1%. La lectura se realizó en el equipo iMark™

Microplate Absorbance Reader de Biorad a 404 nm. La cantidad de flavonoides totales (CFVT) fue expresada como los miligramos-equivalentes de rutina por gramos de peso fresco ( $\mu\text{g-Eq Rutina/g peso fresco}$ ). Para lo cual se generó una curva de calibración de rutina (Figura 5.9).

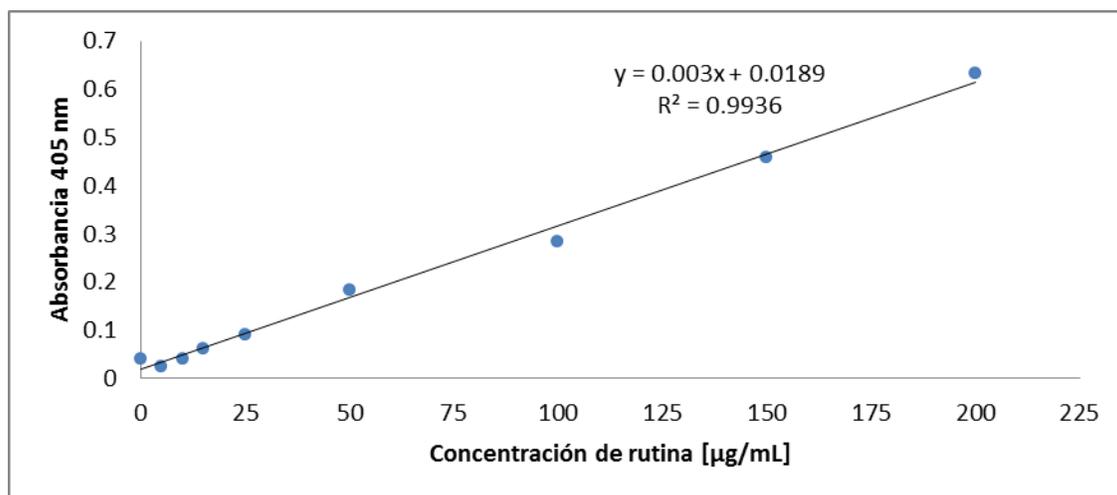


Figura 5.9. Curva de calibración de rutina, para determinación de flavonoides.

#### 5.2.4.5 Análisis estadístico del estrés oxidativo

El análisis estadístico de las variables de respuesta del estrés oxidativo como producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , actividades enzimáticas así como producción de compuestos fenólicos, fue conducido usando el software JMP 5.0.1. Un diseño completamente aleatorio fue usado para evaluar el efecto de la concentración de elicitors en las dos variedades de *C. annuum* L. Los datos fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias, fueron comparadas usando la prueba Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 5.2.5 Evaluación de susceptibilidad patogénica a *Phytophthora capsici* en plantas *C. annuum* L.

En la segunda parte del trabajo de investigación, que corresponde al análisis de protección que ejercen los elicitors AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN sobre *C.annuum* L. ante estrés biótico; fue necesario evaluar cual de las variedades, Don Benito o Don Pancho, presentaba mayor susceptibilidad a uno de los principales patógenos de Chile, el Oomiceto *Phytophthora capsici*. Con la finalidad de elegir a la variedad más susceptible para los ensayos de interacción planta-elicitor-patógeno; y evaluar de esta forma el posible efecto protector que le genera el elicitor a la planta de *C.annuum* L. ante determinado estrés biótico. Se optó por llevar a cabo el ensayo de susceptibilidad con *P. capsici*, debido a que de los patógenos de Chile, es uno de los más agresivos, de fácil inoculación y de obtención de fenotipos susceptibles en periodos cortos. Para este ensayo se ocuparon plantas jóvenes de 4-6 hojas verdaderas. El total de plantas que se emplearon por variedad, fue de 25. La inoculación se realizó con discos de micelio de la cepa C7P8F7 de *P. capsici*. Se utilizaron 2 discos de micelio de 17 mm de diámetro por planta, los cuales se colocaron junto a la base del tallo (Figura 5.10). La sintomatología característica como adelgazamiento de la base del tallo y marchitez de hojas superiores puede ser observada a partir del tercer día post- inoculación (dpi).



Figura 5.10. Inoculación de *C. annuum* L. con *Phytophthora capsici*.

## 5.2.6 Interacción planta-elicitor-patógeno

Una vez seleccionada la variedad susceptible, se procedió a realizar las interacciones planta-elicitor-patógeno. Con la finalidad de evaluar el efecto protector que generan los elicidores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en *C. annuum* L ante el estrés biótico. Para lo cual, se ocuparon plantas de 4-6 hojas verdaderas. Las condiciones de inoculación para cada patógeno se describen a continuación.

### 5.2.6.1 Inoculación de *C. annuum* L. con *Phytophthora capsici*

La inoculación de la cepa C7P8F7 de *P. capsici* en plantas de *C. annuum* L., se efectuó en dos periodos de tiempo, después de una aplicación única de los elicitores. La primera inoculación, se realizó 5 días posteriores a la aplicación de elicitores (dpa), y la segunda a los 10 dpa; de acuerdo al diseño de tratamientos descritos en la Tabla 5.3. Lo anterior, con fundamento en los resultados obtenidos de la dinámica oxidativa. Cabe mencionar, que se inoculó un total de 18 plantas, de las cuales cinco fueron para inocularse en el quint y décimo día post-aplicación de elicitores (5 dpa y 10 dpa) respectivamente.

Tabla 5.3. Diseño de tratamientos para inoculación con *P. capsici* C7P8F7.

Tratamiento	Descripción	Elicitor	Concentración	No. Total de plantas inoculadas
T1	E1C1P1		0.1 mM	18
T2	E1C2 P1	AS	6.7 mM	18
T3	E1C3 P1		10 mM	18

---

<b>T4</b>	E2C1 P1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6 mM	18
-----------	---------	-------------------------------	------	----

---

Cont. Tabla 5.3

Tratamiento	Descripción	Elicitor	Concentración	No. Total de plantas inoculadas
T5	E2C2 P1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14 mM	18
T6	E2C3 P1		18 mM	18
T7	E3C1 P1	QN	10 µg/mL	18
T8	E3C2 P1		670 µg/mL	18
T9	E3C3 P1		1000 µg/mL	18
T10	E0C0P1	AGUA	5 µg	18
T11	E0C0P0	AGUA	-	18

E= elicitor, C= concentración, P= patógeno

#### 5.2.6.1.1 Análisis de fenotipo y severidad de síntomas de *C. annuum* L. ocasionados por *P.capsici*

La evaluación fenotípica, se realizó al tercer día post inoculación (3 dpi) del Oomiceto *P. capsici* C7P8F7 en plantas de *C. annuum* L. inducidas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN. La evaluación se realizó en esta fecha debido a que las plantas control positivo (asperjadas con agua e inoculadas con la cepa C7P8F7 *P. capsici*) presentaban síntomas característicos de la enfermedad. El análisis de severidad, se llevó a cabo de acuerdo a la escala establecida por Morán-Bañuelos et al. (2010).

Tabla 5.4. Escala de severidad de síntomas de *C. annuum* L. a *P. capsici* (Morán-Bañuelos et al., 2010).

Severidad	Descripción de síntomas
0	Hojas y tallos turgentes.
3	Hojas inferiores con pérdida de turgencia.
5	Hojas medias e inferiores marchitas, y la punta del tallo con inclinación ligera.
7	Hojas marchitas y punta del tallo colgante.
9	Planta muerta.

#### 5.2.6.2 Inoculación de *C. annuum* L. con geminivirus PepGMV y evaluación fenotípica

La inoculación con el geminivirus *PepGMV* en plantas de *C. annuum* L. indicidas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, se efectuó 2 h posteriores a la aplicación del elicitor. La inoculación fue realizada mediante biobalística de baja presión en las instalaciones del CINVESTAV-Unidad Irapuato (Figura 5.11; Anexo I). Para lo cual se usaron 5 µg totales de ADN viral (2.5 µg del componente A y 2.5 µg del componente B). El disparo fue dirigido a una de las hojas apicales de la planta, a una presión de 140 psi y a una distancia aproximada de 1 cm entre la punta de la pistola y la zona apical de la planta; siguiendo el diseño de tratamientos descritos en la La evaluación fenotípica de síntomas de la enfermedad y recolección de muestras de tejido foliar se realizó a los 8 y 12 días post inoculación (dpi).



Figura 5.11. Inoculación de *C. annuum* L. con PepGMV

Tabla 5.5. La evaluación fenotípica de síntomas de la enfermedad y recolección de muestras de tejido foliar se realizó a los 8 y 12 días post inoculación (dpi).



Figura 5.11. Inoculación de *C. annuum* L. con PepGMV

Tabla 5.5. Diseño de tratamientos para inoculación con geminivirus PepGMV.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>	<b>Elicitor</b>	<b>Concentración</b>	<b>No. Total de plantas inoculadas</b>
<b>T1</b>	E1C1P2		0.1 mM	10
<b>T2</b>	E1C2 P2	AS	6.7 mM	10
<b>T3</b>	E1C3 P2		10 mM	10
<b>T4</b>	E2C1 P2		6 mM	10
<b>T5</b>	E2C2 P2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14 mM	10
<b>T6</b>	E2C3 P2		18 mM	10
<b>T7</b>	E3C1 P2	QN	10 µg/mL	10

Cont. Tabla 5.5. Diseño de tratamientos para inoculación con geminivirus PepGMV

Tratamiento	Descripción	Elicitor	Concentración	No. Total de plantas inoculadas
T8	E3C2 P2		670 µg/mL	10
T9	E3C3 P2		1000 µg/mL	10
T10	E0C0P2	AGUA	5 µg	10
T11	E0C0P0	AGUA	-	10

E= elicitor, C= concentración, P= patógeno

Las muestras fueron colocadas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -70 °C hasta su procesamiento. El análisis de la severidad, se hizo de acuerdo a la escala de severidad propuesta por Torres-Pacheco et al. (1997).

Tabla 5.6. Escala de severidad de síntomas de *C. annuum* L. a geminivirus (Torres-Pacheco et al., 2010).

Severidad	Descripción de síntomas
0	Asintomática.
1	Leve arrugamiento en hojas apicales y presencia de manchas amarillas (≈ 1 mm de diámetro) cuando son expuestas a la luz solar.
2	Presencia de manchas amarillas en grupos sobre las hojas apicales.
3	Grupos de manchas amarillas, se unieron formando una red sobre la base apical de las hojas.
4	Red claramente visible.
5	Protuberancias observables en la zona media apical de las hojas.
6	Hoja ligeramente rizada.
7	Hoja severamente rizada.
8	Distorsión completa de la hoja apical.
9	Retraso en el crecimiento de hojas.

#### **5.2.6.2.1 Análisis del movimiento viral de *PepGMV***

El movimiento viral se evaluó en muestras de tejido vegetal de 8 dpi, para lo cual, las muestras se pulverizaron en presencia de nitrógeno líquido y se llevó a cabo la extracción de ADN genómico de hojas apicales y basales, mediante el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983). Posteriormente, se realizó el análisis de movimiento geminiviral del *PepGMV* en las extracciones de ADN genómico, mediante la amplificación del componente viral A, con los oligonucleótidos JM23 (5'-TGGTGTAGGACTCCA-GCAGAATC-3') y JM24 (5'-TAGGCCACACCTTGGTCACCAAG-3') que amplifican un fragmento de 288 pb de este componente, reportado previamente por Méndez et al. (2003). La amplificación por la PCR se llevó a cabo a 95 °C durante 30 segundos, 53 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 1 minuto con 30 ciclos.

#### **5.2.6.3 Inoculación de *C. annuum* L. con *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)**

La inoculación de plantas de *C. annuum* L. con la bacteria Xcv se realizó con  $5 \times 10^7$  UFC/mL mediante bio-inyección (Figura 5.12; Anexo I), con jeringas de insulina, de acuerdo a lo descrito por Barrera-Pacheco (2006). La inoculación se efectuó en la nervadura principal de una de las hojas apicales y en la altura media del tallo de la planta. Se siguió el orden de tratamientos que se realizó tanto para *P. capsici* como *PepGMV*. Con la diferencia de haber utilizado 8 plantas para cada tratamiento. La sintomatología que se esperaba, eran manchas pequeñas en el envés de las hojas, de forma angular y húmedas. Las cuales, se transforman a manchas circulares e irregulares, con márgenes amarillos, translúcidas y centros pardos posteriormente apergaminados al principio de la enfermedad (Barrera-Pacheco, 2006).



Figura 5.12. Inoculación de *C. annuum* L. con *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria (Barrera-Pacheco, 2006).

### 5.2.7 Análisis de expresión génica en interacciones planta-elicitor-patógeno

Una vez que se llevó a cabo la interacción planta-elicitor-patógeno, se eligieron los tratamientos que no presentaron síntomas a las respectivas enfermedades ocasionadas por el geminivirus PepGMV y el Oomiceto *P. capsici*. De esta manera, se seleccionó el tratamiento 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1 mM de AS y 1000 µg/mL de QN, que mejor indujeron la protección en la interacción *C. annuum* L.–Elicitor–Geminivirus. Quedando la misma concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y AS para el análisis de expresión génica en la interacción con *P. capsici* excepto por el QN, que se seleccionó la concentración de 670 µg/mL. Los análisis de expresión génica para *Xcv*, fueron descartados debido a que al finalizar los ensayos con este patógeno, únicamente se obtuvieron respuestas de hipersensibilidad. El análisis de expresión de genes relacionados al estrés biótico, oxidativo y ruta MAPK, se realizó en las muestras de 12 dpi de los tratamientos anteriormente mencionados para la interacción con el geminivirus PepGMV, recordando, que la inoculación con PepGMV se hizo 2 h posteriores a la aplicación de los elicitores. Para lo cual, se emplearon muestras de una planta tratada con presencia de síntomas, una planta tratada con ausencia de síntomas, una del grupo control positivo a la enfermedad y otra del control negativo (que solo fue atomizada con agua). Por

otro lado, el análisis de expresión génica en las interacción con *P. capsici*, se realizó con muestras de tejido foliar correspondientes al 3 dpi. Dado que en este periodo, la planta control positivo a la enfermedad e inoculada también al día 5 post aplicación de los elicicotes, presentaba la sintomatología correspondiente al Oomiceto *P. capsici*. Para ello el tejido foliar fue congelado y pulverizado con nitrógeno líquido. Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc a partir de 700 ng/ $\mu$ L de ARN purificado con DNasa I, de acuerdo a lo descrito anteriormente en la sección. Una vez obtenido el ADNc se llevó a cabo el análisis de la expresión de los genes  $\beta$ -*tub*, *pr1*, *npr1*, *wrkyd*, *wrky1*, *mkk1*, *mk1* y *mk2*, mediante PCR usando los oligonucleótidos mencionados en la Tabla 5.2 para *pr1*. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: 95 °C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto por 30 ciclos, para *npr1*. Para los oligos restantes, lo único que se cambio fue la temperatura de alineamiento. Quedando entonces 59°C para *mk1*; 60°C para *wrkyd* y *mkk1*; y 65°C para *wrky1* y *mk2*.

Tabla 5.7. Oligonucleótidos usados en los análisis de expresión génica de la ruta MAPK evaluados en la interacción planta-elicitor-patógeno.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	No. accesión GenBank
<b><i>CaWRKYd -F</i></b>	GCCGATTAAACCCGAAAAT	217	GQ249255.1
<b><i>CaWRKYd -R</i></b>	TGATCATGTCCTCCTGGTGA		
<b><i>CaWRKY1 -F</i></b>	GTTTTAGATCATTGGACTCACCTG	443	AY229992.1
<b><i>CaWRKY1 -R</i></b>	TTGATGGTTGTGGACACCCT		
<b><i>CaMKK1-F</i></b>	GATAGTGACCCGGAGATTTCG	421	GQ249256.1
<b><i>CaMKK1-R</i></b>	AAGTGTCCGGATCAAACCTT		
<b><i>CaMK1-F</i></b>	ATGGTTGATGCAAATATGGGT	465	AF247135
<b><i>CaMK1-R</i></b>	ACGGAGAAGCTGATACATGAA		

Cont. Tabla 5.7

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	No. accesión GenBank
<b>CaMK2-F</b>	ATGGATGGTCCAGCTCAGCAA	420	AF247136.1
<b>CaMK2-R</b>	CACGCAACGTTCTCTTGGCAT		
<b>CaNPR1-F</b>	AGGAAGAAGATGGCTGATGC	177	DQ648785.1
<b>CaNPR1-R</b>	CAAGTCATCAGCATCCATGA		
<b><math>\beta</math>-TUB-F</b>	GGAAGTTATTTGCGACGAGCACGGC	864	EF495259.1
<b><math>\beta</math>-TUB-R</b>	CGGGGATCTGCAGCGCACATCATAT		

Las bandas obtenidas en el gel de electroforesis se cuantificaron por densitometría mediante el software GelQuant y se realizó una prueba estadística de Tukey con  $\alpha \leq 0.5$  con el programa estadístico JMP.

### 5.2.8 Determinación de metabolitos secundarios

Finalmente, se llevó a cabo la determinación de metabolitos secundarios mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC del inglés High-performance liquid chromatography) de los tratamientos 10 mM de AS, 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1000  $\mu$ g/mL de QN; de la interacción planta–elicitador–geminivirus. El análisis se realizó empleando una muestra de control negativo (agua), una de control positivo a la enfermedad, y una muestra de tejido foliar de planta inducida con y sin síntomas respectivamente. Para ello se realizó un extracto de 5 mg de tejido por mL de metanol, se sonicó durante 40 min y se filtró con acrodiscos. El contenido de compuestos fenólicos, en las muestras ya mencionadas, se identificó y cuantificó usando el equipo Waters 600 HPLC-DAD system, equipado con muestreador automático (Waters 717 plus) y detector UV/Vis (Waters 2487) (Milford, MA, USA). La separación fue realizada en una columna Phenomenex

ODS-C18 (250 X 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Las muestras (10  $\mu$ L) se inyectaron en una columna de fase inversa (Phenomenex C18 250 mm x 4.6 mm), a un flujo de 1 mL/min. La fase móvil consistió de dos solventes: (A) ácido fórmico-agua 1:99 v/v y (B) acetonitrilo, en una relación A/B de 98/2 en 0 min, 68/32 en 30 min, 45/35 en 48 min, 5/95 en 53 min, 98/2 en 57 min, y el tiempo total fue de 67 min. Las absorbancias fueron medidas de 260-320 nm.

## 6 RESULTADOS

Los resultados se muestran en dos secciones principales. La primera sección, corresponde a los cambios ocurridos en los indicadores fenológicos, como altura y grosor de tallo de la planta, por efecto de la aplicación de los elicitors. Así como el efecto que tuvo la aplicación foliar de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en los indicadores de estrés oxidativo como producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actividades enzimáticas (CAT y PAL), así como los cambios en la expresión de genes relacionados al estrés oxidativo y biótico. La segunda sección, corresponde a la evaluación fenotípica en la interacción planta-elicitor-patógeno. Así como a la selección del mejor tratamiento elicitor-concentración, que mejor protegió a la planta de *C. annuum* L. ante el estrés biótico. En el mismo sentido, se analizaron los cambios de expresión génica de los genes involucrados en la ruta de señalización MAP quinasa, por efecto de la interacción planta-elicitor-estrés biótico. Finalizando con análisis de resultados de los metabolitos secundarios inducidos en esta interacción.

### 6.1 Indicadores fenológicos y de estrés oxidativo

#### 6.1.1 Análisis de diámetro de tallo y altura de la planta de *C. annuum* L.

Los tratamientos con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN causaron cambios en el crecimiento y diámetro de tallo de la planta, respecto al control con agua, y fueron medidos al inicio y final del experimento. El análisis de varianza (ANOVA, Anexo III) realizado sobre las mediciones de altura y diámetro de las plantas al día cero, en ambas variedades, Don Benito (DB) y Don Pancho (DP) de *C. annuum* L., revelaron que no existe significancia – $F_{\text{Altura-DB}} = 1.3798$ ,  $P > 0.2112$ ;  $F_{\text{Diámetro-DB}} = 4.206$ ,  $P > 0.0002$ ;  $F_{\text{Altura-DP}} = 1.2237$ ,  $P > 0.2925$ ;  $F_{\text{Diámetro-DP}} = 2.9560$ ,  $P > 0.0044$ – indicando que las

plantas estaban bajo las mismas condiciones para ser empleadas. Por otro lado, el ANOVA realizado al final del experimento, al día 42 dpa, reveló que no existe significancia en la altura en la variedad Don Benito ( $F_{DB}=2.9012$ ,  $P>0.0051$ ), pero sí en la variedad Don Pancho ( $F_{DP}=5.2035$ ,  $P<0.0001$ ). En cuanto al diámetro de la planta, en ambas variedades no se observaron diferencias significativas, de acuerdo al análisis Tukey ( $F_{DB}=4.0483$ ,  $P>0.0003$ ;  $F_{DP}= 3.3705$  y  $P<0.0015$ ). Lo anterior, indica que los elicitores y sus respectivas concentraciones tienen un efecto positivo en el crecimiento de la planta, respecto al control. No obstante, de acuerdo a la prueba Tukey ( $\alpha=0.005$ ), no existen diferencias significativas entre los tratamientos de elicitores; pero una tendencia de bajo crecimiento fue observada en los tratamientos 10 mM AS, 18 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1000 µg/mL QN, pero aún así, su crecimiento fue mayor que el de las plantas control (Figura 6.1). Aunque no se encontró significancia en relación con el diámetro del tallo, si se observó un engrosamiento del mismo en comparación con las plantas de control (Figura 6.2). Los resultados de la tendencia en la disminución del crecimiento de la planta, conforme aumenta la concentración, coinciden con lo reportado por Boughton et al. (2006), donde muestran que plantas de *Lycopersicon esculentum* tratadas con metil jasmonato (MJ), otro elicitador, fueron significativamente más cortas en altura de 10-15 cm en promedio, que las plantas control a los 20 días posteriores al tratamiento con MJ. Pero la altura no resultó significativa entre las dosis de MJ empleadas. El engrosamiento de diámetro del tallo puede ser atribuido al proceso de lignificación, debido a la polimerización del monómero de la lignina que es iniciado por peroxidasas y/o lacasas como un proceso espontáneo sin ningún control enzimático (Sedoroff et al., 1994). Sin embargo, este proceso también podría ser inducido por diversas respuestas de defensa de la planta, como heridas, ataques virales y/o microbianos (Lange et al., 1995). También puede ser inducido por elicitores, ya que son capaces de imitar el proceso percepción de microorganismos por una planta, a través de los patrones moleculares asociados a microorganismos o microbios (MAMP del inglés microbe-associated molecular pattern), iniciando así la inducción del mecanismo de respuesta de defensa en

plantas (Jones y Dangl, 2006). Esto también ha sido demostrado por Mandal et al. (2010), quienes observaron que la deposición de lignina en la pared celular de raíces de berenjena se incrementó 5 veces con AS, 4 veces con QN, 3 veces con MeJA y 3 veces con MeSA a las 96 h de elicitación.

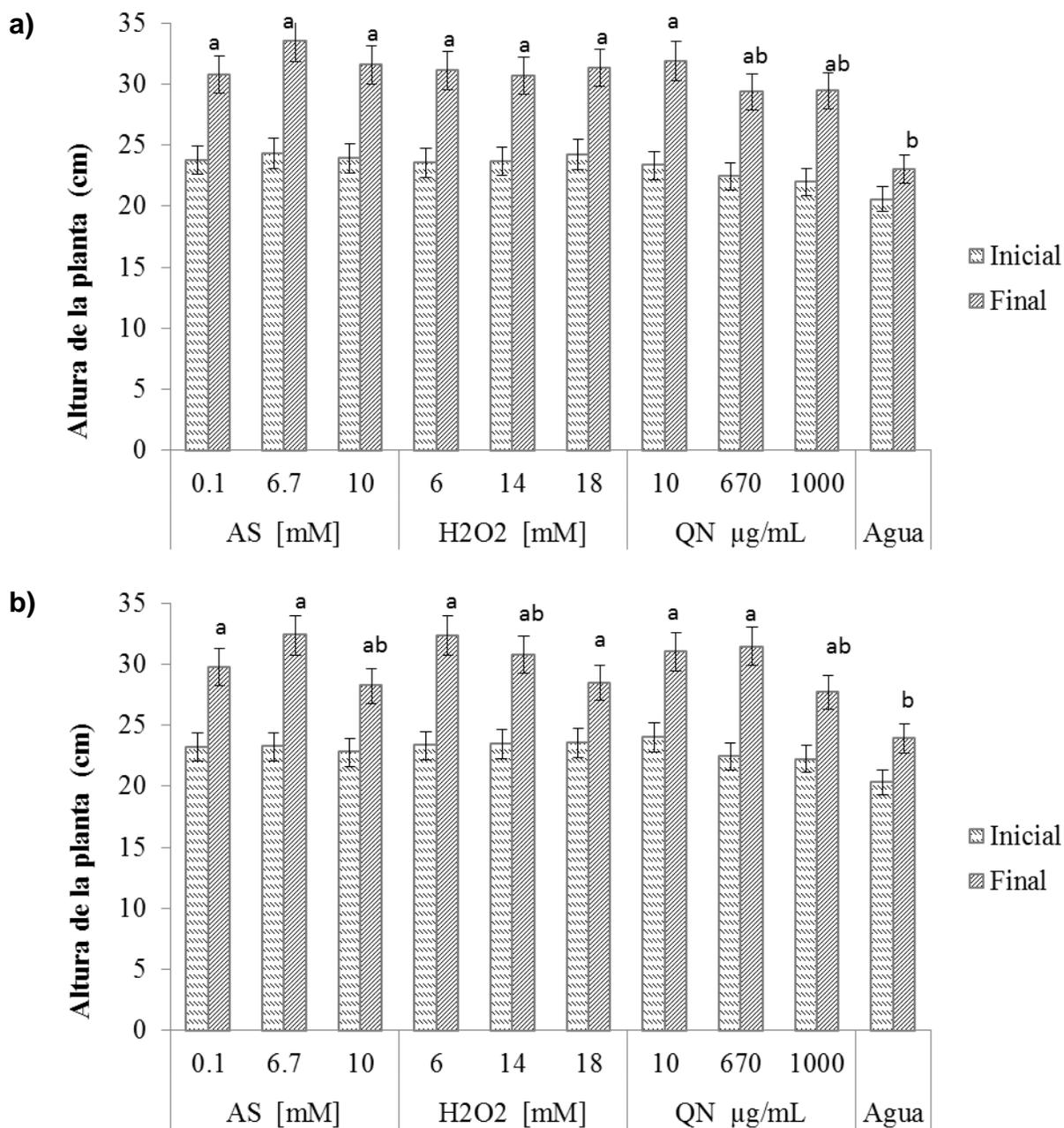


Figura 6.1. Efecto de los elicitores en el crecimiento de *C. annuum* L. al día 42 post primera aplicación. a) Variedad Don Benito, b) Variedad Don Pancho. Las barras muestran el error para la serie del gráfico al 5%. Letras diferentes, indican diferencia significativa de acuerdo al análisis Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).

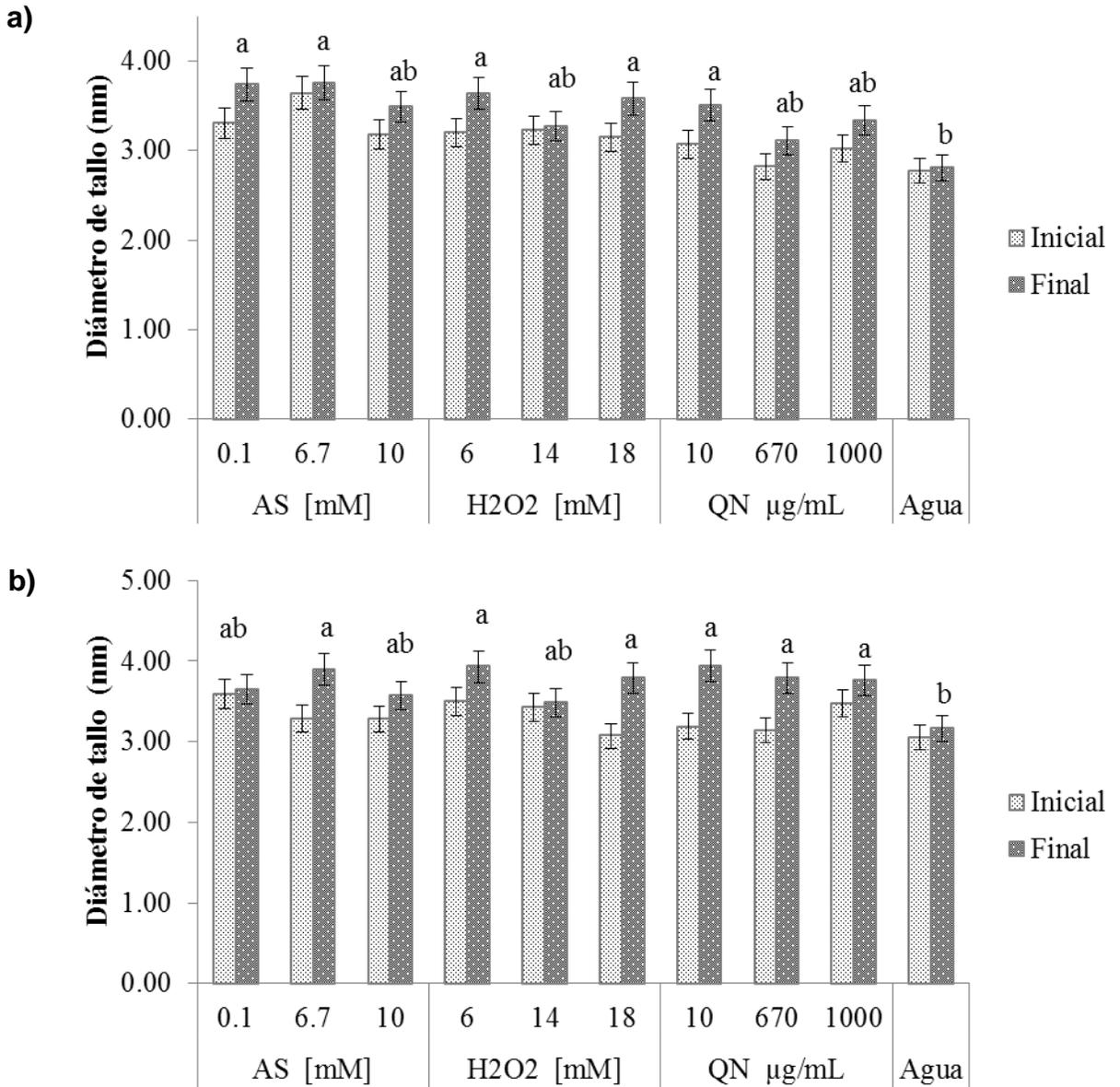


Figura 6.2. Efecto de los elicitores en el diámetro de tallo de *C. annuum* L. al día 42 post primera aplicación. a) Variedad Don Benito, b) Variedad Don Pancho. Las barras muestran el error para la serie del gráfico al 5%. Letras diferentes, indican diferencia significativa de acuerdo al análisis Tukey ( $\alpha < 0.05$ ).

### 6.1.2 Detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con DAB en plantas de *C. annuum* L. inducidas con elicitores

La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en hojas de *C. annuum* L. var. Don Benito y Don Pancho, tratadas con los elicitores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, fue visualmente analizada mediante la tinción de la hoja con 3, 3'-Diaminobenzidina (DAB) (Thordal Christensen et al., 1997). La cual permite localizar visualmente la generación de peróxido de hidrógeno debido al polímero de color marrón que se forma cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se une con el reactivo DAB. La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en *C. annuum* L. evaluada a las 12 h post aplicación foliar de los elicitores AS (0.1, 6.7 y 10 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6, 14 y 18 mM) y QN (10, 670 y 1000 µg/mL) es mostrada en la Figura 6.3. En la cual se observa una fuerte coloración marrón, inducida con las concentraciones 6.7 y 10 mM de AS para ambas variedades, en contraste con la concentración 0.1 mM, donde la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menor. La misma tendencia fue observada con las concentraciones 14 y 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; así como con las aplicaciones de QN (670 µg/mL y 1000 µg/mL). No así, para la concentración menor de cada elicitor (0.1 mM AS, 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 µg/mL QN) dónde la producción de esta molécula por efecto de la aplicación foliar de estas concentraciones, fue visiblemente menor comparada con la con las respectivas concentraciones de mayor grado de cada elicitor. Con lo cual se puede inferir que a mayor concentración de elicitor, mayor generación de peróxido de hidrógeno y por ende mejor respuesta inductiva. Sin embargo, no hay que descartar que la concentración menor de cada elicitor induzca también la resistencia sistémica inducida. Cabe señalar que la coloración marrón fue visiblemente observada desde la base de la hoja, por la nervadura principal y notablemente profunda en el tejido, apareciendo también por las venas primarias y secundarias de la hoja. En contraste con las hojas control, que sólo fueron atomizadas con agua, no fue observada la producción de peróxido (Figura 6.3). Los resultados muestran que las aplicaciones exógenas de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN inducen significativamente la

generación de peróxido de hidrógeno dependiendo de la concentración del elicitador (Mejía-Teniente et al. 2013). Esto es un punto importante, debido a que generalmente las moléculas ROS, como el peróxido de hidrógeno, y la resistencia de la planta a estrés biótico están directamente relacionadas con la infección de la misma (Vlot et al., 2009).

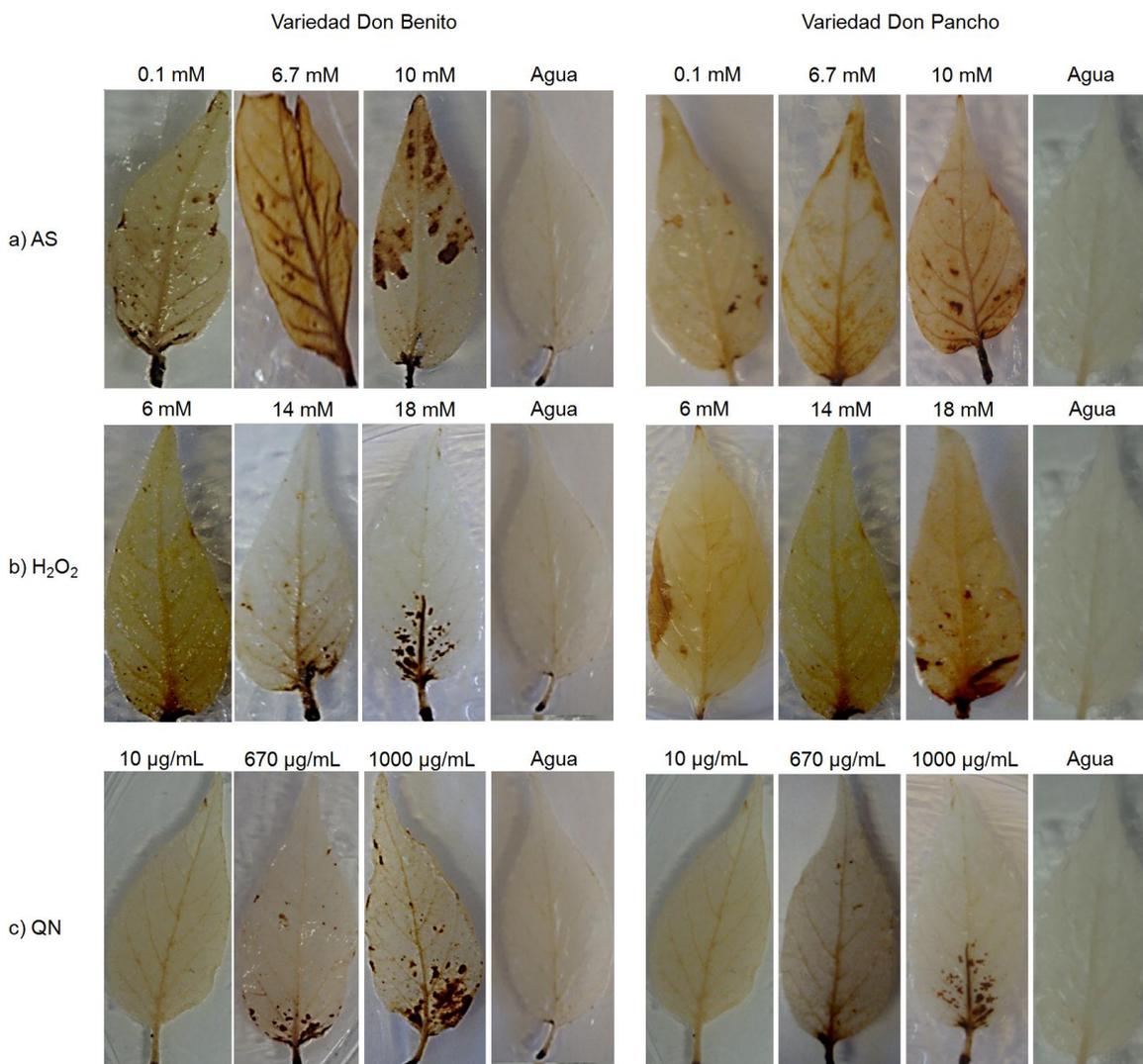


Figura 6.3. Reacción de  $H_2O_2$  con DAB 12 h después de la aplicación de elicitores.

Lo anterior, también tiene fundamento en lo reportado por Singh et al. (2004) dónde mencionan que la resistencia inducida por AS al virus del tabaco en

plantas de *Arabidopsis thaliana*, se debió principalmente a que ésta resistencia está mediada en parte, por una vía que parece estar involucrada en la transducción de señales a través de cambios en el sistema redox de las moléculas ROS en la mitocondria. Asimismo, Guevara-Olvera et al. (2012) reportaron que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evaluada por la tinción DAB, fue significativamente alta a las 6 h post inoculación (hpi) con geminivirus en líneas transgénicas de tabaco que expresan el gen *CchGLP* relacionado a la defensa contra estrés biótico. También García-Neria et al. (2011) mostraron una alta acumulación de de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las 6 hpi en hojas inoculadas con el geminivirus PepGMV de plantas de *C. chinense* de la accesión BG-3821 caracterizada como resistente a este virus, y que de igual manera se obtuvo un comportamiento similar en hojas de *C. annuum* L. var. Sonora Anaheim susceptibles a geminivirus. Los resultados aquí mostrados, también exponen la durabilidad de la acumulación de ésta molécula mensajera (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hasta las 12 h post aplicación de los elicitores. En consecuencia, se puede inferir que la planta podría estar en alerta para cualquier tipo de estrés. Esto es probablemente porque el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se produce en respuesta a una variedad de estímulos e intercomunica las rutas de señalización intracelular. Por otra parte, algunos elicitores pueden no requerir un mecanismo basado en un receptor para su actividad (Neil et al., 2002; Chong et al., 2005; Mayers et al., 2005; Mejía-Teniente et al., 2013).

### **6.1.3 Análisis cuantitativo del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno en plantas de *C. annuum* L. inducidas con elicitores**

Antes de llevar a cabo el orden de tratamientos descritos en la Tabla 5.1 de materiales y métodos, concerniente a los descriptores oxidativos, se hizo un estudio exploratorio de dinámica oxidativa (del minuto 0 hasta la semana 4, Anexo IV). En este estudio se registraron las tendencias del alto contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la semana 2 a la 4 respecto al control, pero en menor proporción que los tiempos

anteriores, después de la aplicación de los elicitores en ambas variedades de *C. annuum* L. (Don Benito y Don Pancho). Lo anterior tiene relevancia debido a que en este periodo (S2-S4), las plantas se vieron infestadas de pulgones y sin embargo, las plantas tratadas con AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN tuvieron mayor producción de peróxido de hidrógeno respecto a las plantas control. Por lo que se infirió que las plantas tratadas con elicitores estaban más alerta al estrés generado por los pulgones, que las plantas control que solo se trataron con agua. Por lo que se decidió llevar a cabo una segunda aplicación de elicitores y darle seguimiento por una semana posterior a la segunda aplicación, que son los resultados que se muestran a continuación.

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio en el metabolismo celular y a la generación de moléculas ROS. El grado de estrés oxidativo en una célula, depende de la cantidad producida de superóxido, peróxido de hidrógeno, y radicales hidroxilo (Iseri et al., 2013). Es por este motivo, que en el presente trabajo se decidió determinar la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generada por la aplicación foliar de elicitores en *C. annuum* L., y es mostrada a través de una dinámica de producción de la molécula en periodos post aplicación de elicitores. Lo anterior, con la finalidad de establecer la durabilidad de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El alto contenido cualitativo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrado en con la tinción histológica, sugiere que existe una alta producción de moléculas ROS, producidas por la aplicación foliar de los elicitores AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Infiriéndose que los eventos desencadenados por el estallido oxidativo finalizaron en la alta producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el cual fue cuantificado durante diversos tiempos de muestreo después de las dos aplicaciones únicas y diferidas de los elicitores AS, QN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ambas variedades de *C. annuum* L. (Don Pancho y Don Benito). En adelante, nos referiremos a los resultados de la variedad Don Benito, debido a que esta variedad resultó ser la más susceptible al estrés biótico y no presenta diferencias significativas respecto a la variedad Don Pancho. No obstante, los resultados de indicadores oxidativos de la variedad Don Pancho, son mostrados en el Anexo V. Mencionado lo anterior, la dinámica de producción de peróxido de hidrógeno por

efecto de la aplicación de los tratamientos de AS (0.1 mM, 6 mM, 10 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM, 14 mM, 18 mM) y QN (10 µg/mL, 670 µg/mL, 1000 µg/mL) en la variedad Don Benito de *C. annuum* L. se muestra en la Figura 6.4 (Mejía-Teniente et al., 2013).

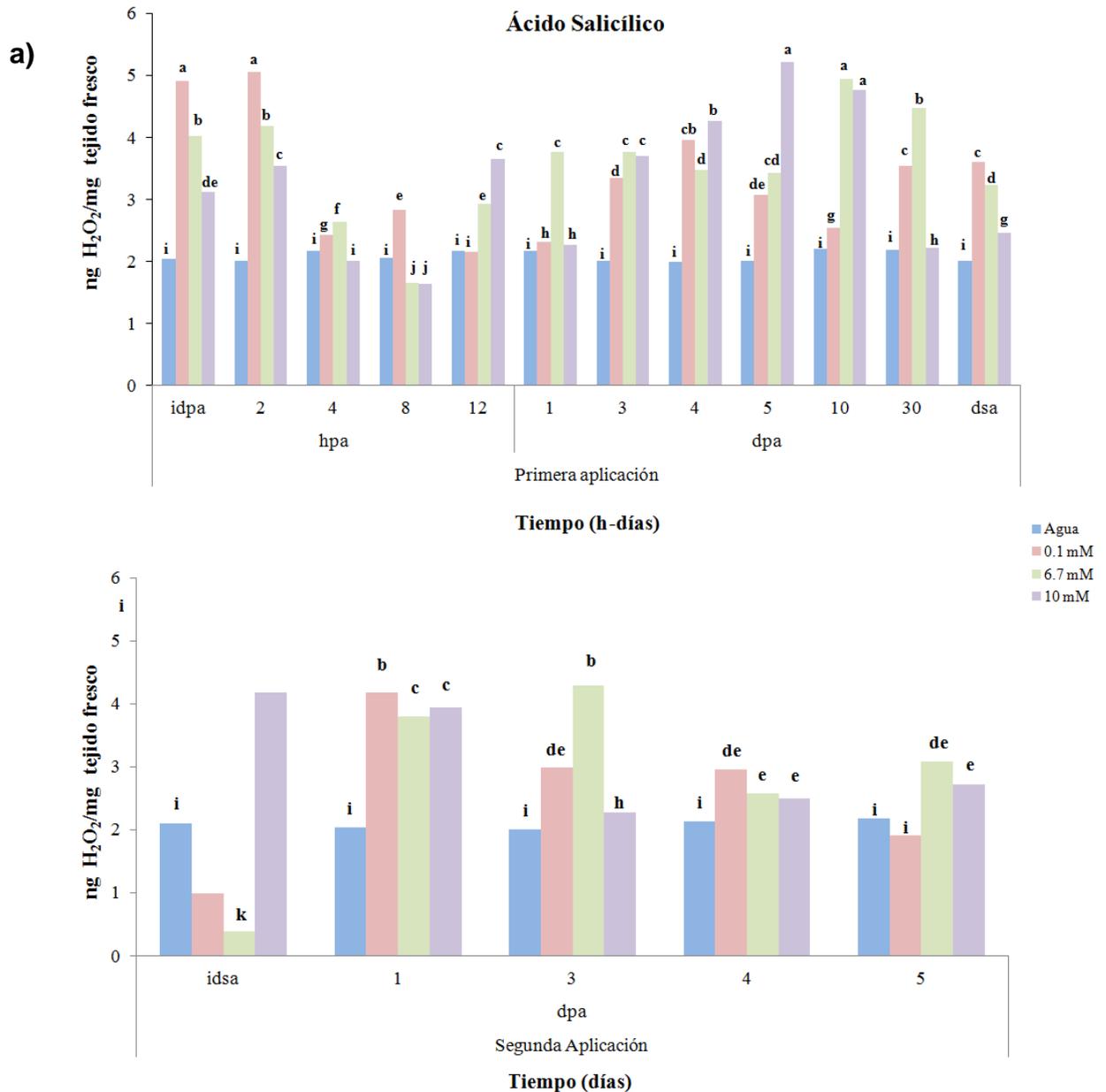
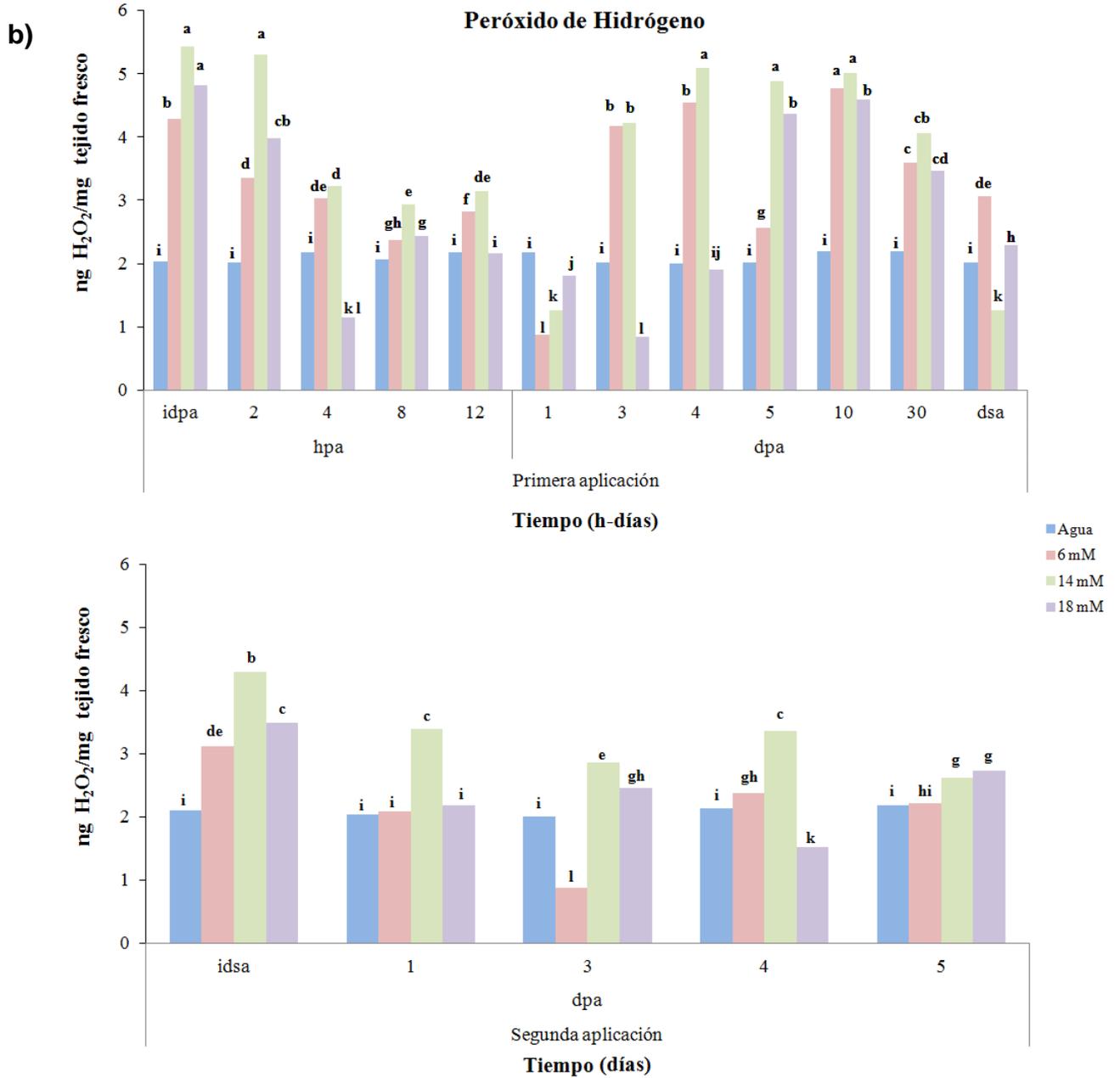


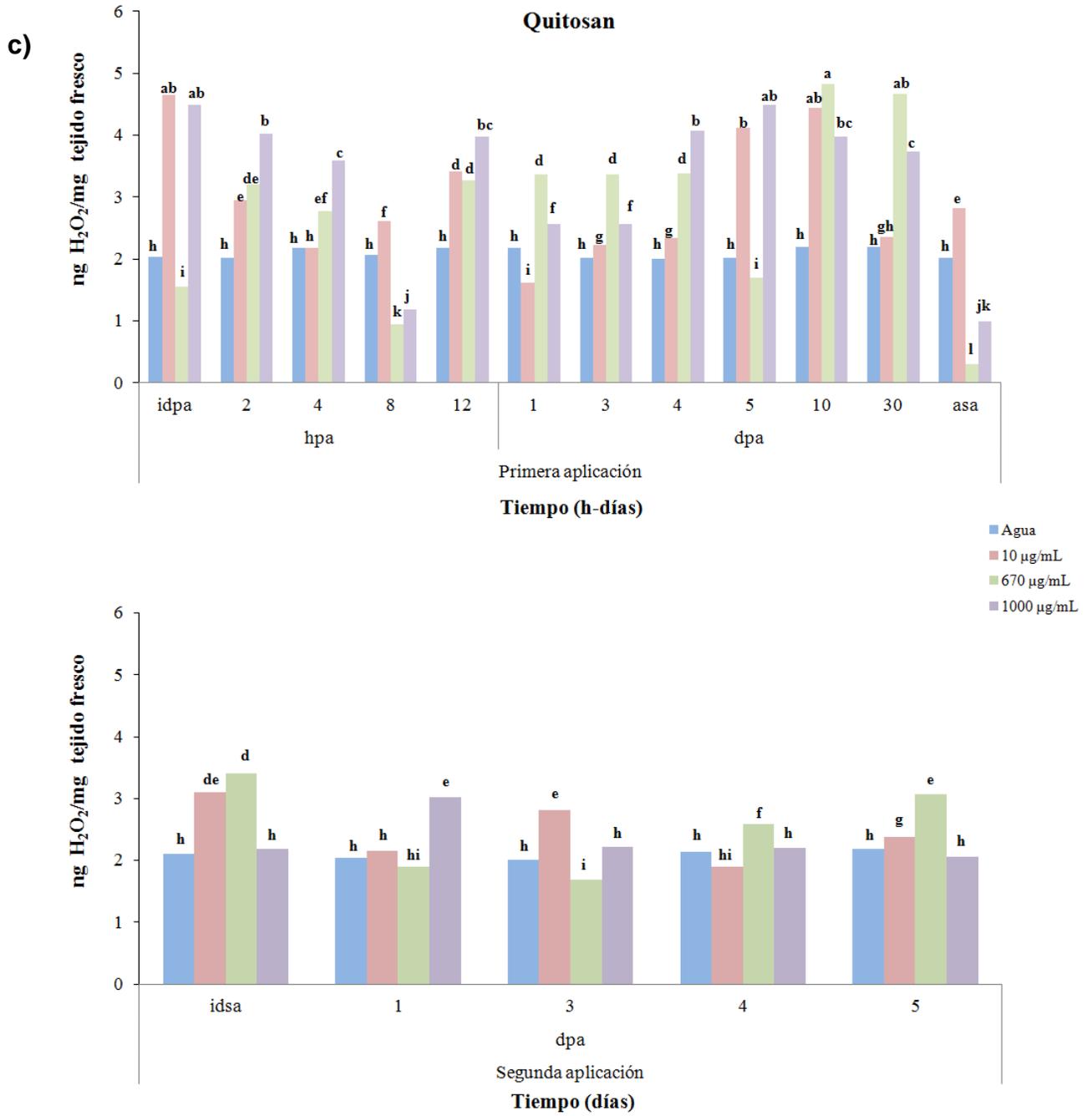
Figura 6.4. Dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en variedad Don Benito de *C. annuum* L., por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitores. a) AS, b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c) QN. Primera aplicación en el día cero, segunda aplicación en el día 42 post primera aplicación. idpa: inmediatamente después primera aplicación, asa: antes segunda aplicación, idsa:

inmediatamente después segunda aplicación, hpa: h post aplicación,  
dpa: días post aplicación. Análisis Tukey ( $\alpha=0.005$ ).

Continuación Figura 6.4,



Continuación Figura 6.4,



En la figura anterior, se observa que la producción de  $H_2O_2$  fue significativamente potenciada en las primeras horas post aplicación de los elicitors, comparada con el generado por las plantas control. Por otra parte, en los tratamientos control, los niveles de peróxido de hidrógeno no mostraron diferencias significativas durante los periodos evaluados. El monitoreo de producción de peróxido de hidrógeno fue seguido hasta el día 30 después de la aplicación de los elicitors AS,  $H_2O_2$  y QN, con la finalidad de estimar los niveles endógenos después de la primera inducción. Los altos niveles de  $H_2O_2$  fueron localizados en las primeras 2 hpa de elicitors, sin embargo, al seguir la dinámica en periodos diarios, se observó una acumulación de esta molécula del 4-30 día post aplicación de elicitors (dpa, Figura 6.4). En el día 42 posterior a la primera aplicación de elicitors, fue llevada a cabo una segunda aplicación de AS,  $H_2O_2$  y QN para evaluar los niveles de producción de  $H_2O_2$  cuando las plantas están en otra etapa de desarrollo fenológico, y dar continuidad a lo observado en el estudio exploratorio (Anexo IV), donde las plantas inducidas con los elicitors y que además fueron infestadas con bífidos (pulgones), aumentaron considerablemente la producción de peróxido, respecto a las plantas tratadas con agua. Después de la segunda aplicación de elicitors, los niveles de peróxido de hidrógeno incrementaron significativamente, y diferencias de producción del mismo fueron observadas entre los elicitors, y sus respectivas concentraciones (Figura 6.4). Cabe mencionar, que la vida media del  $H_2O_2$  20 mM es de 2 minutos y, que después de sólo 5 minutos no es detectable (Desikan et al., 1998). Por lo tanto, los resultados que se muestran, se refieren sólo al contenido de peróxido de hidrógeno endógeno causado por los elicitors. La producción de  $H_2O_2$  fue similar en las plantas inducidas con AS (5.21 ng/mg de tejido fresco Figura 6.4a) y  $H_2O_2$  (4.9 ng/mg de tejido fresco Figura 6.4b). En inducciones llevadas a cabo con QN, la producción de  $H_2O_2$  alcanzó sólo 4.5 ng/mg (Figura 6.4c), que coincide Lin et al. (2005), donde muestra una disminución del contenido de peróxido de hidrógeno endógeno, mediado por aplicaciones de QN, lo que condujo a una baja expresión

de transcritos de gluconasa y quitinasa en arroz. Cabe destacar, que el aumento significativo del contenido endógeno de peróxido posterior a la segunda aplicación, coincide con Camarena-Gutiérrez (2006), ya que menciona que el estallido oxidativo se da en dos etapas reguladas de manera independiente, la primera es una reacción inespecífica que no necesariamente termina en resistencia de la planta y la segunda es inducida sólo por patógenos incompatibles por lo que sólo las plantas resistentes son capaces de llegar hasta esta segunda fase. Por lo tanto, los elicitores están manteniendo alerta a la planta, para que esta responda de una manera más rápida al estrés biótico. Es claro que el control de  $H_2O_2$  comprende un conjunto de mecanismos ordenados y alternos que tienen el objetivo común de proteger a la célula del estrés oxidativo. Este resultado sugiere que el  $H_2O_2$  está participando en el mecanismo de defensa inicial de las plantas pues la primera etapa es el estallido oxidativo como parte de una respuesta hipersensible. Tal como se menciona en antecedentes, el  $H_2O_2$  participa en una variedad de mecanismos para la defensa de la planta activando o inactivando proteínas involucradas en la transducción de señales para respuesta a diferentes tipos de estrés. La vía más estudiada es la correspondiente a la de MAPKs, la cual puede generar respuestas para proliferación, diferenciación celular y apoptosis, entre otras (Ruíz-Nito, 2009).

#### **6.1.4 Actividad específica catalasa (CAT) en *C. annuum* L. por efecto de la aplicación de elicitores.**

La dinámica de actividad CAT y PAL en *C. annuum* L. var. Don Benito por efecto de la aplicación de elicitores, es mostrada en la Figura 6.5 y Figura 6.6, respectivamente. Las correspondientes actividades enzimáticas de la variedad Don Pancho, son mostradas en el Anexo V. La actividad catalasa (CAT) se evaluó con la finalidad de determinar indirectamente la presencia de  $H_2O_2$  generado por los elicitores AS, QN y  $H_2O_2$  a través del tiempo. En la Figura 6.5, puede ser

observado que la actividad CAT fue significativamente activada después de la aplicación de los elicitores. También se observa que la actividad CAT, siguió una tendencia similar al nivel de producción de peróxido de hidrógeno, excepto durante las primeras 12 h post aplicación (Figura 6.5). Lo anterior, se puede relacionar con el aumento de la actividad SOD, que al catalizar el radical  $^*O_2^-$  a  $H_2O_2$  hace necesaria la participación de enzimas CAT para convertir el  $H_2O_2$  formado en agua y  $O_2$ , inhibiendo así la formación de radicales -OH y sus subsecuentes daños a la célula. Observándose además que al usar el elicitor AS en las plantas de *C. annuum* L., existe mayor actividad CAT, por lo que se infiere que la mayor generación de peróxido de hidrógeno como parte de la respuesta hipersensible está a cargo de este elicitor. Por otra parte, la baja actividad catalasa obtenida en el 5 dpa con el elicitor QN, pudo deberse a que en las plantas, el peróxido de hidrógeno es usualmente removido por dos tipos de enzimas: catalasas y peroxidasas. Sin embargo, la participación de ambas es dependiente de la concentración del peróxido de hidrógeno dismutado por la SOD. Así que cuando los niveles de catalasa son bajos, la enzima ascorbato peroxidasa al igual que la catalasa puede reducir el peróxido de hidrógeno para formar agua. Esta enzima se encuentra en todas las partes de las plantas, incluyendo el espacio apoplástico, en donde bajo condiciones de estrés salino se produce un aumento de especies reactivas de oxígeno. Cabe destacar, que en los tratamientos con agua, la actividad CAT, no mostró diferencias significativas. Después de la segunda aplicación de elicitores, la actividad CAT aumento significativamente en el día 5 dpa (Figura 6.5). Los resultados anteriores, sugieren que la actividad CAT es directamente proporcional a la producción de peróxido de hidrógeno generado por cada elicitor, excepto durante las primeras horas post aplicación. Por lo que puede inferirse que la enzima llegó a su límite de saturación de sustrato, y que entonces, estén actuando otras enzimas del complejo antioxidativo que actúan como secuestradoras de especies ROS, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX) (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004).

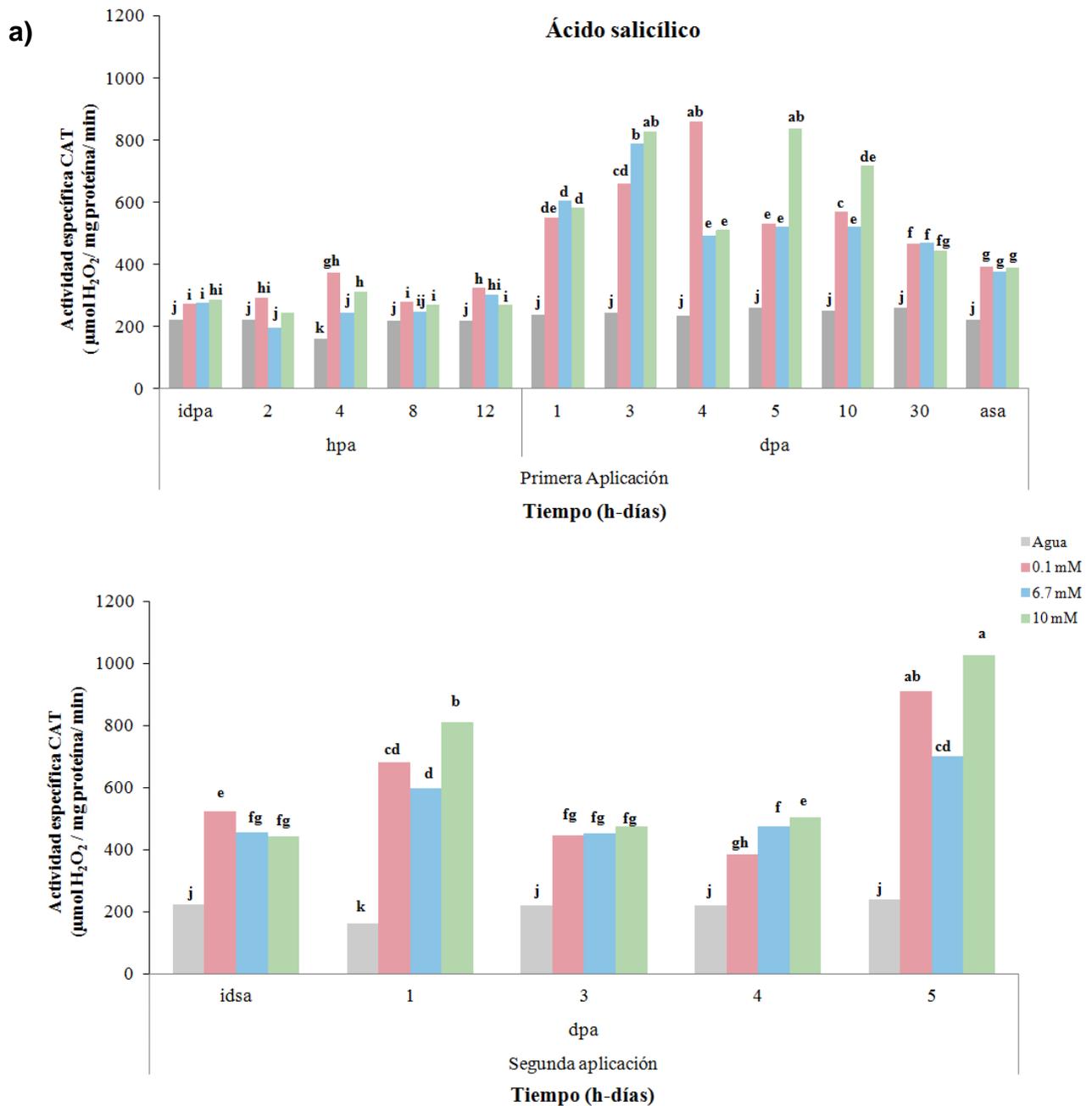
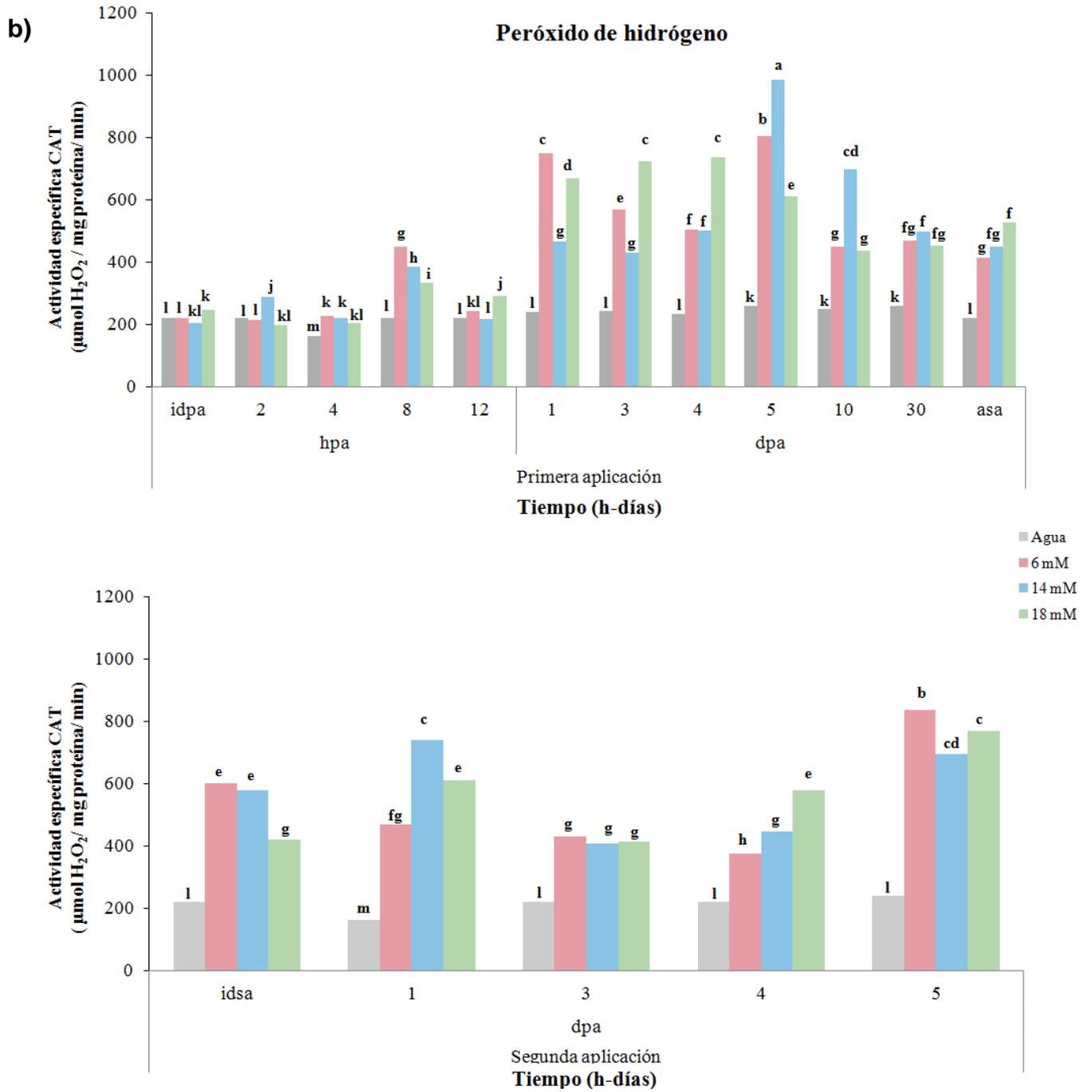
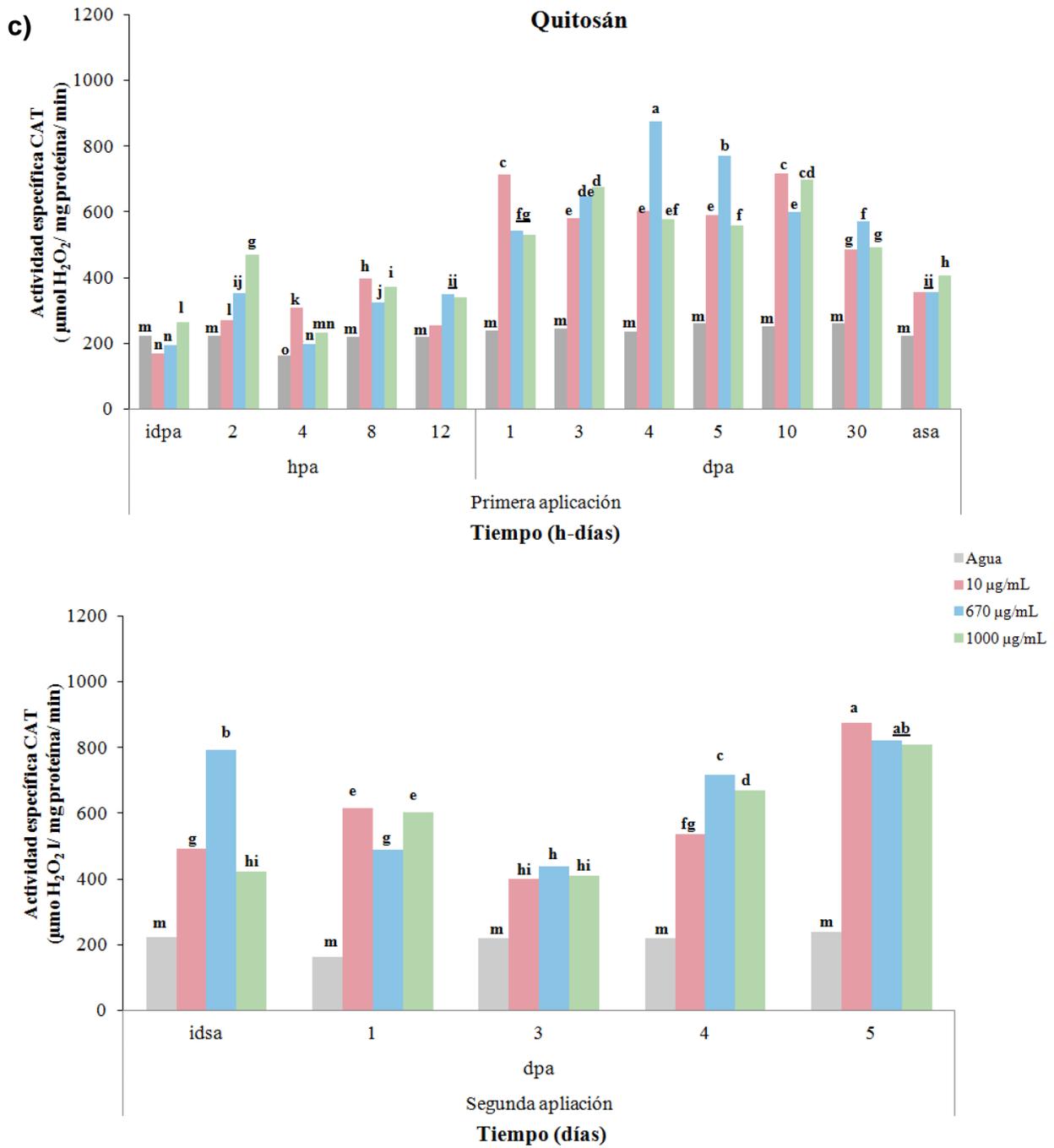


Figura 6.5. Dinámica de actividad específica de CAT en *C. annuum* L. var. Don Benito, por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitors. a) AS, b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c) QN. Primera aplicación en el día cero, segunda aplicación en el día 42 post primera aplicación. idpa: inmediatamente después primera aplicación, asa: antes segunda aplicación, idsa: inmediatamente después segunda aplicación, hpa: h post aplicación, dpa: días post aplicación. Análisis Tukey ( $\alpha=0.005$ ).

Continuación Figura 6.5,



Continuación Figura 6.5,



Los resultados sugieren que la alta actividad CAT se debe al estímulo recibido en la planta, por parte de los elicitores. Y coincide con lo reportado por Liu et al. (2012), en donde aplicaciones exógenas de 1mM AJ en plantas de trigo, previas al estrés con radiación UV-B, incrementan la actividad CAT por encima de 180 U. También, Iseri et al. (2013), demostraron que aplicaciones exógenas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas de tomate, aumentaron significativamente la respuesta y tolerancia al estrés, evidenciado con la actividad CAT. Sin embargo los resultados aquí mostrados, también difieren a lo mostrado por Airaki et al. (2012), debido a que reporta 100 veces menos de actividad CAT, que lo reportado en esta investigación, cuando plantas de *C. annuum* L. son expuestas a estrés con bajas temperaturas. Esta diferencia puede deberse a que el estrés con frío causa normalmente disminución en las actividades enzimáticas del sistema antioxidativo (SOD, CAT y POX; Mutlu et al., 2013). Lo anterior de acuerdo a lo reportado por Mutlu et al. (2013), en cultivares de cebada sensibles al frío; debido a que el pretratamiento con AS a cultivares de cebada, sensibles y tolerantes al frío, incrementaron significativamente la actividad del complejo enzimático antioxidativo.

#### **6.1.5 Actividad fenilalanina amonio liasa (PAL)**

En cuanto a la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL), decidió analizarse debido a que es una enzima clave en el metabolismo de los fenilpropanoides de plantas superiores. Además de que diversas investigaciones indican que la activación de PAL y el subsecuente incremento del contenido fenólico en plantas, se debe a una respuesta generalizada y asociada a la resistencia a enfermedades de diverso origen biótico (Vimala et al., 2009). El comportamiento de la dinámica de actividad PAL por efecto de la aplicación exógena de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en *C. annuum* L. var. Don Benito, es mostrado en la Figura 6.6 y el respectivo comportamiento de la variedad Don Pancho, en el Anexo V. De manera

generalizada, no se observaron diferencias significativas de la dinámica PAL a través del tiempo en el tratamiento con agua (control). Por lo contrario, se observó el aumento significativo de la actividad PAL respecto al control, durante la primera aplicación de elicitores, sin mostrar diferencias entre elicitores empleados

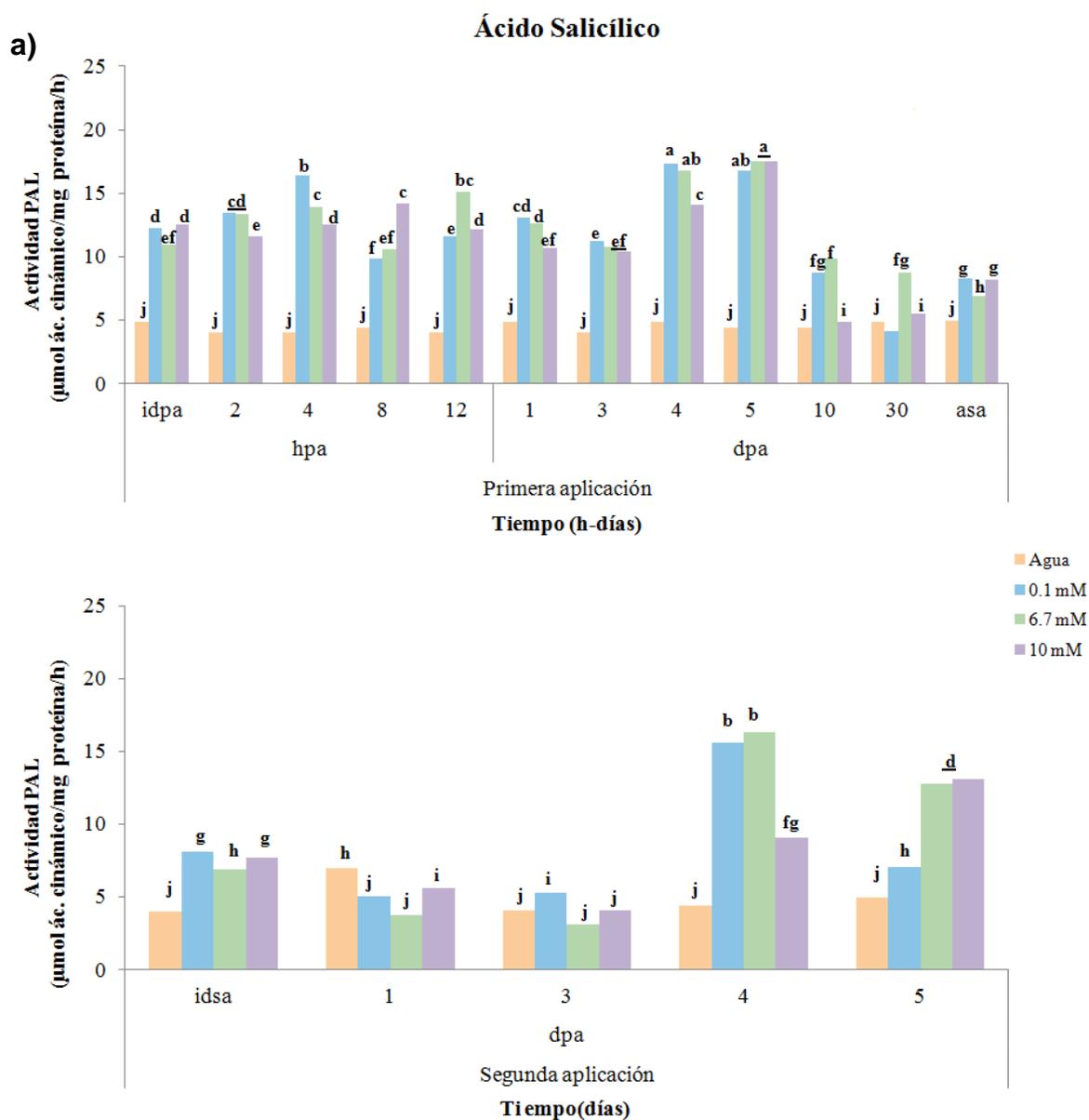
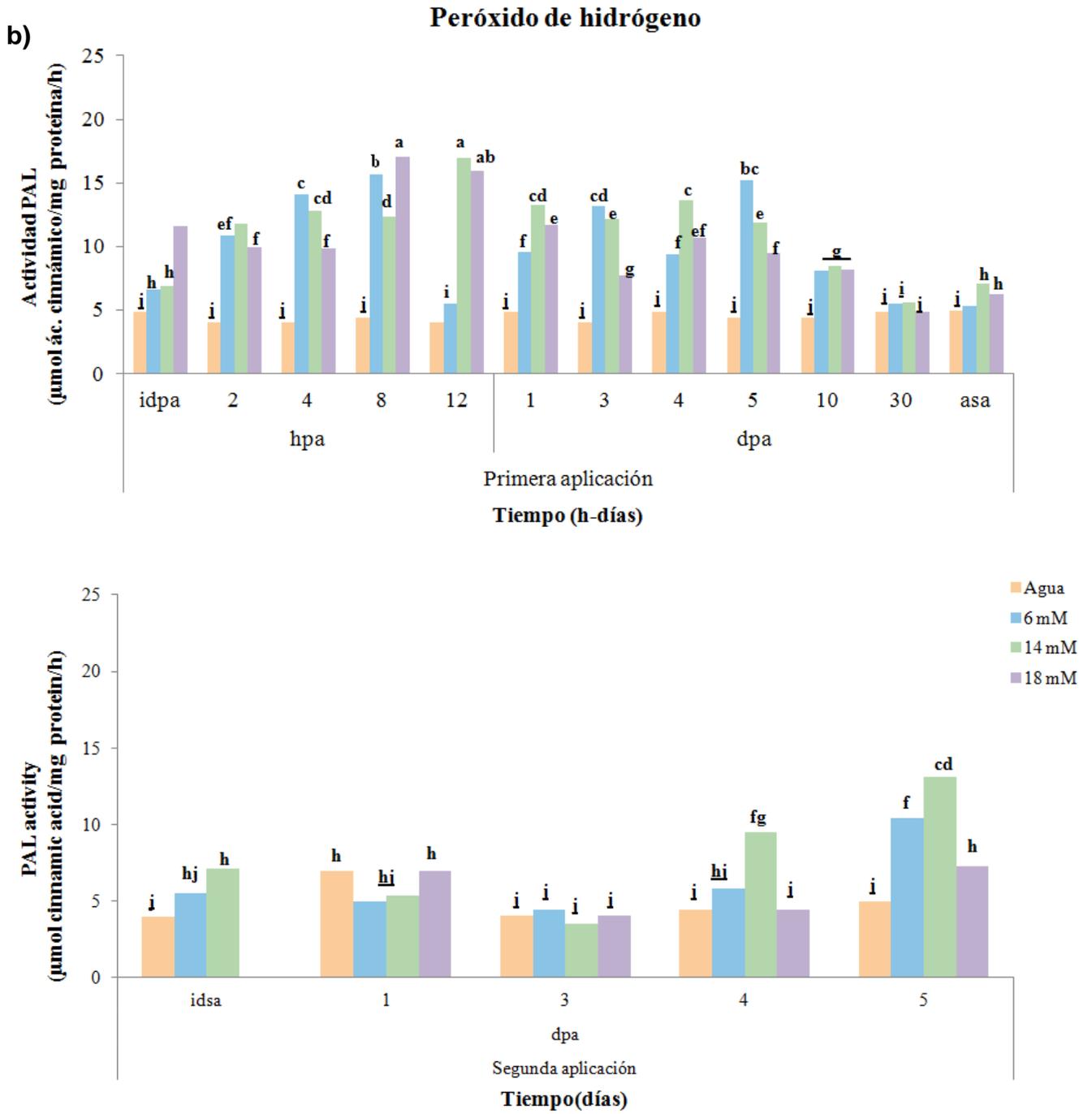


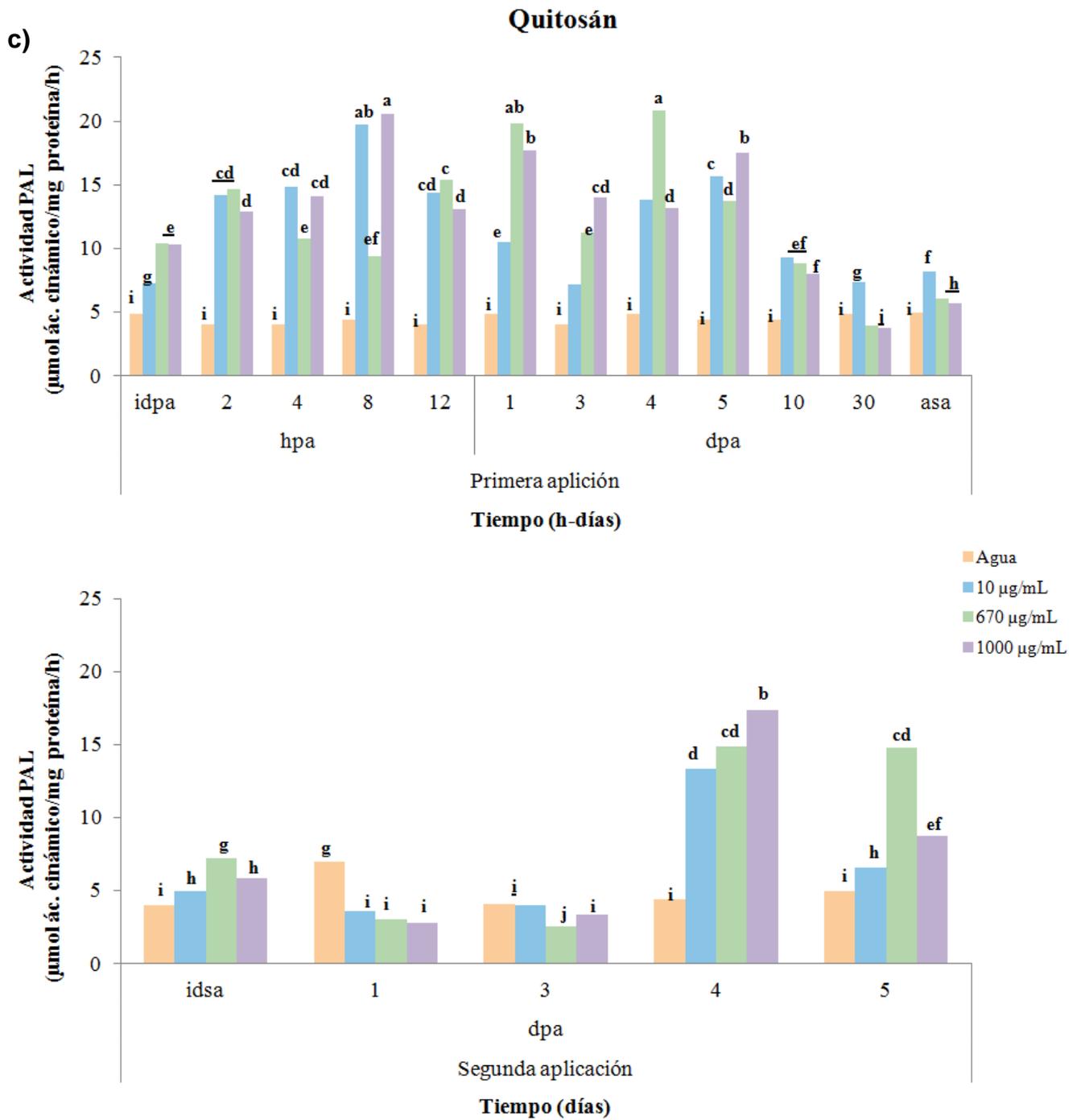
Figura 6.6. Dinámica de actividad específica de PAL en *C. annuum* L. var. Don Benito, por efecto de dos aplicaciones diferidas de elicitores. a) AS, b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, c) QN. Primera aplicación en el día cero, segunda aplicación en

el día 42 post primera aplicación. idpa: inmediatamente después primera aplicación, asa: antes segunda aplicación, idsa: inmediatamente después segunda aplicación, hpa: h post aplicación, dpa: días post aplicación. Análisis Tukey ( $\alpha=0.005$ ).

Continuación Figura 6.6,



Continuación Figura 6.6,



En la Figura 6.6, también puede apreciarse un incremento significativo de la actividad PAL justo después de la aplicación de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, la cual permaneció hasta 5 días posteriores a la aplicación, y que se correlaciona directamente con la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 6.4). Lo cual sugiere que la molécula H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como señal para la activación de esta enzima. También puede verse que el elicitor QN aumentó significativamente la actividad PAL a las 8 h post aplicación del elicitor, alcanzando una producción de ácido cinámico de hasta 21 µg/mg proteína (Figura 6.6c), la cual permaneció sin cambio hasta 4 dpa de la primera aplicación. En cuanto a los elicitores AS (Figura 6.6a) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 6.6b) sólo generaron una actividad PAL, evidenciada con la producción de ácido cinámico, de 17 21 µg/mg proteína en el 4 dpa y a las 8 hpa, respectivamente. Los resultados muestran que se obtuvo la mayor actividad PAL a las 12 hpa sin ostrar diferencia por el elicitor empleado (Figura 6.6); y el hecho de que esto ocurriera en las primeras horas post aplicación, sugiere la rápida señalización del peróxido de hidrógeno para la activación de PAL, la cual cataliza el primer paso de la ruta de los fenilpropanoides. Esto resulta importante, debido a que la activación de PAL incide en diversos aspectos de la planta, como desarrollo, crecimiento e inducción de la defensa contra estrés biótico y/o abiótico (Bautista-Banos et al., 2006; Tanabe et al., 2008; Sahebani et al., 2009). Finalmente, después de la segunda aplicación de elicitores, un aumento significativo en la actividad de PAL se muestra después de 4-5 días, dependiendo del inductor y la concentración evaluada.

#### **6.1.6 Patrón de expresión génica de *cat*, *pal* y *pr1* en *C. annuum* L.**

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado en la regulación de diversos genes relacionados al estrés, como *cat1* y *pal*, los cuales son ampliamente usados como indicadores de respuesta ROS a la señalización del estrés oxidativo; y la expresión de *pr1* es empleado como indicador de estrés biótico (Tanabe et al., 2008; Sahebani et al.,

2009). Los patrones de expresión de *cat1*, *pal* y *pr1*, por efecto de la aplicación de los elicitores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en *C. annuum* L. a las 0 y 2 h, así como al día 1, 3 y 5 post aplicación de elicitores, de la primera y segunda aplicación respectivamente, se aprecian en la Figura 6.7. Recordando que el objetivo de realizar este análisis en los periodos diferidos de las aplicaciones respectivas, fue conocer si se mantenía o incrementaba la expresión de los genes relacionados a estrés oxidativo como *cat1* y estrés biótico como *pal* y *pr1* después de la segunda aplicación, y; su relación con la dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por efecto de la interacción *C. annuum* L.-elicitor. Los patrones de expresión de los genes mencionados, fueron evaluados usando el tratamiento de concentración mayor de cada elicitor: 10 mM AS, 18 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1000 µg/mL QN, debido a que con estas concentraciones en general, se observó que se generó un alto contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno (Figura 6.4).

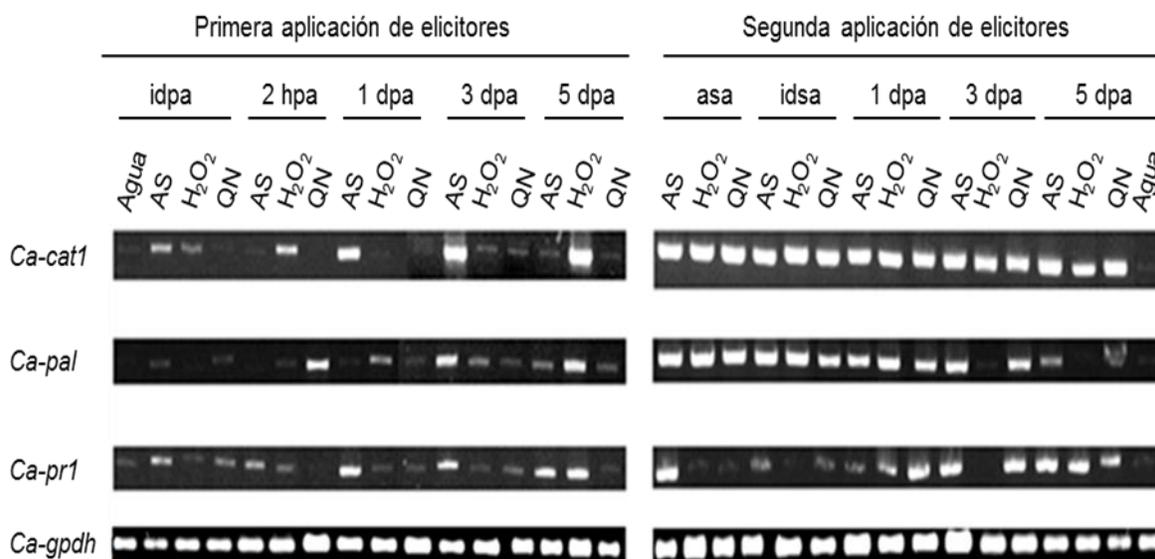


Figura 6.7. Patrón de expresión de los genes *cat1*, *pal* y *pr1* de *C. annuum* L. var. Don Benito, inducidos con la aplicación de elicitores. Resultado obtenido de dos aplicaciones únicas y diferidas con 10 mM AS, 18 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1000 µg/mL QN. Primera aplicación realizada en el día 0. Segunda aplicación realizada en el día 24 post primera aplicación. idpa: inmediatamente después primera aplicación, asa: antes segunda aplicación, idsa: inmediatamente después segunda aplicación, hpa:

horas post aplicación, dpa: días post aplicación.

Mencionado lo anterior, puede apreciarse que la expresión de *cat1*, mostrada en la Figura 6.7, es principalmente inducida por 10 mM AS y 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la primera fase de aplicación de estos elicitores. Así mismo, la Figura 6.7 muestra que la expresión de *cat1* fue notablemente incrementada respecto al control, en la segunda aplicación de los elicitores. Anteriormente, Willekens et al. (1994) analizaron la expresión de los tres genes de catalasa (*cat1*, *cat2* y *cat3*) de *Nicotiana plumbaginifolia*, demostrando que *cat1* se encuentra específicamente involucrada en la protección a la fotorespiración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cual, con excepción de los pétalos está confinada a los órganos verdes de la planta. De acuerdo a lo anterior y basados en los resultados obtenidos del análisis de expresión de *cat1* en *C. annuum* L., el nivel de transcrito en las hojas fue incrementándose a través de la dinámica de estrés oxidativo. Tal incremento, se debió principalmente por la inducción con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y potencialmente estimulada en la segunda aplicación de elicitores (Figura 6.7). Los resultados mostrados, también indican que el aumento de la actividad CAT en el tejido foliar de *C. annuum* L., previamente tratado con elicitores, puede atribuirse probablemente al aumento de los niveles de expresión de *cat1* y a la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por los elicitores. Lo anterior se debe a que no se espera que *cat1* sea el único gen codificante para las actividades catalasa en *C. annuum* L. lo cual coincide con Lee et al. (2005), que muestran un incremento en el nivel de ARNm de *cat1* en plantas de *C. annuum* L. previamente tratadas con paraquat (Dicloruro 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), un herbicida cuaternario de amonio. Sugiriendo que *cat1* puede jugar un papel importante en respuesta al estrés ambiental. En el mismo sentido, en los patrones de expresión de *pal*, se observó que la concentración 10 mM AS induce dos veces más la expresión de *pal* respecto al tratamiento control (agua). Lo anterior coincide con lo reportado por Potlakayala et al (2007) que menciona que el AS favorece la respuesta SAR en plantas, comprobándose que en la interacción planta-microorganismo se induce la enzima PAL que es clave en la biosíntesis de AS (Ballester et al., 2006). Por otro lado, 1000 µg/mL QN indujo 4 veces más la

expresión de *pal* en la primera y segunda aplicación de elicitores. Después de la segunda aplicación, sin hacer distinción del elicitor empleado, la expresión de *pal* incrementó notoriamente respecto al control. El incremento en la expresión *pal*, permaneció hasta el 3 dpa para 10 mM AS y 1000 µg/mL QN; mientras que para el 5 dpa la expresión de este gen fue disminuyendo (Figura 6.7). Cabe señalar que la inducción de este gen con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mantiene una expresión basal similar a la del control con agua, después del 3 dpa de la segunda aplicación de elicitores. Es importante mencionar, que en la expresión de *pal* se conoce que un aumento en el contenido de ARNm de *pal*, con frecuencia subyace la activación de la enzima (Xu et al., 2005). Por lo que además de la expresión de *cat1*, la expresión de *pal* fue inducida principalmente con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y sustancialmente incrementada en la segunda aplicación de elicitores; lo cual se atribuye al estado de alerta en el que la planta se encuentra (Figura 6.7), coincidiendo con la actividad PAL inducida por los elicitores mencionados (Figura 6.6). Finalmente, la expresión de *pr1* como principal indicador del estrés biótico, fue principalmente inducido con 10 mM AS respecto al control con agua en la primera aplicación de los elicitores; e incrementándose notoriamente en la segunda aplicación en el día 42. Cabe señalar, que la expresión de *pr1* con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN mantuvo niveles similares de expresión en las primeras horas post aplicación de la primera fase de inducción. Cabe distinguir que las proteínas PR son localmente inducidas en respuesta al ataque de patógenos, así como sistémicamente tanto en interacciones planta-patógeno compatibles como incompatibles (Heath, 2000). En primera instancia, la respuesta SAR de las plantas de Chile está acompañada por un estallido micro-oxidativo sistémico que genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una expresión sistémica de genes relacionados a la defensa en hojas no inoculadas (Heath, 2000). Las moléculas ROS inducen la expresión coordinada de un grupo de genes llamados genes SAR (Choi et al., 2007). Bajo este contexto, De Román et al. (2011) mostraron que la resistencia inducida a patógenos con análogos de AS, Metil-S-acibenzolar (ASM) puede moverse por compartimentos que están por encima y debajo del suelo, y; afectar a los microorganismos mutualistas, así como a patógenos de plantas. Los

resultados mostrados en la Figura 6.7, indican que la aplicación exógena de elicitores es un método eficiente para inducir la expresión de genes relacionados a la defensa de la planta como *pr1* y *pal* y al estrés oxidativo como *cat1*. Sin embargo, de los elicitores empleados, QN mostró menor inducción de expresión génica para *cat1*, *pal* y *pr1*; lo que sugiere que este elicitor actúa de manera más pasiva comparado con AS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así mismo, (Huang et al., 2011), describen cambios cuantitativos de fosfoproteínas presentes en *A. thaliana* después de que la planta había sido tratada con quitosan, benzotiadiazol, heridas y metil viológeno; los cuales estimularon la respuesta de resistencia basal de la planta, así como el estrés oxidativo. Sin embargo, y sin excluir a ningún elicitor empleado, en la segunda fase de inducción (día 42 posterior a la primera aplicación) fue observado un incremento considerable tanto de *cat1*, *pal* y *pr1*. Con lo cual, podemos decir que los resultados aquí mostrados coinciden con la estimulación y cambio de expresión de los genes relacionados al estrés biótico y que por lo tanto, son un eficiente método para estimular e inducir la respuesta de la planta activando rutas de señalización que finalicen en la activación de mecanismos de defensa.

#### **6.1.7 Análisis de fenoles y flavonoides totales inducidos en la interacción planta-elicitor.**

Es conocido que los fenoles y flavonoides en plantas superiores se producen en respuesta a factores ambientales (Ghasemzadeh y Ghasemzadeh, 2011). Por lo que el objetivo de hacer la determinación total de fenoles y flavonoides, radicó en evaluar cual elicitor y su respectiva concentración, AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, es el que mejor inducía el contenido total de estos compuestos en cuatro periodos post inducción. Tres de estos periodos, fueron llevados a cabo a las 2 hpa, 5 dpa y 42 dpa. El cuarto periodo fue llevado a cabo, inmediatamente después de la segunda aplicación de elicitores en el 42 dpa. Estos periodos de evaluación de compuestos fenólicos, fueron elegidos debido al estrés oxidativo

que fue generado en *C. annuum* L por AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, en esos periodos de tiempo. Descrito lo anterior, la acumulación de compuestos fenólicos en hojas de *C. annuum* L. var. Don Benito inducido por los elicitores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, se observan en la Figura 6.8.

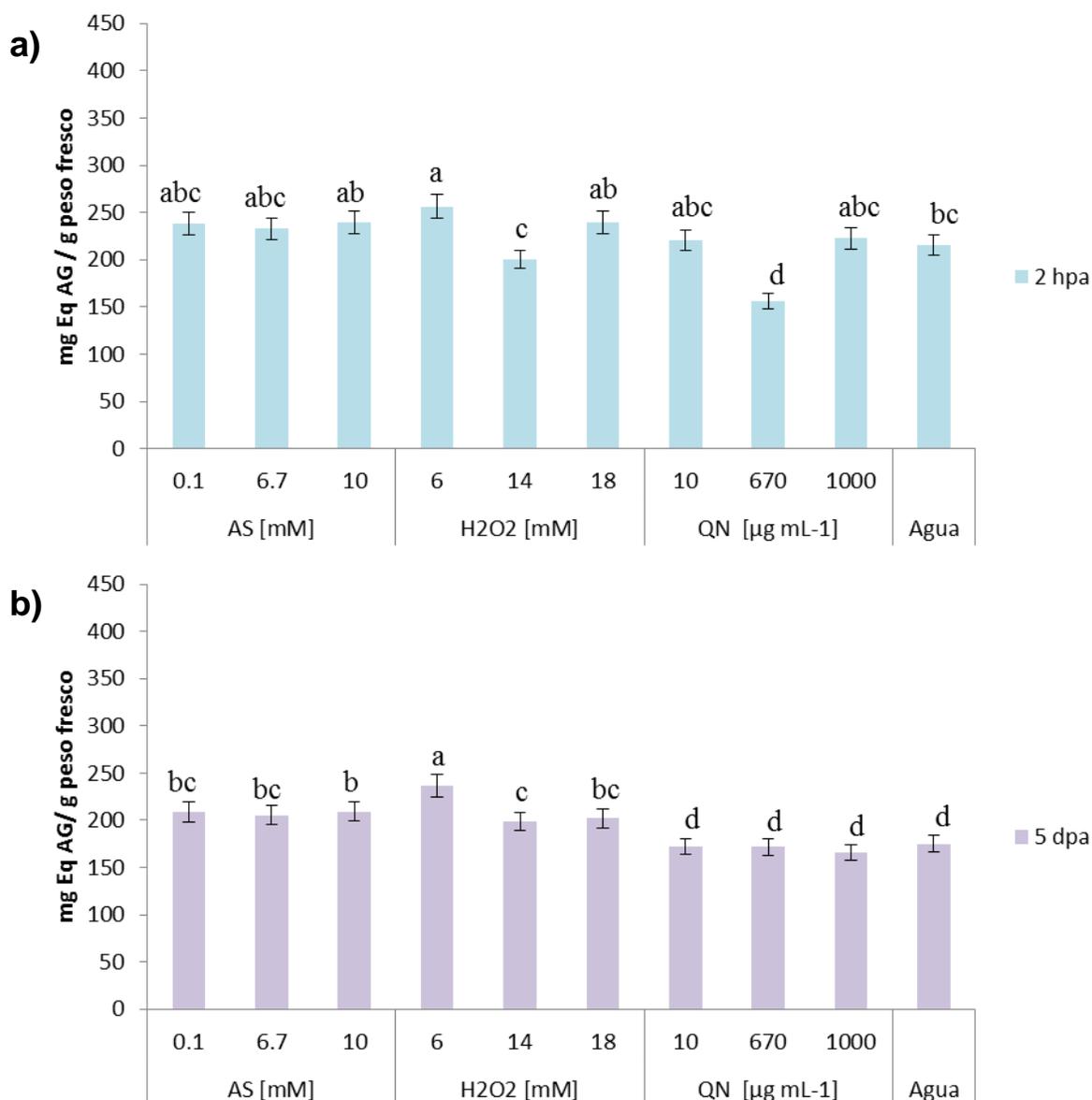
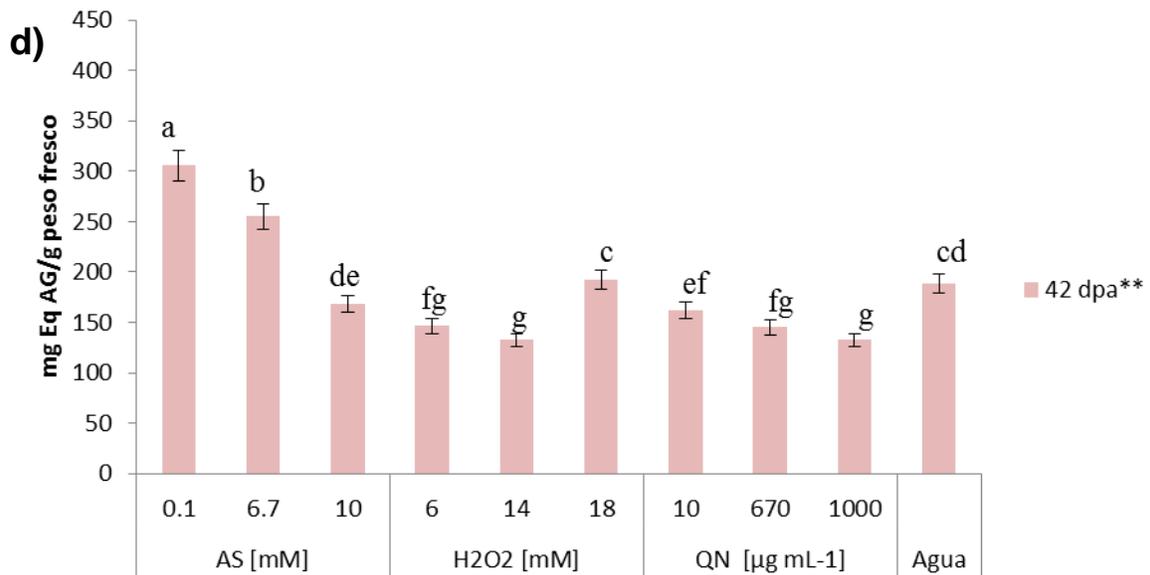
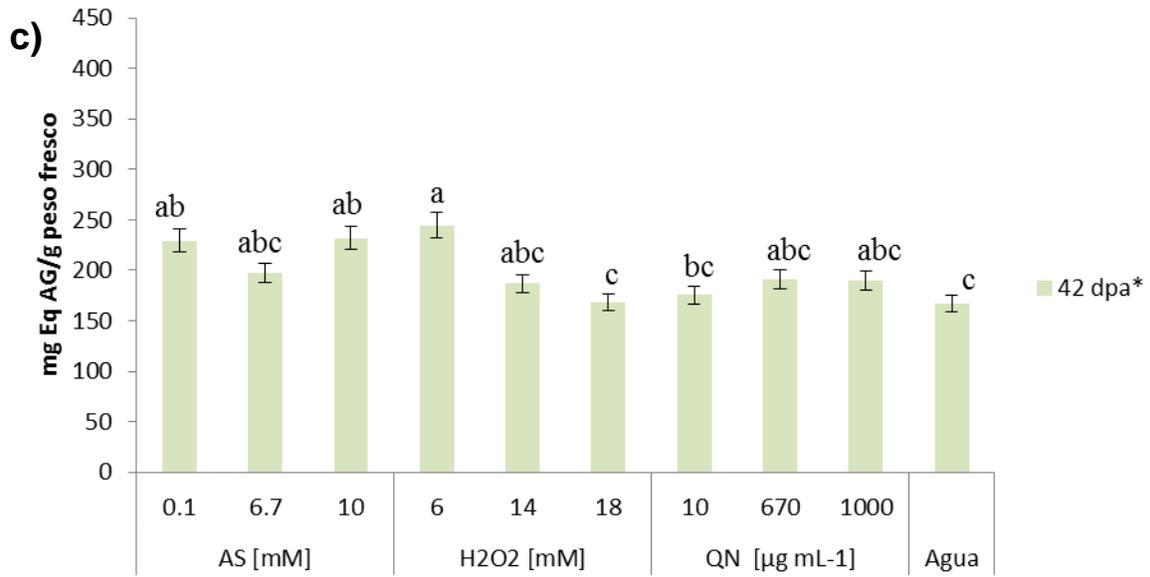


Figura 6.8. Contenido total de fenoles en *C. annuum* L. inducidos por la aplicación de elicitores. a) CTF 2 h post primera aplicación elicitores, b) CTF 5 días post primera aplicación de elicitores, c) CTF día 42 antes de la segunda aplicación (\*), d) CTF día 42, inmediatamente después de la segunda aplicación (\*\*). Letras diferentes indican diferencia significativa

de acuerdo a la prueba Tukey's ( $\alpha < 0.05$ ).

Cont. Figura 6.8



Los tres elicitors AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN, y sus respectivas concentraciones, incrementan el contenido de total de fenoles y flavonoides en los periodos mencionados, comparados con el control de agua (Figura 6.8). De acuerdo al ANOVA (Anexo VI) realizado en los datos de determinación de fenoles, existen diferencias significativas entre las dosis y elicitors empleados a las 2 hpa (F=13.256, P<0.0001), 5 dpa (F=118.0458, P<0.0001), más no para el 42 dpa de la primera aplicación (F=5.1951, P> 0.0011). Sin embargo, al exponer a la planta nuevamente al contacto con los elicitors, volvió a incrementarse significativamente el contenido fenólico de *C. annuum* L (F= 176.47, P<0.0001) lo cual puede observarse en la Figura 6.8. Con lo que se podría inferir, que la planta guarda una memoria celular que identifica el tipo de estrés al cual está siendo expuesta y activa nuevamente sus mecanismos de defensa, entre los que se encuentra la síntesis de compuestos químicos antimicrobianos como los son algunos tipos de fenoles y flavonoides. Lo anterior, debido a que la defensa inducida es un sistema complejo que parte desde una señal química o elicitor que desencadena la producción de enzimas del metabolismo secundario cuyo resultado final sería la síntesis de compuestos antimicrobianos, los cuales, afectan además de los patógenos, a los consumidores de las plantas y a sus enemigos naturales (Montes-Belmont 2009). En cuanto a la determinación de flavonoides totales, también se observaron diferencias significativas de acuerdo al ANOVA realizado y visualmente expresado en la Figura 6.9. Cabe señalar que tales diferencias no fueron observadas en las primeras 2 h post aplicación de elicitors (F= 3.831, P>0.0059) lo cual puede deberse a que los flavonoides son un subgrupo de compuestos fenólicos y por ende su síntesis a través de la ruta de los fenil propanoides es subyacente a la de los fenoles. Tanto la inducción con elicitors y posterior acumulación de fenoles y flavonoides en *C. annuum* L., coincide con lo reportado por Bhaskara et al. (1999), donde muestran que la síntesis de ácidos fenólicos fue estimulada en hojas primarias posterior al tratamiento con QN. Tal elicitor, indujo significativamente la síntesis de ácido

ferúlico, la cual fue aumentando conforme aumentaba la concentración de QN empleada.

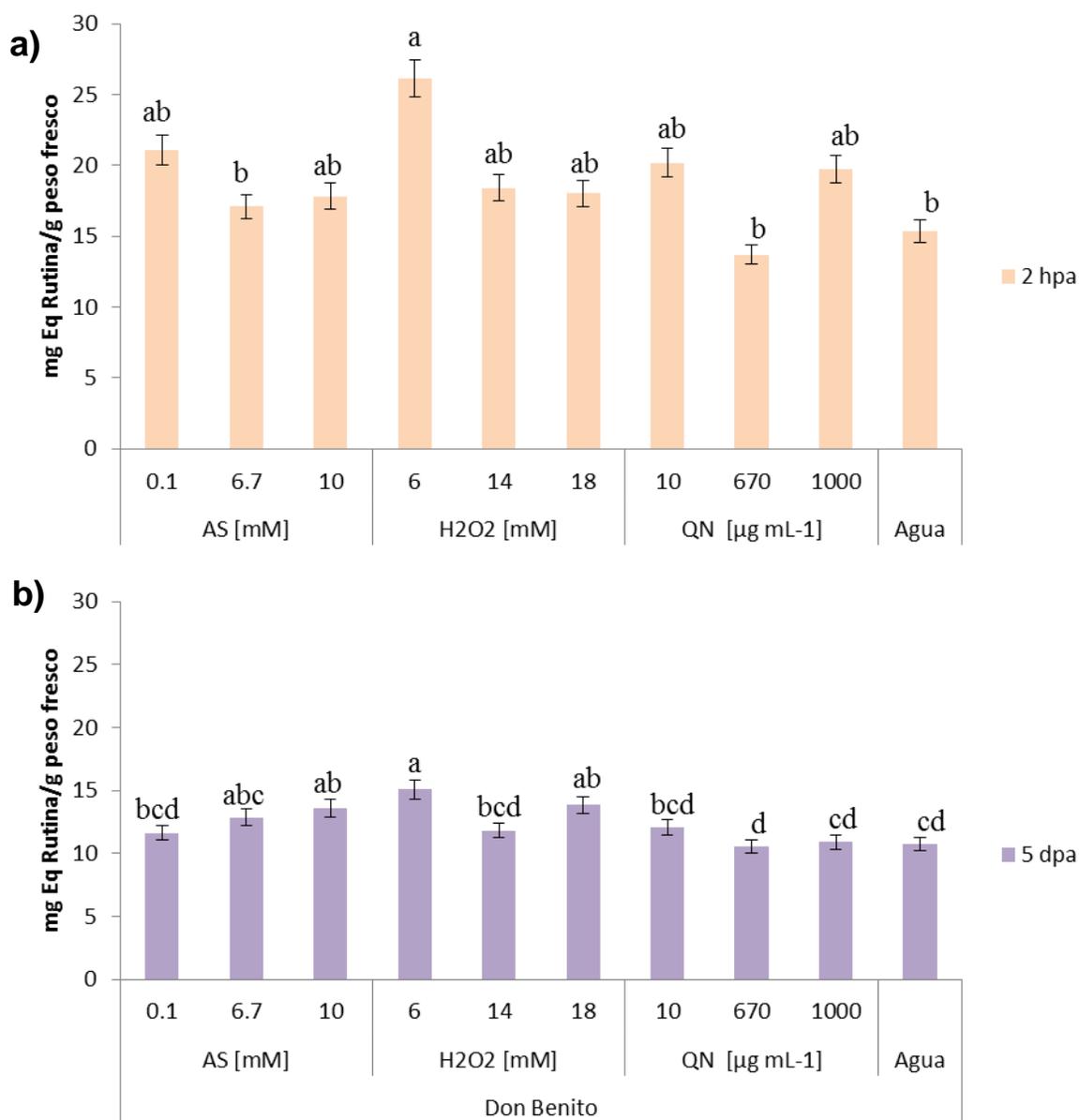
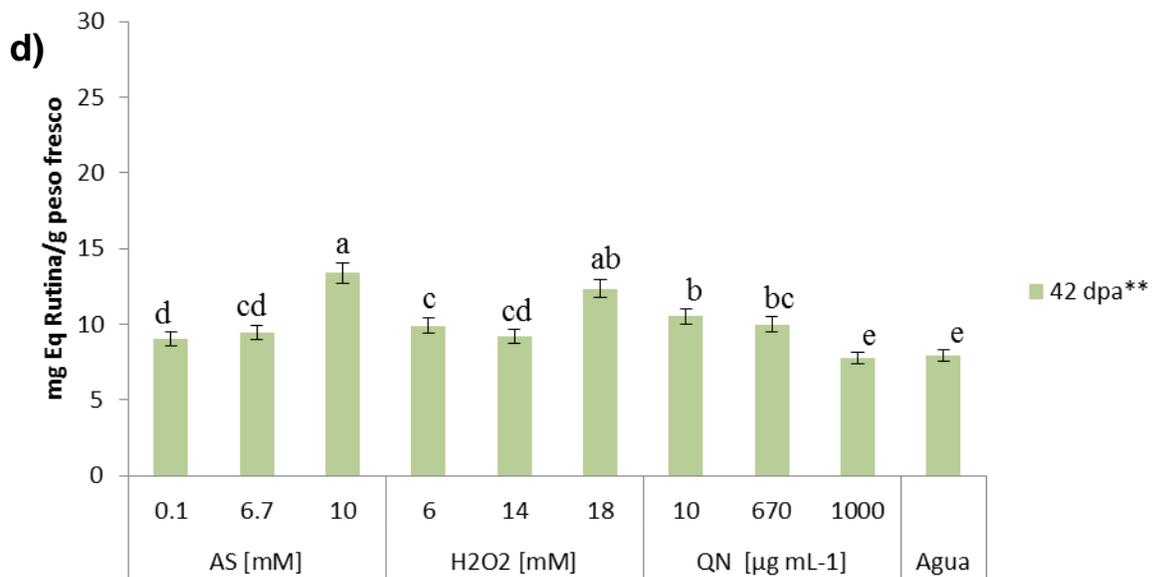
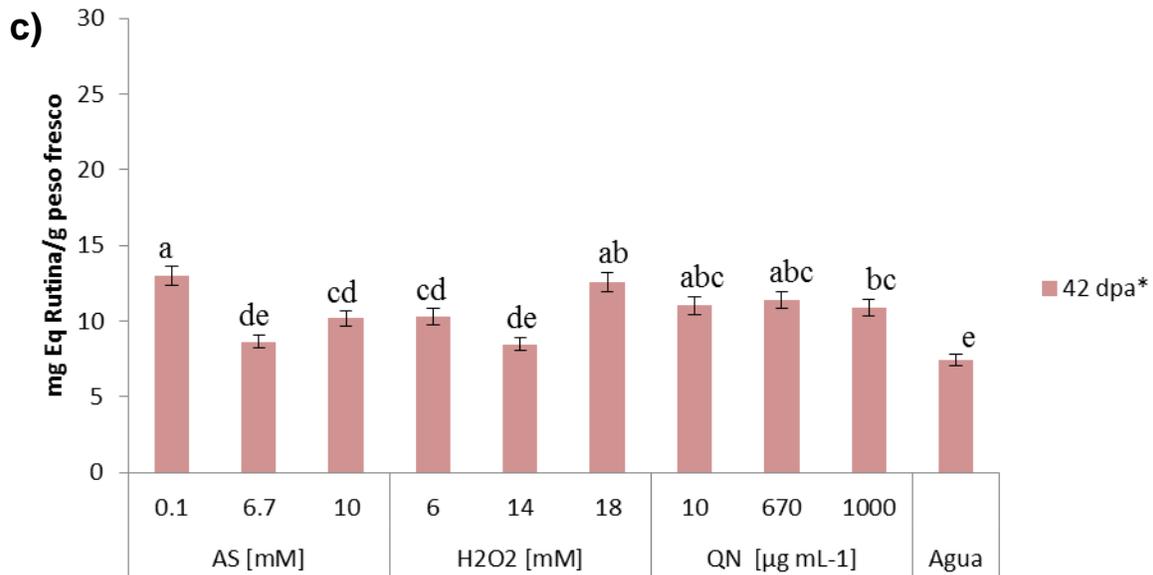


Figura 6.9. Contenido total de flavonoides en *C. annuum* L. inducidos por la aplicación de elicitores. a) 2 h post primera aplicación elicitores, b) 5 días post primera aplicación de elicitores, c) día 42 antes de la segunda aplicación (\*), d) día 42, inmediatamente después de la segunda aplicación (\*\*). Letras diferentes indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba Tukey's ( $\alpha < 0.05$ ).

Cont. Figura 6.9



Adicionalmente, Zhao et al. (2000), mostraron que la aplicación de ácido acetil salicílico, análogo de AS, en cultivos celulares de *C. roseus* potenció la

síntesis de indol. Así como cafeoilputrecina en hojas de tomate por la aplicación foliar de MeJa, como lo describieron Chen et al. (2006). En el mismo contexto, se mostró el efecto del estrés oxidativo generado por AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en *C. annuum* L., var Don Benito; bajo la perspectiva futura de emplearlos como protección de la planta contra estrés biótico (Mejía-Teniente et al., 2013). Además de mostrar que tanto el rendimiento como contenido de fitoquímicos, y; la respuesta sistémica inducida, convergen dentro de una nueva visión de mantenimiento agrícola en un marco de prácticas integradas agrícolas (García-Mier et al., 2013; Jiménez-García et al., 2013; Mejía-Teniente et al., 2013, 2010).

## **6.2 Indicadores fenotípicos y de expresión génica de las interacciones planta–elicitador–patógeno**

Concluido el análisis de estrés oxidativo, se llevaron a cabo las interacciones planta-elicitador-patógeno. Para lo cual, primero se realizó una prueba de susceptibilidad al Oomiceto *Phytophthora capsici*, con la finalidad de saber cuál de las dos variedades de *C. annuum* L. Don Benito o Don Pancho, presentaba mayor susceptibilidad a este Oomiceto. Lo anterior, para seleccionar a la variedad más susceptible y entonces tomarla como referencia para la inducción de la resistencia con los elicitores AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN.

De acuerdo a este análisis de susceptibilidad, la variedad Don Benito de *C. annuum* L., fue la más susceptible a *P. capsici*, con un porcentaje de susceptibilidad del 50 % a diferencia de la variedad Don Pancho, que se solo 35% de las plantas resultaron susceptibles a este Oomiceto. Observandose en ambas variedades síntomas característicos de la enfermedad de la marchitez del chile (Figura 6.10).



Figura 6.10. Fenotipo de susceptibilidad de *C. annuum* L. a *P. capsici*.

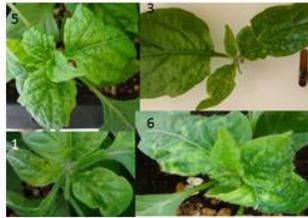
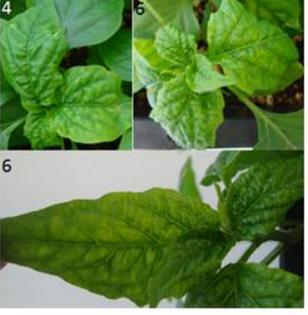
### 6.2.1 Interacción *C. annuum* L–Elicitor–Geminivirus

Habiendo seleccionado a la variedad Don Benito como la más susceptible, se hicieron los ensayos de inducción de la resistencia sistémica inducida con los elicitores, y a las 2 h post aplicación de éstos, se inocularon las plantas con el geminivirus PepGMV. Debido a que en este periodo es donde existía mayor generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acuerdo a los resultados del estrés oxidativo. El fenotipo de esta interacción fue evaluado a los 8 dpi, debido a que en esta fecha las plantas ya presentaban síntomas característicos como moteado de las hojas y rizado de las mismas; por lo que también se procedió a realizar el análisis de severidad de síntomas (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Severidad de síntomas en plantas de *C. annuum* L. a PepGMV

Tratamiento	Inoculación post aplicación	% Enfermedad (pe/pt)	Severidad promedio	Foto
AS (0.1 mM)	2 hpe	30 % (3/10)	4.33	
AS (6.7 mM)	2 hpe	40 % (4/10)	3.25	
AS (10 mM)	2 hpe	40 % (4/10)	3.5	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6 mM)	2 hpe	0 % (0/10)	0	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (14 mM)	2 hpe	30 % (3/10)	2.7	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (18 mM)	2 hpe	10 % (1/10)	6	

Cont. Tabla 6.1

Tratamiento	Inoculación post aplicación	% Enfermedad (pe/pt)	Severidad promedio	Foto
QN (10 µg/mL )	2 hpe	40 % (4/10)	3.75	
QN (670 µg/mL )	2 hpe	20% (2/10)	3	
QN (1000 µg/mL )	2 hpe	20 % (2/10)	1	
Control (+)	2 hpe	70 % (7/10)	5.33	
Control (-)	2 hpe	0% (0/10)	0	

Para comprobar la presencia y movilidad del virus, además del análisis fenotípico de síntomas característicos, se hizo una amplificación de ADN de extracciones basales y apicales con los oligos JM23 y JM24, los cuales dan lugar a un fragmento de 280 pb (Figura 6.11. Movimiento viral del PepGMV en plantas de *C. annuum* L. inducidas con elicitores.). El análisis de movimiento viral, se realizó para todos los tratamientos, pero aquí se muestra sólo los tratamientos, donde de acuerdo a la tabla de severidad de síntomas, existen menos casos de plantas enfermas o de menor severidad sintomatológica.

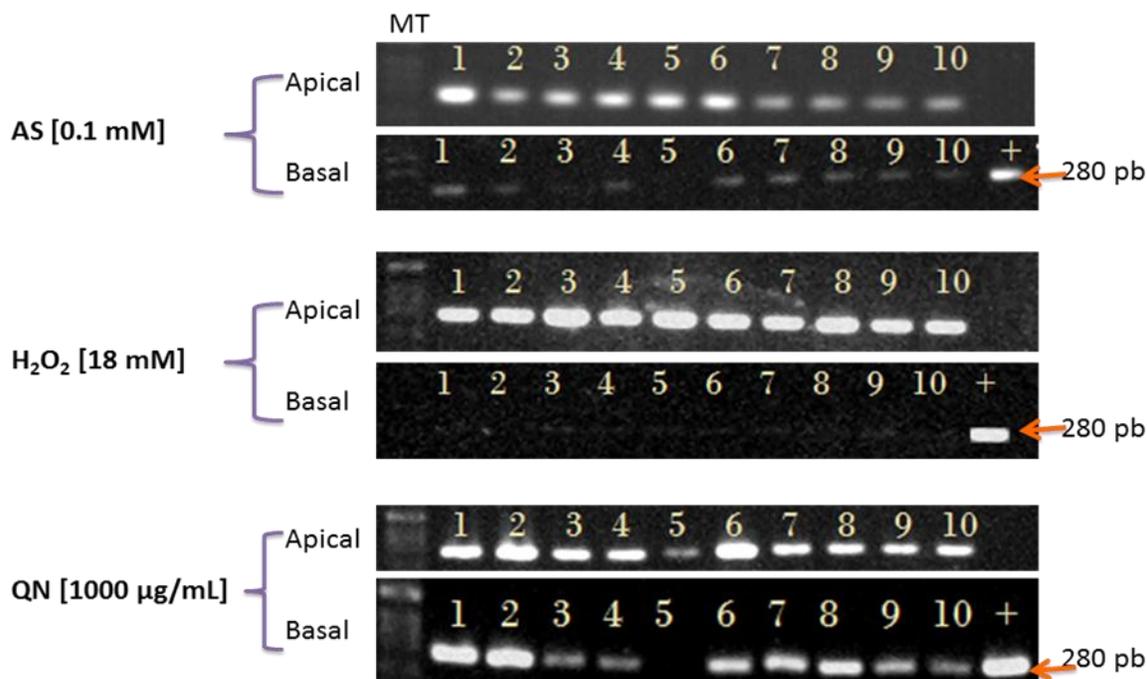


Figura 6.11. Movimiento viral del PepGMV en plantas de *C. annuum* L. inducidas con elicitores.

Posteriormente, se realizó el análisis de expresión génica con los oligonucleótidos correspondientes a la ruta MAP quinasa, con la finalidad de investigar si los elicitores pueden encender esta ruta y en que nivel de la misma.

En la gráfica de la Figura 6.12 se muestra la diferencia de expresión de cada uno de los genes analizados, que se realizó mediante densitometría de imágenes.

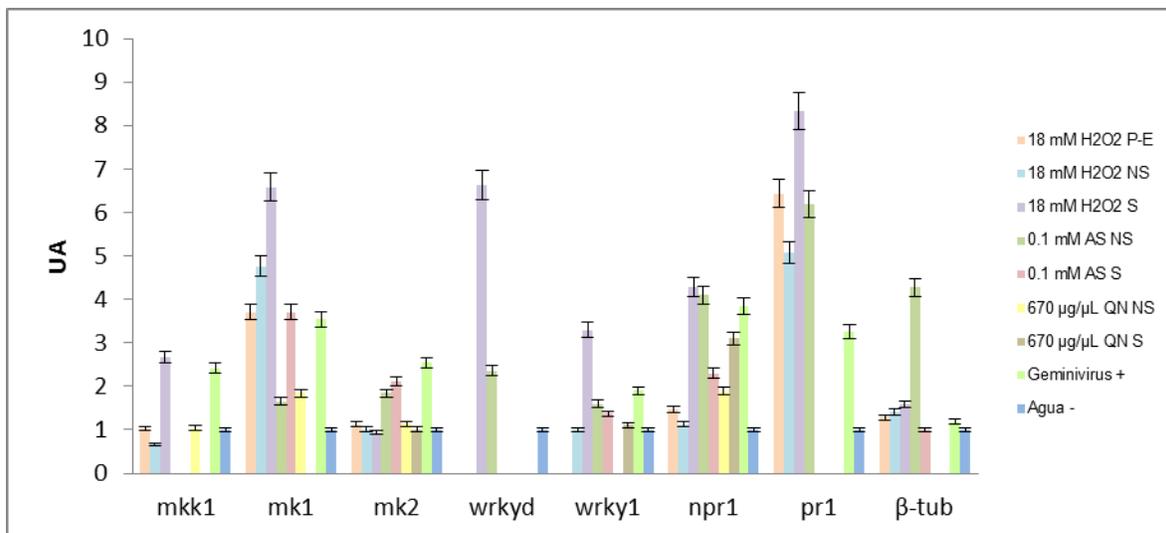


Figura 6.12. Cambio de expresión de la ruta MAP quinasa de *C. annuum* L. inducidas con elicitores.

### 6.2.2 Análisis de metabolitos secundarios de la interacción *C. annuum* L–Elicitor–Geminivirus

El análisis de metabolitos secundarios, realizado mediante HPLC, indicó la presencia de 8 compuestos fenólicos dentro de los primeros 40 minutos de elución (Tabla 6.2). La comparación del contenido de compuestos fenólicos de las muestras contra los estándares proporcionó los datos para conocer la concentración de dichos compuestos en cada grupo de plantas. Todos los compuestos mostrados en la Tabla 6.2, están involucrados en la defensa de las plantas contra patógenos, sin embargo la prueba estadística de Tukey con  $\alpha \leq 0.5$  revela que no existe diferencia estadística significativa entre el control negativo y el resto de los tratamientos, respecto a los compuestos fenólicos encontrados.

Tabla 6.2. Concentración de compuestos fenólicos en plantas de *C. annuum* L. tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 18 mM.

Compuesto fenólico	Tiempo de retención (min)	Concentración (µg/µL)			
		Control (+)	P-E-G sin síntomas	P-E-G con síntomas	Control (-)
Ácido clorogénico	2.713	2750.359	2817.507	2931.730	2782.296
Epicatequina	2.679	874.704	879.477	888.907	873.868
Ácido cafeico	20.553	14.572	16.477	16.293	16.882
Rutina	25.867	17.460	ND	18.161	ND
Ácido elágico	26.351	15.396	20.723	10.470	11.398
Ácido rosmarínico	30.776	5.936	6.563	7.143	6.280
Quercetina	36.486	21.330	20.405	20.845	20.136
Resveratrol	39.908	43.161	41.857	41.783	40.238

No obstante, el análisis estadístico mostró también, que el ácido clorogénico y la epicatequina presentaron una mayor concentración estadísticamente significativa respecto al control negativo. En tanto a la rutina, la concentración presente en los extractos de P-E-G sin síntomas y control negativo no fue detectable con los parámetros establecidos en el análisis.

### 6.2.3 Interacción *C. annuum* L–Elicitor–*P. capsici*

En cuanto a la interacción de la plantas inducidas con elicitores y retadas con *P. capsici*, la severidad de síntomas de esta interacción, es presentada en la Tabla 6.3 y la Tabla 6.4. Donde se presentan respectivamente la interacción con el

Oomiceto a los 5 d y 10 d posteriores a la inducción con los elicitores, debido a que en este periodo también existe acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acuerdo al análisis de estrés oxidativo realizado previamente. L En estas tablas, se muestra que los elicitores que indujeron retraso o ausencia de síntomas, fueron los tratamientos 0.1 mM AS, 18 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 670 µg/µL QN.

Tabla 6.3. Severidad de síntomas de la interacción *C. annuum* L-*P. capsici* de la 1ra. Inoculación a los 5 dpa de elicitores.

Tratamiento	Aplicación elicitores	Inoculación post aplicación	Observación de e síntomas	% Enfermedad (pe/pt)	Severidad
AS (0.1 mM)	Día 0	5 dpa	3dpi	60 % (3/5)	7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6 mM)	Día 0	5 dpa	3dpi	60 % (3/5)	7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (14 mM)	Día 0	5 dpa	3dpi	80 % (4/5)	7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (18 mM)	Día 0	5 dpa	3dpi	60 % (3/5)	7
QN (10 µg/mL)	Día 0	5 dpa	3dpi	100 % (5/5)	7
QN (670 µg/mL)	Día 0	5 dpa	3dpi	40 % (2/5)	7
QN (1000 µg/mL)	Día 0	5 dpa	3dpi	80 % (4/5)	7
Control (+)	Día 0	5 dpa	3dpi	100 % (5/5)	9
Control (-)	Día 0	5 dpa	3dpi	0 % (0/5)	0

Tabla 6.4. Severidad de síntomas de la interacción *C. annuum* L-*P. capsici* de la 2da. Inoculación a los 10 dpa de elicitores.

Tratamiento	Aplicación elicitores	Inoculación post aplicación	Observación de e síntomas	% Enfermedad (pe/pt)	Severidad	Atenuación síntomas
AS (0.1 mM)	Día 0	10 dpa	3dpi	100 % (13/13)	7	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (6 mM)	Día 0	10 dpa	3dpi	92 % (12/13)	7	1 (S5)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (14 mM)	Día 0	10 dpa	3dpi	92 % (12/13)	7	1 (S5)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (18 mM)	Día 0	10 dpa	3dpi	85 % (11/13)	7	1 NS – 1 (S5)
QN (10 µg/mL)	Día 0	10 dpa	3dpi	100 % (13/13)	7	-
QN (670 µg/mL)	Día 0	10 dpa	3dpi	61 % (8/13)	7	3 (S5)
QN (1000 µg/mL)	Día 0	10 dpa	3dpi	85 % (11/13)	7	2 (S5)
Control (+)	Día 0	10 dpa	3dpi	100 % (13/13)	7	
Control (-)	Día 0	10 dpa	3dpi	0 % (0/5)	0	

Del análisis de severidad, se tomaron los tratamientos 0.1 mM de AS, 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 670 µg de QN para hacer el análisis de expresión de genes relacionados a la ruta de señalización MAP quinasa, debido a que fenotípicamente fueron los que mejor respuesta de tolerancia mostraron al Oomiceto *P. capsici*.

En cuanto al nivel de expresión, se observa en la Figura 6.13 que el gen *mk2* fue activado por todos los tratamientos de elicitores. Con lo que se puede inferir la pronta inducción de la ISR para el sistema *C. annuum* L-Elicitor-*P. capsici*.

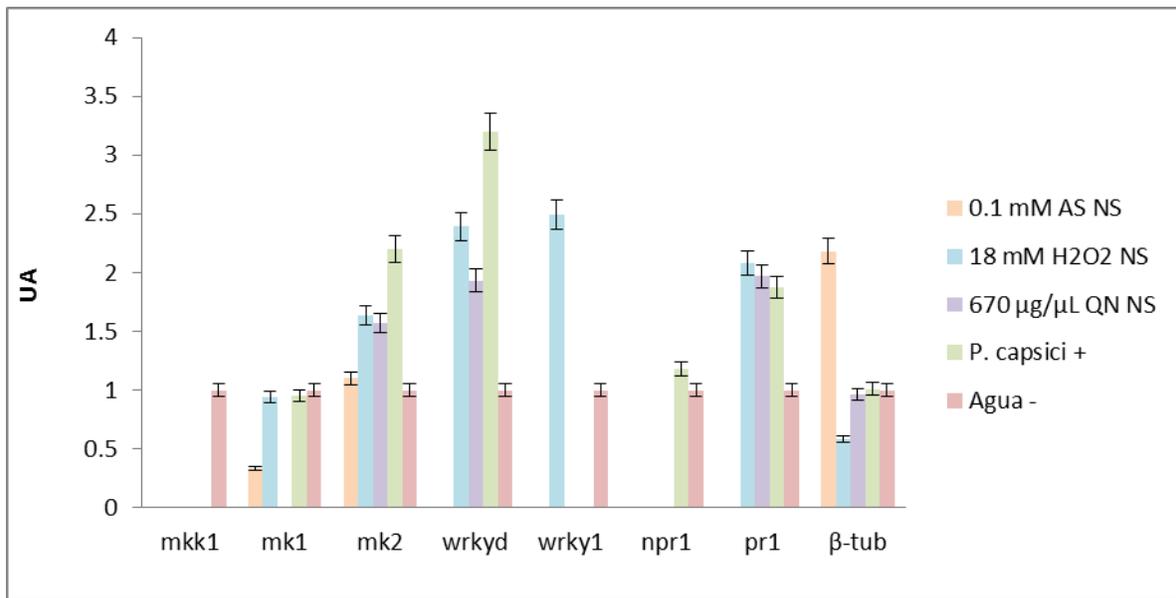


Figura 6.13. Análisis de expresión de la ruta MAP quinasa por inducción de elicitores en la interacción Planta-Elicitor- Oomiceto.

## 7 CONCLUSIONES

La aplicación foliar de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en *C. annuum* L. indujo la expresión de los genes *mkk1*, *mk1*, *mk2*, *wrkyd*, *wrky1*, *npr1*, *pr1* y *β-tub* relacionados directamente con la respuesta al estrés biótico. Sin embargo el elicitor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es el que mejor protegió a la planta, de acuerdo al los análisis fenotípicos de con geminivirus y *P. capsici*. También, este elicitor estimuló la producción de metabolitos secundarios como ácido cafeico, ácido elágico, rutina, ácido rosmarínico, quercetina y resveratrol, los cuales están involucrados en el sistema de defensa de las plantas. Con base en lo anterior, se puede concluir que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es una molécula que además de actuar intracelularmente como clave en los procesos de señalización, es un inductor eficaz del sistema de resistencia inducida en la planta, lo cual pudo comprobarse con la tolerancia a la infección por el geminivirus PepGMV en plantas inducidas con este elicitor.

## 8 REFERENCIAS

- Agarwal, P., Reddy, M.P., and Chikara, J. 2011. *WRKY*: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants. *Mol. Biol. Rep.*, 38:3883-3896.
- Agrios, G. 2005. *Plant pathology* .5th Ed. Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-044565-4. 30 Corporate Drive, Suite 400, Burlington, MA 01803, USA 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA 84 Theobald's Road, London WC1X 8RR, UK.
- Airaki, M.; Leterrier, M.; Mateos, R.M.; Valderrama, R.; Chaki, M.; Barroso, J.B.; Del Río, L.A.; Palma, J.M.; Corpas, F.J. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ.* **2012**, 35, 281–295.
- Alfano, J.R., and A. Collmer 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.
- Ali Ghasemzadeh<sup>1\*</sup> and Neda Ghasemzadeh. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(31), pp. 6697-6703, 23 December, 2011.
- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., and Van Loon, L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with *TMV*. *J. Gen Virol.* 47:79-87.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 55:373-399.
- Ardila, H., Baquero, B., and Martínez, S. 2007. Inducción de la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L) por elicitores del hongo *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Dianthi* raza 2. *Rev. Colomb. Quim.* 36:151-167.
- Arnnok P, Ruangviriyachai C, Mahachai R, Techawongstien S, Chanthai S. 2012. Determination of total phenolics and anthocyanin contents in the pericarp of hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food. Res. Int.* 19:235-243.
- Asai, S., Ohta, K., and Yoshioka, H. 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.*, 20:1390-1406.
- Bautista-Banos, S.; Hernandez-Lauzardo, A.N.; del Velazquez-Valle, M.G. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Prot.* **2006**, 25, 108–118.
- Benezer, M., Castro, E., and García E. 2008. La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 26:56-61.

- Bittel, P., and S. Robatzek 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 10:335-341.
- Camarena, G.G., and de la Torre, A.R. 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: Estado actual. *RCHSCFA*, 13:157-162.
- Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., and Oomah, B. D. 2002. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris*L.). *J. Agric. Food Chem.* 50:6975–6980.
- Castro-Mercado and García-Pineda. 2009. La inmunidad innata en las plantas: una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Biologicas.* 11:43-47.
- Chandlee, J.M., Tsaftaris, A.S., and Scandalios, J.G. 1983. Purification and partial characterization of three genetically defined catalases of maize. *Plant Sci. Lett.* 29: 117–131.
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., and Yu, D. 2012. The role of *WRKY* transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim Biophys Acta.*1819:120-128.
- Cheng, Y.J., Kim, M.D., Deng, X.P., Kwak, S.S., and Chen, W. 2013. Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants expressing IbMYB1, a sweet potato transcription factor. *J Microbiol Biotechnol.* 23:1737-1746.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and B.J. Staskawicz. 2006. Host—microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Choi, H.W.; Kim, Y.J.; Lee, S.C.; Hong, J.K.; Hwang, B.K. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol.* **2007**, 145, 890–904.
- Chong, T.M., Abdullah, M.A., Fadzillah, N.M., Lai, O.M., and Lajis, N.H. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. *Enzyme Microb. Tech.* 36: 469–477.
- Collinge, D.B., Gregersen, P., and Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *In* Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Dang, F.F., Wang, Y.N., Yu, L., Eulgem, T., Lai, Y., Liu, Z.Q., Wang, X., Qiu, A.L., Zhang, T.X., Lin, J., Chen, Y.S., Guan, D.Y., Cai, H.Y., Mou, S.L., He, S.L. 2013. CaWRKY40, a *WRKY* protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Environ.* 36:757-774.
- De Román, M.; Fernández, I.; Wyatt, T.; Sahrawy, M.; Heil, M.; Pozo, M.J. Elicitation of foliar resistance mechanisms transiently impairs root association with arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Ecol.* **2011**, 99, 36–45.
- Desikan, R.; Reynolds, A.; Hancock, J.T.; Neill, S.J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene

- expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem. J.* **1998**, 330, 115–120.
- Durrant, W.E., and Dong, X. 2004. Systemic Acquired Resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 42:185-209.
- Ebel, J., and Cosio, E.G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148:1-36.
- Edreva, A. 2005. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen. Appl. Plant. Physiol.* 31:105-124.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Fones, H., and Preston, G.M. 2011. Reactive oxygen and oxidative stress tolerance in plant pathogenic *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 327:1-8.
- Fornoni, J., Núñez-Farfán, J., Valverde, P.L., and Rausher, M. 2004. Evolution of mixed strategies of plant defense allocation against natural enemies. *Evolution.* 58:1685-1695.
- Frank, S. A. 1992. Models of plant-pathogen coevolution. *Trends Genet.* 8(6):213-219.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S., and Zhang, Y. 2008. *MEKK1*, *MKK1/MKK2* and *MPK4* function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res.* 18:1190-1198.
- García-Neria, M.A., and Rivera-Bustamante, R. 2011. Characterization of Geminivirus Resistance in an Accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 24: 172–182.
- Gerasimova, N.G., Pridvorova, S.M., and Ozeretskovskaya, O.L. 2005. Role of L-phenylalanine ammonialyase in the induced resistance and susceptibility of potato plants. *Appl. Biochem. Microbiol.* 41:103–105.
- González-Chavira, M.M., Torres-Pacheco, I., and Guzmán, M.H. 2002. Patógenos involucrados en la marchitez del chile. Proceedings of 16th International Pepper Conference Tampico, Tamaulipas, México. November 10–12.
- Guevara, L., Ruíz, M.L., Rangel, R.M., Torres, I., Rivera, R.F., Muñoz, C.I., González, M.M., Cruz, A., Guevara, R.G. 2012. Expression of a germin-like protein gene (CchGLP) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in trans. *PMPP.* 78:45-50.
- Guzmán-Maldonado, S.H., Torres-Pacheco, I., y González-Chavira, M. 2002. Genetic variability and processing effect on nutraceutical factors of jalapeño pepper. 16 th. International Pepper Conference. Pozo-Campodónico, O. Ed. Tampico, Tamaulipas, 10-12 Noviembre, 2002. Pag. 18.
- Hairi, B., Sall'e, G., and Andary C. 1991. Involvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma.* 162:20–26.
- Heath, M.C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant. Mol. Biol.* 44:321-334.

- Heil, M., and Bostock, R. 2002. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Ann. Bot.* 89:503-512.
- Huang, C.; Verrillo, F.; Renzone, G.; Arena, S.; Rocco, M.; Scalonico, A.; Marra, M. Response to biotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*: Analysis of variably phosphorylated proteins. *J. Proteomics* **2011**, 74, 1934–1949.
- Huh, S.U., Choi, L.M., Lee, G.J., Kim, Y.J., and Paek, K.H. *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon Tobacco mosaic virus infection. *Plant Sci.* 197:50-58.
- Hutchinson, S.W. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36:59-90.
- Hyong, W.C., Young, J.K., Sung, C.L., Jeum, K.H., and Byung, K.H. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO<sub>2</sub> activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *ASPB.* 145:890-904.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, C., Heberle, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y., and Walker, J.C. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7:301-308.
- Iseri, O.D.; Korpe, D.A.; Sahin, F.I.; Haberal, M. Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta Physiol Plant* **2013**, doi:10.1007/s11738-013-1228-7.
- Jalali, B.L. and Bhargava, S. 2002. Gene Expression during host plant and fungal pathogen interactions. *Proc Nat Acad Sci India.* 72:235-255.
- Jonak, C., Okrész, L., Bögre, L., and Hirt, H. 2002. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol.* 5:415-24.
- Jones, D.G., and Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323-329.
- Kawano, T., and Furuichi, T. 2004. Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants. *Plant. Biotech.* 21(5):319-335.
- Kuc, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32:854-860.
- Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *Eur. J. Plant. Pathol.* 107: 7-12.
- Lange BM, Lapierre C, Sanderman H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., and Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *MPMI.* 8:863-870.
- Lee, S.H.; An, C.S. Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol. Cells* **2005**, 20, 247–255.
- León-Galvan, M.F. 2004. Determinación Genética Diferencial de Plantas de Chile *Capsicum chinense* Jacq BG-3821 (UX-SMH-1-4), Resistentes a infecciones mixtas causadas por los geminivirus PHV (Virus Huasteco del

- chile) y PepGMV (Virus del Mosaico Dorado del Chile). Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Celaya.
- Liang, W., Yang, B., Yu, B.J., Zhou, Z., Li, C., Jia, M., Sun, Y., Zhang, Y., Wu, F., Zhang, H., Wang, B., Deyholos, M.K., Jiang, Y.Q. 2013. Identification and analysis of *MKK* and *MPK* gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Genomics*.14:392-416.
- Lim, J.H., Park, C.J., Huh, S.U., Choi, L.M., Lee, G.J., Kim, Y.J., and Paek, K.H. 2011. *Capsicum annuum* *WRKYb* transcription factor that binds to the *CaPR-10* promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 411:613-619.
- Lin, W.; Hu, X.; Zhang, W.; Rogers, W.J.; Cai, W. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J. Plant Physiol*. **2005**, 162, 937–944.
- Liu, X.; Chi, H.; Yue, M.; Zhang, X.; Li, W.; Jia, E. The regulation of exogenous jasmonic acid on UV-B stress tolerance in Wheat. *J Plant Growth Regul*. **2012**, 31, 436–447.
- Madriz-Ordeñana, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-pat.geno. Manejo integrado de plagas. Costa Rica. No. 63: 22-32.
- Martínez, C., Blanc, F., Le, C.E., Besnard, Q., Nicole, M., and Baccou, J.C. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant Physiol*. 127:334-344.
- Mayers, C.N., Lee, K.C., Moore, C.A., Wong, S.M., and Carr, J.P. 2005. Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: Contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *MPMI*. 18: 428–434.
- Mejía, L., Durán, F.D., Chapa, A.M., Torres, I., Cruz, A., González, M.M., Ocampo, R.V., and Guevara, R.G. 2013. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *Int. J. Mol. Sci*.14:10178-10196.
- Mészáros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardóczy, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S., and Bögre, L. 2006. The *Arabidopsis* MAP kinase kinase *MKK1* participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J*. 48:485-98.
- Munemasa, S., Muroyama, D., Nagahashi, H., Nakamura, Y., Mori, I.C., and Murata, Y. 2013. Regulation of reactive oxygen species-mediated abscisic acid signaling in guard cells and drought tolerance by glutathione. *Front Plant Sci*. 4:472-489.
- Mutlu, S.; Karadagoglu, O.; Atici, O.; Nalbantoglu, B. Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidative system and protein patterns in barley apoplast. *Biol. Plant*. **2013**, doi:10.1007/s10535-013-0322-4.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., and Hancock, J.T. 2002. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot*. 53: 1237–1247.

- Nurmi, K., Ossipov, V., Huakioja, E. and Pihlaja, K. 1996. Variation of total phenolic content and individual low-molecular-weight phenolics in foliage of mountain birch trees (*Betula pubescens* ssp. *tortuosa*). *J. Chem. Ecol.* 22: 2023-2040.
- Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., Satoh, K., Kumar, A., Leung, H., and Kikuchi, S. 2014. Comparative transcriptome profiles of the *WRKY* gene family under control, hormone-treated, and drought conditions in near-isogenic rice lines reveal differential, tissue specific gene activation. *J Plant Physiol.* 171:2-13.
- Odjacova, M., and Hadjiivanova, C. 2001. The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg. J. Plant. Physiol.* 27:101–109
- Oh, S.K., Baek, K.H., Park, J.M., Yi, S.Y., Yu, S.H., Kamoun, S., and Choi, D. 2008. *Capsicum annuum* *WRKY* protein *CaWRKY1* is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytol.* 177:977-989.
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., and Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 85: 935–942.
- Orbán N, Bóka K. Lithium alters elicitor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cultured plant cells. *Biolo Plantarum* 2013;57:332-340.
- Orellana-Benavides, F. E., Escobar-Betancourt, J. C., Morales-de Borja, I. S., Cruz-Valencia, R. A. y Castellón-Hernández, M. E. (2003). Cultivo de chile dulce, Guía Técnica. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador.
- Orozco ML, Narváez J, Ryan CA. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomatoe plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 2001;13:179-191.
- Ozeretskovskaya, O.L.; Il'inskaya, L.I.; Vasyukova, N.I. (1994). *Fiziol Rast* (Moscow). Vol. 41 No. 4:626-633.
- Ozeretskovskaya, O.L.; Vasyukova, N.I. (2002). The use of elicitors for protection of cultured plants demands caution. *Applied Biochemistry and Microbiology.* Vol. 38 No. 3: 277-279.
- Park CJ, Shin YC, Lee BJ, Kim KJ, Kim JK, Paek KH. A hot pepper gene encoding *WRKY* transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*. *Planta* 2006;223:168-179.
- Pieterse, CMJ; Van Loon,LC. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H. *MAPK* cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol.* 2009;12:421-426.
- Qiu JL, Zhou L, Yun BW, Nielsen HB, Fiil BK, Petersen K, Mackinlay J, Loake GJ, Mundy J, Morris PC. *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases *MKK1* and *MKK2* have overlapping functions in defense signaling mediated by *MEKK1*, *MPK4*, and *MKS1*. *Plant Physiol.* 2008;148:212-222
- Rico-Guerrero, L., Medina-Ramos, S., Muñoz Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., Guevara-González, R. G., Guerrero-Aguilar, B. Z., Torres-Pacheco, I., Rodríguez-Guerra, R., y González-Chavira, M.M. (2004). Detección de

- Phytophthora capsici* Leonian en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. Rev. Mex. Fitopatol. 22: 284-289.
- Rivera-Bustamante, R.F.; Muñoz-Sánchez, C.I.; González-Chavira, M.M.; Cruz-Hernandez, A.; Guevara-González, R.G. Expression of a germin-like protein gene (*CchGLP*) from a geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2012**, 78, 45–50.
- Ross, AF. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infection of plants. *Virology* 14:340-358.
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ. *WRKY* transcription factors. *Trends plant sci.* 2010;15:247-258.
- Ryals, J., Ward, E. and Métraux, J. P. (1992). Systemic acquired resistance: An inducible defense mechanism in plants. *Inducible plant proteins: Their Biochemistry and Molecular Biology*, J. L. Wray, ed (Cambridge, U.K.: Cambridge University Press), pp 205-229.
- Ryals, J.A., Neuenschwander U.H., Willits M.G., Molina A., Steiner H., and Hunt M. (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, 8:1809-1819.
- Sahebani, N.; Hadavi, N. Induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and related enzymes in tomato roots infected with root knot nematode (*M. javanica*) by several chemical and microbial elicitors. *Biocontrol. Sci. Technol.* **2009**, 19, 301–313.
- Saito K, Yonekura K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, Fernie AR. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. *Plant Physiol Biochem.* 2013;72:21-34.
- Sibanda, T.; Okoh, A.I. *In vitro* evaluation of interactions between acetone extracts of *Garcinia kola* seeds and some antibiotics. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, 7, 1672–1678.
- Singh K1, Kumar S, Rani A, Gulati A, Ahuja PS. Phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and cinnamate 4-hydroxylase (*C4H*) and catechins (flavan-3-ols) accumulation in tea. *Funct Integr Genomics.* 2009;9:125-134.
- Soares AMS, Souza TF, Jacinto T, Tavares OL. Effect of Methyl Jasmonate on antioxidative enzyme activities and on the contents of ROS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Ricinus communis* leaves. *Braz. J. Plant Physiol.* 2010; 22: 151-158.
- Somssich, I., K. Hahlbrock, (1998). Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.*, 3, 86–90.
- Song J, Wang Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep.* 2009;36:939-952.
- Staswick, PE; Lehman, CC. (2000). Jasmonic acid-signaled responses in plants. *In* Induced plant defenses against pathogens and herbivores: Biochemistry, Ecology and Agriculture. Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Eds. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. p. 117-136.
- Structural similarity to early developmental lignin. *Plant Physiol* 108, 1277-1287.
- Taíz, L; Zeiger, E. (2007). Fisiología vegetal. 3ra Edición. Vol. 1. ISBN:978-84-8021-601-2.

- Tanabe, S.; Hayashi, N.; Nishizawa, Y.; Yamane, H.; Shibuya, N.; Minami, E. Elicitor and catalase activity of conidia suspensions of various strains of *Magnaporthe grisea* in suspensions-cultured cells of rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 889–892.
- Tester, M., and Bacic A. (2005). Abiotic stress tolerance Grasses. From Model Plants to Crop Plants. *Plant Physiology*, 137:791-793.
- Thakur, RP. (2007). Host Plant Resistance to Diseases: Potential and Limitations. *Indian Journal of Plant Protection*. Vol. 35 No. 1: 17-21.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., J. A., Brown, Becerra-Flora, A., y Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2006;44:135-162.
- Vergara-Castañeda, H.A., Guevara-González, R.G, Ramos-Gómez, M., Reynoso-Camacho, R., Guzmán-Maldonado, H., Feregrino-Pérez, A.A., Oomah, B.D., and Loarca-Piña, G. 2010. Non-digestible fraction of cooked bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Bayo Madero suppresses colonic aberrant crypt foci in azoxymethane-induced rats. *Food Funct.* 1(3):294-300.
- Vimala, R.; Suriachandraselvan, M. Induced resistance in bhendi against powdery mildew by foliar application of salicylic acid. *J. Biopesticides* **2009**, *2*, 111–114.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. 2009. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177–206.
- Whitham, S; Dinesh-Kumar, SP; Choi, D; Hehl, R; Corr, C; Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115.
- Willekens, H.; Langebartelst, C.; Tiré, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; van Camp, W. Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *EMBO J.* **1994**, *16*, 4806–4816.
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM. (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: What's in a name? *Annu Rev Phytopathol*, 40:251-285.
- Xing Y, Jia W, Zhang J. AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of *CAT1* catalase by triggering H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2007;58:2969-2981.
- Xiong, L. and Zhu J. K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 25:131–139.
- Xu, M.; Dong, J. O<sub>2</sub>– from elicitor-induced oxidative burst is necessary for triggering phenylalanine ammonia-lyase activation and catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36*, 280–284.
- Yalpani, N., Silverman, P., Wilson, T. M. A., Kleier, D. A. and Raskin, I. (1991). Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell*, 3:809-818.

- Yang F, Li W, Jorgensen HJ. Transcriptional reprogramming of wheat and the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* during two phases of the compatible interaction. *PLoS One* 2013;8:1-30.
- Zhao J, Lawrence CD, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 2005;23:283-333.

## ANEXO I. PROTOCOLOS

### I-1. Extracción de ADN plasmídico

1. Con un palillo estéril se toma una colonia y se deposita en 5 mL de medio LB suplementado a 50 mg/L con kanamicina y/o ampicilina, según sea el caso, y se incuba a 37 °C con agitación de 250 rpm durante 14 a 16 horas.
2. Cosechar las células por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos. Realizar este paso hasta colectar todo el paquete celular del medio de cultivo en el mismo tubo, para obtener un mayor rendimiento del plásmido a extraer.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 100 µL de la solución 1 (ice-cold), realizando vórtex hasta obtener una mezcla homogénea.
4. Agregar 200 µL de la solución de lisis (solución 2), mezclar suavemente por inversión de los tubos de 5 a 6 veces e incubar a temperatura ambiente por no más de 5 minutos.
5. Para neutralizar la reacción anterior se adicionan 150 µL de la solución 3 y se mezcla por inversión de 5 a 6 veces. Nuevamente se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 13000 rpm durante 15 minutos.
6. Transferir el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico a un tubo limpio y estéril.
7. Para precipitar el ADN plasmídico, adicionar al sobrenadante dos volúmenes de isopropanol ( $\approx$  850 µL) y mezclar por inversión 5 veces. Dejar reposar por 5 min a T ambiente, pero para aumentar rendimiento, puede dejarse a -20°C o -70°C por 30 min.
8. Los tubos se centrifugan a 13000 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante por decantación.

9. Lavar la pastilla con 1000  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% realizando vórtex y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos. Decantar el etanol y secar la pastilla a temperatura ambiente.
10. Finalmente, resuspender la pastilla en 15-50  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y evaluar la calidad de la extracción en un gel de agarosa al 1 %. Almacenar el ADN plasmídico a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## I-2. Digestión con enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III para componentes virales de PepGMV

Para cada una de las siguientes reacciones, depositar los siguientes componentes en un tubo de PCR, mezclar ligeramente con la punta de la pipeta e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Analizar el producto de la digestión en un gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio.

1. Digestión con *Eco* RI de Promega, para componente A de PepGMVV.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua	16.3
Regulador [E 10X]	2
BSA acetilada [10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	0.2
ADN [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	1
<i>Eco</i> RI [10 U/ $\mu\text{L}$ ]	0.5
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>20</b>

2. Digestión con *Hind* III, para el componente B del PepGMV.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Agua	16.3
Regulador [H 10X]	2
BSA acetilada [10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	0.2
ADN [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	1
<i>Eco</i> RI [10 U/ $\mu\text{L}$ ]	0.5
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>20</b>

I-3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con enzima *Dream Taq* polimerasa de Thermo Scientific.

Mezcla de Reacción	1 Reacción
Regulador <i>Dream Taq</i> 10X	2.5 $\mu\text{L}$
dNTP [10 mM]	0.5 $\mu\text{L}$
Oligonucleotido sentido (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Oligonucleotido antisentido (10 $\mu\text{M}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
DNA [10 pg–1 $\mu\text{g}$ ]	1 $\mu\text{L}$
<i>Dream Taq</i> Polimerasa [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	0.2 $\mu\text{L}$
Agua	17.8 $\mu\text{L}$
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>

I-4. Preparación de partículas de tungsteno para la técnica de biobalística.

La técnica de preparación de los microproyectiles se llevó a cabo de acuerdo a Tomes y col., 1995, modificado por Cabrera y col. 1997; (CINVESTAV IPN UNIDAD IRAPUATO).

1. Se pesaron 60 mg. de partículas de tungsteno.
2. Se resuspendieron en 2 mL de HNO<sub>3</sub> 0.1N y sonicaron por 20 minutos.
3. Se centrifugó a 10 000 rpm. por 2 minutos.
4. Se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 2 mL de etanol concentrado, se sonicó brevemente.
5. Se centrifugó a 10 000 rpm. por 2 minutos.
6. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de agua des ionizada estéril.
7. se tomaron 4 alícuotas de tungsteno de 250 µL, las cuales se resuspendieron en 750 µl con agua des ionizada estéril en cada uno de los tubos.
8. La concentración final de tungsteno en cada uno de los tubos fue de 15 µg/µL.
9. Se almacenaron a -20°C.

#### **I-5. Protocolo de biobalística**

1. Mezclar por sonicación en un tubo eppendorf de 50 µL de la suspensión de micro partículas de tungsteno previamente recubiertas con el ADN viral.
2. Agregar los siguientes reactivos uno a uno y mezclaron bien entre cada adición:
  - a) 5 µg totales de ADN (2.5 µg/ µL de ADN digerido de cada componente viral).
  - b) 50 µL de cloruro de calcio 2.5 M.
  - c) 20 µL de espermidina 0.1 M.
3. Agitar (en vórtex) la mezcla durante 5 minutos.
4. Centrifugar de 5-10 seg a 12000 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante con micropipeta.

6. Agregar 140  $\mu$ L de Etanol al 70 % ayudando a la suspensión de micropartículas con la punta de una micropipeta, se sónico brevemente.
7. Centrifugar de 5-10 seg a 12000 rpm.
8. Eliminar el sobrenadante con micropipeta.
9. Agregar 50  $\mu$ L de Etanol absoluto y resuspender en el sonicador.
10. Se dio un pulso en el sonicador durante 10 seg 3 veces.
11. Aplicar 10  $\mu$ L de la suspensión de macropartículas sobre la membrana acarreadora.
12. Montar la boquilla de la cámara.
13. Proceder al disparo sobre la zona apical de la planta

#### I-6. Extracción de ADN genómico por el método de Dellaporta

Pesar aproximadamente 100mg de tejido vegetal:

1. Pulverizar en presencia del nitrógeno líquido.
2. Adicionar 0.5 mL del regulador de Dellaporta que consta de lo siguiente:

Solución	Concentración final	Para 50 mL
Tris-HCl pH 8.0	100 mM	0.6057 g
EDTA pH 8.0	5 mM	0.9306 g
NaCl	50 mM	1.461
$\beta$ -mercaptoeptanol	10 mM	355 $\mu$ L de $\beta$ -mercaptoeptanol al 98%
Aforar con agua destilada estéril		

3. Homogenizar mediante vórtex.
4. Adicionar 25 $\mu$ L de SDS 20X y se resuspendió por inversión.
5. Incubar a 65  $^{\circ}$ C durante 20 minutos.

6. Agregar 150  $\mu\text{L}$  de acetato de potasio a 5M y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos.
7. Centrifugar a 1200rpm por 10 minutos.
8. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo y agregar un volumen de isopropanol, dejar reposar en hielo durante 10 minutos.
9. Centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos
10. Eliminar el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada des ionizada estéril.

### **I-7. Extracción de ARN por el método del TRIZOL<sup>®</sup> Reagent**

Reactivos requeridos:

- Cloroformo
- Alcohol isopropílico
- Etanol al 75 % (en agua tratada con DEPC)
- Agua libre de RNasa o solución SDS 0.5 %

Para 50-100mg de tejido vegetal:

1. Pulverizar en presencia del nitrógeno líquido, en morteros totalmente estériles.
2. Colectar las muestras en tubos eppendorf.
3. Homogenizar las muestras (congeladas con nitrógeno líquido) con 1 ml del reactivo TRIZOL por cada 50-100 mg de tejido empleado. El volumen de la muestra no debe exceder el 10 % del volumen del TRIZOL.
4. Incubar las muestras homogenizadas a temperatura ambiente durante 5 minutos
5. Centrifugar las muestras homogenizadas a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C
6. Transferir el sobrenadante (fase acuosa) a un tubo nuevo e incubar a temperatura ambiente 5 minutos.

7. Agregar 200  $\mu$ L de cloroformo por 1 ml de TRIZOL empleado.
8. Agitar vigorosamente por inversión del tubo 15 segundos e incubar nuevamente de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa.
10. Transferir la primera fase (la fase acuosa) a un tubo nuevo y precipitar el ARN con 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico por cada mililitro de TRIZOL consumido, mezclar por inversión e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 12 000 rpm y 4 °C por 10 minutos. Remover el sobrenadante y lavar el pellet (RNA) con 1 ml de etanol al 75 % por cada mililitro de TRIZOL utilizado, mezclar con vórtex y centrifugar a 7 500 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
12. Dejar secar el ARN por no más de 10 minutos y disolver en agua libre de RNasas. Calentar 10 minutos a 55-60 °C y transferir inmediatamente a hielo. El ARN deberá ser almacenado a -70°C para evitar su degradación.

#### I-8. Tratamiento de ARN con DNasa de Promega

Componente de reacción	Cantidad
ARN	1 $\mu$ g
Regulador de reacción 10X con MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ L
DNasa I, libre de RNasa	1 U
Agua-DEPC	Ajustar a 10 $\mu$ L
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Incubar a 37°C por 30 min. Transcurrido el tiempo, adicionar 1  $\mu$ L de EDTA [50 mM] por cada 10  $\mu$ L de reacción, e incubar a 65°C por 10 min, para parar la reacción.

## I-9. Síntesis de ADNc con First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific

1. En un tubo de PCR

Componente de reacción	Cantidad
Oligo dT	1 $\mu$ L
ARN	1 $\mu$ g
Agua-DEPC	Ajustar a 11 $\mu$ L
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>11 <math>\mu</math>L</b>

Entre el agua y el ARN se debe ajustar el volumen final de reacción.

2. Mezclar suavemente con la punta de la pipeta e incubar a 65°C por 5 min. Pasar a hielo por 1 min y dar un pulso en la centrífuga. Adicionar:

Componente de reacción	Cantidad
Regulador de reacción 5X	4 $\mu$ L
Ribolock RNase Inhibitor [20 U/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L
dNTPs mix [10 mM]	2 $\mu$ L
M-Mulv Reverse transcriptase [20 U/ $\mu$ L]	2 $\mu$ L
<b>Volumen final de reacción</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

3. Mezclar suavemente y centrifugar.
4. Incubar a 37°C por 60 min.
5. Parar la reacción con calentamiento a 70°C por 5 min.

## I-10. Inoculación por bio-inyección de *C. annuum* L con *X. campestris* pv. vesicatoria

1. La bacteria se recuperó en placas con medio YPG sólido (Anexo II). Para lo cual, se transfirió una asada a medio líquido YPG (Anexo II) y se incubó a 25 °C por 18 h a 200 rpm.
2. El paquete celular se colectó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL estériles. Se centrifugó a 8,000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante con micropipeta.
3. Se resuspendió el paquete celular en 1.5 mL de CaCl<sub>2</sub> a 10 mM.
4. Con cada suspensión se hicieron diluciones decimales para el conteo de colonias, ajustando la concentración a  $5 \times 10^7$  UFC/mL.
5. Una vez que se tuvo la concentración adecuada se procedió a inocular las plantas, usando una jeringa para insulina. Se tomaron 80 µL de la suspensión celular y se inyectaron en la nervadura principal de la hoja y a la altura media del tallo, en volúmenes de 20 en 20 µL, hasta completar los 80 µL de inóculo. Se incluyó un control negativo, el cual contenía sólo CaCl<sub>2</sub>.
6. Una vez que la planta comenzó a presentar los síntomas típicos de la infección se realizó la recolección de tejido. El tejido consistió en hojas superiores e inferiores de la planta e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido.

## ANEXO II. SOLUCIONES

### II-1 TAE 50X (1 L)

Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M PH 8.0	100 mL

Aforar a 1 L con agua destilada.

### II-2 TAE 1X (100 mL)

TAE 50X	2 mL
Agua destilada	98 mL

### II-3 MOPS 10X

MOPS	41.8 g
Acetato de sodio 3M	16.6 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mL

Disolver el MOPS en 800 mL de agua destilada con DEPC y ajustar a pH 7.0 con NaOH 4N. Adicionar el acetato de sodio, el EDTA y aforar a 1 L con agua tratada con DEPC. Esterilizar por filtración y proteger de la luz.

#### **II-4 MOPS 1X**

MOPS 10X                      10 mL

Agua destilada con DEPC   90 mL

#### **II-5. Acetato de potasio 5M**

Disolver 49.07 gr de acetato de potasio 70mL de agua desionizada estéril, aforar a 100 mL.

#### **II-6 Agua-DEPC 0.01 % (v/v)**

Para preparar agua libre de RNasa, en un vaso de precipitado se adiciona 1 mL de dietilpirocarbonato (DEPC) se lleva a 1 L con agua destilada, se homogeniza toda la noche y se esteriliza al día siguiente.

#### **II-7 Etanol-DEPC 0.02 % (v/v)**

En un vaso de precipitado se adiciona 2 mL de dietilpirocarbonato (DEPC) se lleva a 1 L con agua destilada, se homogeniza por una hora y se esteriliza.

#### **II-8 Gel de agarosa 1.2 %**

Agarosa                      0.30 g

TAE 1X                      25 mL

Bromuro de etidio        0.5 µL

## II-9 Gel de agarosa desnaturalizante

Esta electroforesis se realiza con la finalidad de evaluar la calidad del ARN que se extrae. La electroforesis se realiza en un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2 % (W/V), para lo cual se requiere:

1. 0.96 g de agarosa
2. 8 mL MOPS 10X
3. 2.4 mL Formaldehído 37%
4. 69.6 mL de agua destilada estéril con DEPC

Se funde la agarosa en agua libre de ARNasa dejándose enfriar aproximadamente a 40°C adicionándose enseguida MOPS 10X, el formaldehido y 0.5 µL de bromuro de etidio. Se vació la agarosa en la cámara de electroforesis previamente tratada con Etanol-DEPC 0.2 %; una vez solidificada se adiciono el regulador de corrida MOPS 1X, se cargaron las muestras de ARN con puntas completamente estériles, el gel se corrió a 70 Volts por 30 minutos.

## II-10 Agar Luria Bertani [LB Agar]

Composición	Concentración final	Para 150 mL	Para 150 mL
		Agar LB	Caldo LB
Peptona de caseína	1 %	1.5 g	1.5 g
Extracto de levadura	0.5 %	0.75 g	0.75 g
NaCl	1 %	1.5 g	1.5 g
Agar bacteriológico	2 %	3 g	----

Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) por 15 min. Enfriar aproximadamente a 45°C. Si es necesario, agregar antibiótico, Ampicilina ó Kanamicina. Vaciar de

acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles, en condiciones de esterilidad y guardar las placas a 4 °C.

### II-11 Agar YPG

Composición	Concentración final	Para 300 mL	Para 300 mL
		Agar YPG	Caldo YPG
Peptona de caseína	2%	6 g	6 g
Extracto de levadura	0.3%	0.9 g	0.9 g
Glucosa	2%	6 g	6 g
Agar bacteriológico	1.5%	4.5 g	----

Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) por 15 min. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles, en condiciones de esterilidad y guardar las placas a 4 °C.

### II-12 Agar de papa dextrosa (PDA) marca DIBICO

Composición	Para 1L
	Agar PDA
Dxtrosa	20 g
Infusión de papa	4 g
Agar bacteriológico	15 g

Ajustar pH  $5.6 \pm 0.2$ . Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) por 15 min. Enfriar aproximadamente a 45°C. Vaciar de acuerdo a la técnica a seguir en cajas de Petri estériles, en condiciones de esterilidad y guardar las placas a 4 °C.

### II-13 Solución KNO<sub>3</sub> [200 ppm]

Esta solución se ocupó para pre-tratar las semillas de *C. annuum* L. con la finalidad de promover la germinación. Brevemente, disolver 200 mg de KNO<sub>3</sub> en 1 L de agua.

#### II-14 Solución nutritiva Steiner al 100 % (Steiner, 1984)

Composición	100 L	1 m <sup>3</sup>
Nitrato de calcio [Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O]	67.567 g	675.67 g
Sulfato de magnesio o sal de Epsom [MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O]	49.494 g	494.94 g
Nitrato de potasio [KNO <sub>3</sub> ]	35.679 g	356.79 g
Fosfato monopotásico [KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ]	30.728 g	307.28 g
Quelato de hierro [EDTA]	4.9 g	49 g
Sulfato de manganeso [MnSO <sub>4</sub> ]	0.606 g	6.06 g
Ácido bórico en polvo [H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ]	0.4 g	4 g
Sulfato de cobre [Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	0.026	0.26 g

De acuerdo al desarrollo fenológico de la planta, se recomienda: 25% para plántula, 50% para el desarrollo vegetativo, 75% para antesis (floración) y 100% para fructificación.

#### II-15 Soluciones de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN

##### a) Stock de AS [0.02 M]

Pesar 0.27624 g y disolver hasta un aforo de 100 mL de agua destilada. Calentar la solución a 35 °C para una mejor disolución. De esta solución stock 0.02 M (20 mM) hacer las diluciones correspondientes a 0.1 mM, 6.7 mM y 10 mM de AS, con la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$

### b) Peróxido de hidrógeno comercial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Se empleó peróxido de hidrógeno grado farmacéutico de la marca. De la presentación sabemos que cada 100 mL contiene 3.34 g de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que el volumen total del envase es de 420 mL. Por lo tanto, tiene una molaridad correspondiente a 0.9818 M, de acuerdo a los siguientes cálculos:

$$\left(\frac{1 \text{ mol H}_2\text{O}_2}{34.01 \text{ g H}_2\text{O}_2}\right) \left(\frac{3.34 \text{ g H}_2\text{O}_2}{100 \text{ mL H}_2\text{O}_2}\right) \left(\frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}}\right) = 0.9818 \text{ M}$$

Por lo tanto, sabiendo la molaridad se hicieron las diluciones correspondientes para las concentraciones 6 mM, 14 mM y 18 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$  a un volumen de aforo final de 100 mL. Tomando directo del envase un volumen de 611  $\mu$ L para 6 mM, 1.42 mL para 14 mM y 1.83 mL para 18 mM. Se recomienda preparar las soluciones en el momento en que se van a usar, para evitar la oxidación del peróxido de hidrógeno.

### c) Stock de Quitosan (QN)

Pesar 0.4 g de QN y disolver en 100 mL de medio ácido (99 mL H<sub>2</sub>O + 1 mL CH<sub>3</sub>-COOH), se llevó a agitación toda la noche hasta disolver. Quedando la concentración de la solución stock a 4000  $\mu$ g/mL. De esta solución stock se hicieron las diluciones correspondientes a 10  $\mu$ g/mL, 670  $\mu$ g/mL y 1000  $\mu$ g/mL de QN con la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , a un aforo final de 100 mL con agua destilada.

## II-16 Solución 1mg/mL DAB-MOPS [10 mM] pH 3.8

Pesar 0.21 g de MOPS y aforar a un volumen de 100 mL. Antes terminar con el aforo, disolver en la solución anterior 100 mg de DAB y ajustar pH a 3.8 con HCl concentrado.

## II-17 Regulador de fosfatos pH 7 [0.05 M] y de Boratos pH 8.8 [0.1 M]

Se prepararon de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbalch, que es una expresión utilizada en química para calcular el pH de una disolución reguladora, o tampón, a partir del pKa o el pKb (obtenidos de la constante de disociación del ácido o de la constante de disociación de la base) y de las concentraciones de equilibrio del ácido o base y de sus correspondientes base o ácido conjugado, respectivamente.

### a) Regulador de fosfatos pH 7 [0.05 M]

$$pH = pK_a + \log \frac{|Base|}{|Ácido|}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$7 = 7.21 + \log \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$7 - 7.21 = \log \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$-0.21 = \log \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$10^{-0.21} = \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$0.61659 = \frac{|K_2HPO_4|}{|KH_2PO_4|}$$

$$0.61659 (0.05 \text{ M } KH_2PO_4) = 0.05 \text{ M } K_2HPO_4$$

$$0.0308 \text{ M } KH_2PO_4 = 0.05 \text{ M } K_2HPO_4$$

Pesar 0.8709 g de  $K_2HPO_4$  y aforar a un volumen de 100 mL, junto con 0.419 g de  $KH_2PO_4$ .

**b) Regulador de fosfatos pH 7 [0.05 M]**

$$pH = pK_a + \log \frac{|Base|}{|Ácido|}$$

$$pH = pK_a + \log \frac{|Bórax Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

$$8.8 = 9.23 + \log \frac{|Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

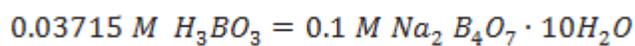
$$8.8 - 9.23 = \log \frac{|Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

$$-0.43 = \log \frac{|Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

$$10^{-0.43} = \frac{|Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

$$0.3715 = \frac{|Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O|}{|H_3BO_3|}$$

$$0.3715(0.1 \text{ M } H_3BO_3) = 0.1 \text{ M } (Na_2 B_4O_7 \cdot 10H_2O)$$



Pesar 95.34 g de Bórax y aforar a un volumen de 100 mL, junto con 5.74 g de  $H_3BO_3$ .

De acuerdo a la definición de molaridad:

$$M = \frac{mol}{L} = \frac{m/PM}{L} = \frac{m}{PM * V(L)}$$

$$m = M * PM * V$$

## II-18 Reactivo de Bradford 1X

100 mg/mL de Azul Brillante de Coomasie G-250 se disuelve en 50 mL de etanol (95%). A esta dilución se le adicionan 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v). La solución resultante se diluye llevándola a 1 L de volumen final. La concentración en la disolución final es 0.01% p/v de Azul Brillante de Coomasie G-250, 47% p/v de etanol y 8.5% de ácido fosfórico. Mezclar en un matraz volumétrico con agitación circular, hasta su disolución total. Almacenar en frasco ámbar a 4°C.

Composición	5X
Azul Brillante de Coomasie G-250	500 mg
Et-OH absoluto	250 mL
Ácido orto fosfórico 85%	500 mL
Agua destilada - Llevar a	1000 mL

### **II-19 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.022 M]**

A partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grado reactivo [8.8209 M] se preparó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [0.022 M] con la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , a un aforo final de 5 mL con agua destilada.

### **II-20 TCA [0.1 M]**

Pesar 1.6339 g de ácido tricloroacético y aforar a un volumen de 100 mL.

### **II-21 L-Fenilalanina [60 μM/mL]**

Pesar 0.16519 g de L-fenilalanina y aforar a un volumen final de 100 mL para preparar una solución stock 0.01 M ( $0.01 \times 10^6$  μM). La concentración de esta solución por mL es de 100 μM/mL. Por lo tanto, con la fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , se obtiene un volumen de 60 mL y se lleva a un aforo final de 100 mL para obtener la concentración de 60 μM/mL de L-Fenilalanina.

### **II-22 Solución de NaCO<sub>3</sub> al 20%**

Pesar 5 g de NaCO<sub>3</sub> y disolver en 20 mL de agua destilada, sonicar hasta disolver y aforar a 250 mL.

### **II-22 Solución 1 de extracción plasmídica**

Se prepara a partir de soluciones stock en lotes de 100 mL. Se esteriliza por 15 min a 15 lb de presión y se almacena a 4°C.

<b>Composición</b>	<b>Concentración</b>
Glucosa	5 <sup>o</sup> mM
Tris-HCl pH8	25 mM
EDTA pH 8	10 mM

### **II-23 Solución 2 de extracción plasmídica**

La solución resultante es 3 M respecto al potasio y 5 M respecto al acetato. La solución se almacena a 4°C y se coloca en hielo antes de usarse.

<b>Composición</b>	<b>Volumen</b>
Acetato de potasio 5M	60 mL
Ac. acético glacial	11.5 mL
Agua	28.5 mL

### **II-24 Solución 3 de extracción plasmídica**

Se utiliza a temperatura ambiente

<b>Composición</b>	<b>Concentración</b>
NaOH	0.2 N
SDS	1% (p/v)

## ANEXO III. ANÁLISIS DE VARIANZA INDICADORES FENOLÓGICOS

### III.1 Análisis de Varianza (ANOVA) variedad Don Pancho

#### a) Resumen de ajuste día cero-altura de la planta

Ajuste	Día cero	Día 42
R cuadrada	0.121006	0.369243
Ajuste de R cuadrada	0.022119	0.298282
Error de la raíz del cuadrado medio	2.87083	3.383785
Respuesta de la media	22.9	29.55556
Observaciones	90	90

#### b) ANOVA de altura de la planta, día cero ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	90.76667	10.0852	1.2237	0.2925
Error	80	659.33333	8.2417		
C. Total	89	750.1			

#### c) ANOVA de altura de la planta, día 42 ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	536.2222	59.5802	5.2035	<.0001
Error	80	916	11.45		

C. Total	89	1452.2222			
----------	----	-----------	--	--	--

**d) Resumen de ajuste día cero–diámetro inicial de la planta**

Ajuste	Día cero	Día 42
R cuadrada	0.249559	0.274933
Ajuste de R cuadrada	0.165135	0.193362
Error de la raíz del cuadrado medio	0.329498	0.391112
Respuesta de la media	3.298333	3.697778
Observaciones	90	90

**e) ANOVA diámetro de la planta, día cero ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	2.888361	0.320929	2.956	0.0044
Error	80	8.685489	0.108569		
C. Total	89	11.57385			

**f) ANOVA de diámetro de la planta, día 42 ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	4.640244	0.515583	3.3705	0.0015
Error	80	12.237511	0.152969		
C. Total	89	16.877756			

### III.2 Análisis de Varianza (ANOVA) variedad Don Benito

#### a) Resumen de ajuste día cero-altura inicial de la planta

Ajuste	Día cero	Día 42
R cuadrada	0.13437	0.246074
Ajuste de R cuadrada	0.036987	0.161257
Error de la raíz del cuadrado medio	3.009707	4.972424
Respuesta de la media	23.17778	30.26667
Observaciones	90	90

#### b) ANOVA de altura de la planta, día cero ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	112.48889	12.4988	1.3798	0.2112
Error	80	724.66667	9.0583		
C. Total	89	837.15556			

#### c) ANOVA de altura de la planta, día 42 ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	645.6	71.7333	2.9012	0.0051
Error	80	1978	24.725		
C. Total	89	2623.6			

**d) Resumen de ajuste día cero- diámetro inicial de la planta**

Ajuste	Día cero	Día 42
R cuadrada	0.321196	0.312922
Ajuste de R cuadrada	0.244831	0.235625
Error de la raíz del cuadrado medio	0.359639	0.444283
Respuesta de la media	3.140333	3.424
Observaciones	90	90

**e) ANOVA diámetro de la planta, día cero ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	4.89609	0.54401	4.206	0.0002
Error	80	10.3472	0.12934		
C. Total	89	15.24329			

**f) ANOVA de diámetro de la planta, día 42 ( $\alpha=0.05$ )**

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	7.191804	0.799089	4.0483	0.0003
Error	80	15.790956	0.197387		
C. Total	89	22.98276			

**ANEXO IV. TENDENCIAS DE INDICADORES OXIDATIVOS DEL ANÁLISIS  
EXPLORATORIO**

**IV.1 Tabla de tratamientos para análisis exploratorio de sólo una aplicación.**

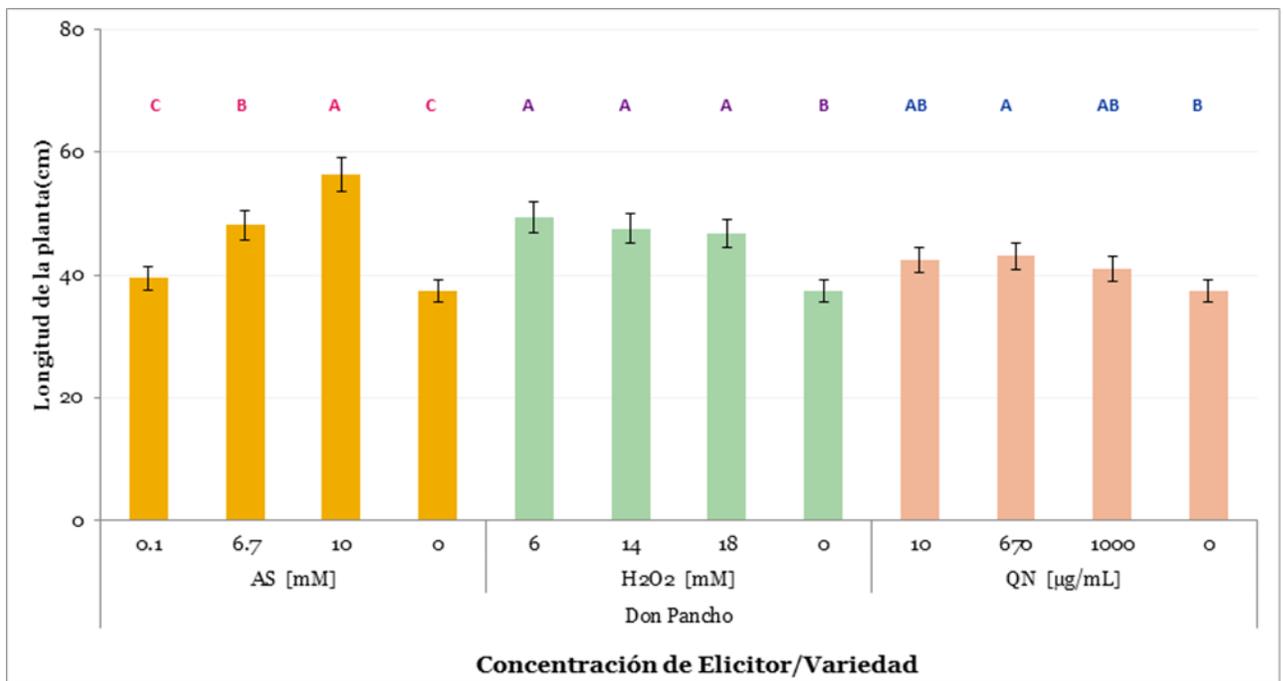
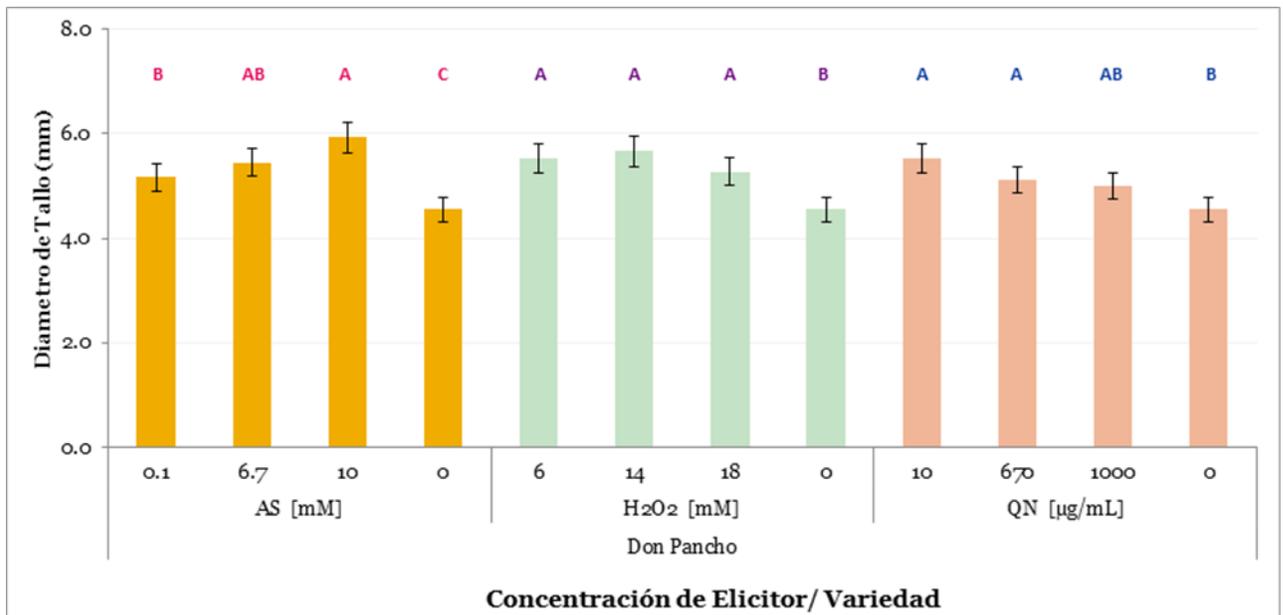
<b>Variedad</b>	<b>Elicitor</b>	<b>Concentración</b>	<b>Número de Plantas</b>	<b>Tiempo de muestreo</b>	
Don Pancho (P)	Control	Agua	10	0 2 min 1 h 2 h 4 h 6 h 8 h 12 h Día 1 Día 2 Día 3 Día 4 Día 5 Semana 1 Semana 2 Semana 3 Semana 4	
		0.1	10		
	AS [mM]	6.7	10		
		10	10		
		6	10		
		Peróxido [mM]	14		10
	QN [µg/mL]	18	10		
		10	10		
		670	10		
		1000	10		
	Don Benito (B)	Control	Agua		6
			0.1		6
AS [mM]		6.7	6		
		10	6		

Continuación Tabla anterior.

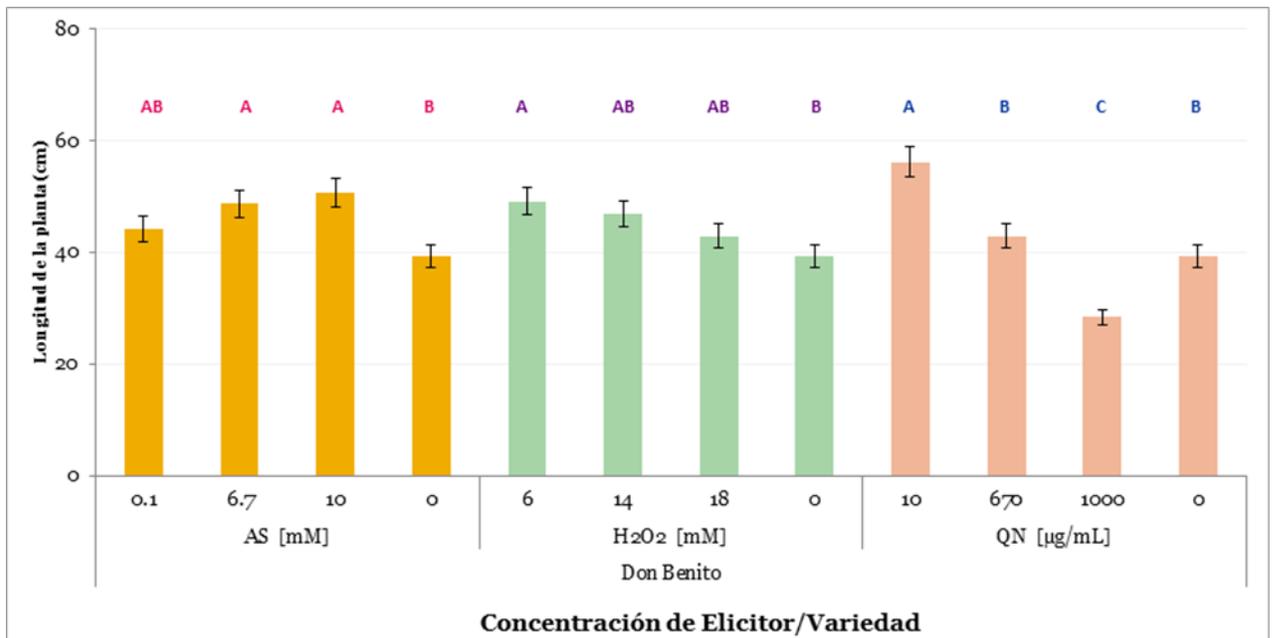
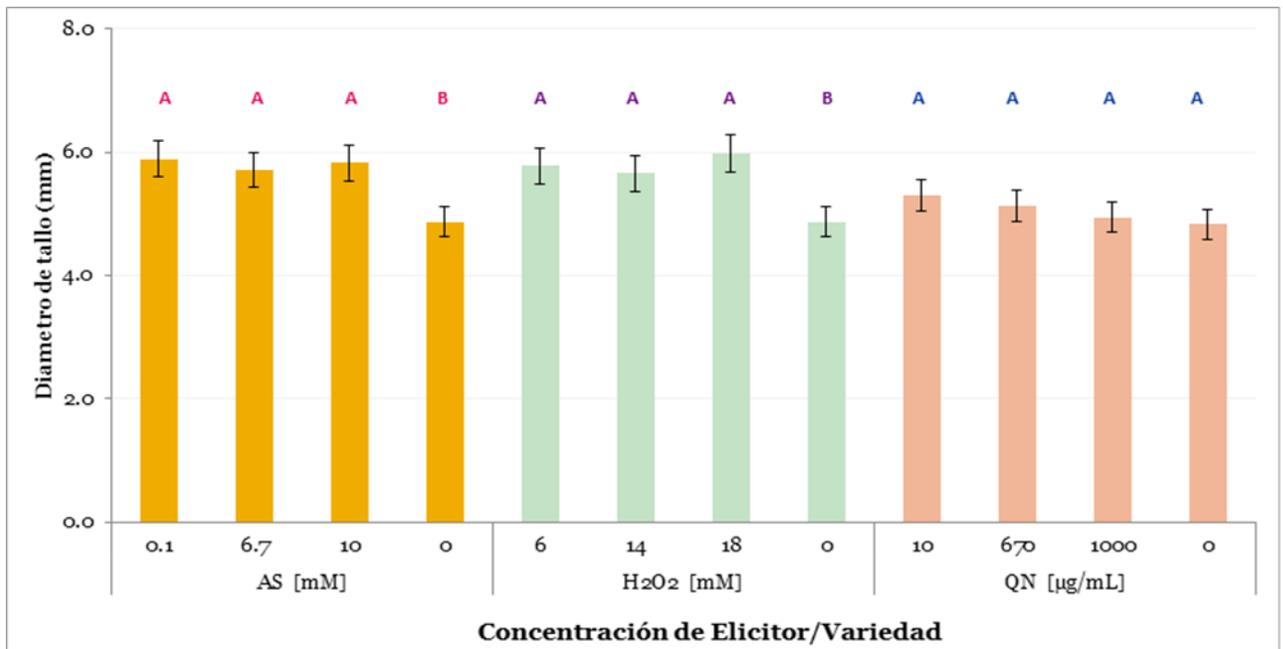
Variedad	Elicitor	Concentración	Número de Plantas	Tiempo de muestreo
Don Benito (B)	Peróxido [mM]	6	6	El mismo tiempo de muestreo que se aprecia en la primera parte de la tabla
		14	6	
		18	6	
	QN [µg/mL]	10	6	
		670	6	
		1000	6	

#### IV.2 Gráficas de diámetro y altura de la planta en ambas variedades de *C. annuum* L.

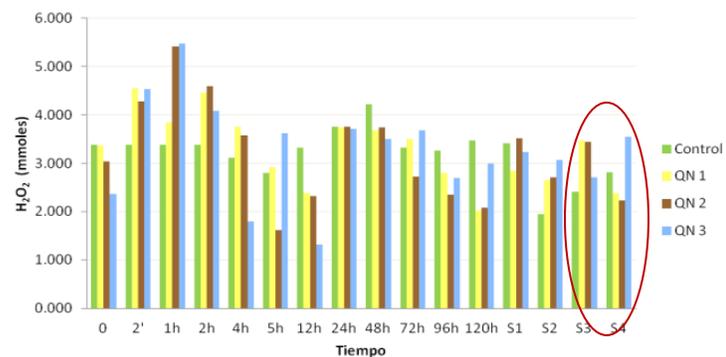
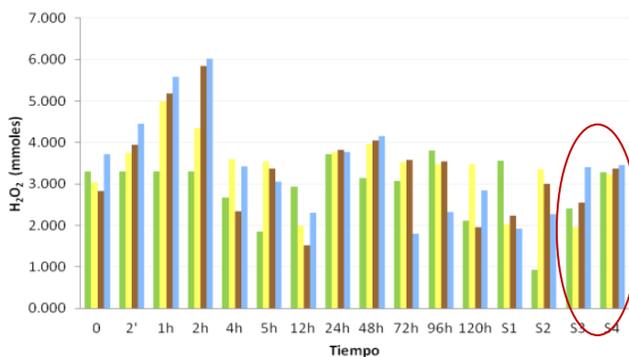
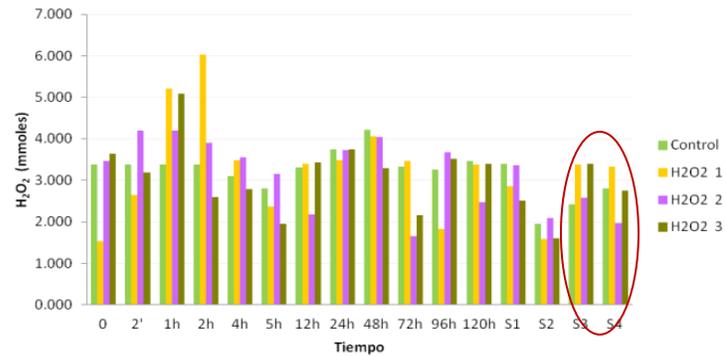
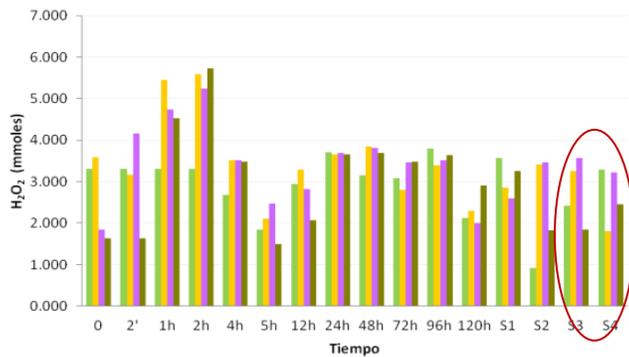
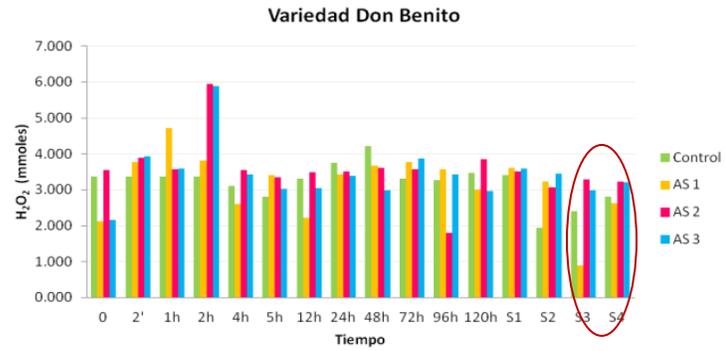
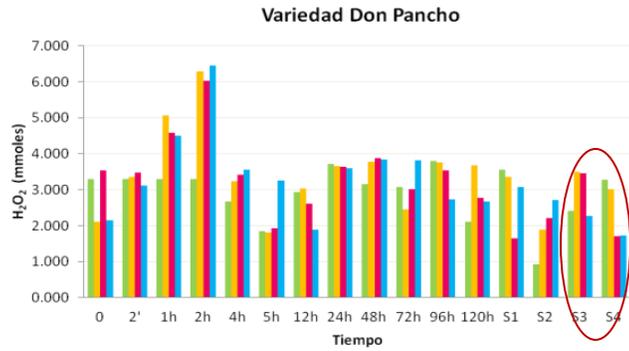
##### a) Grafica de diámetro y altura de la planta variedad Don Pancho



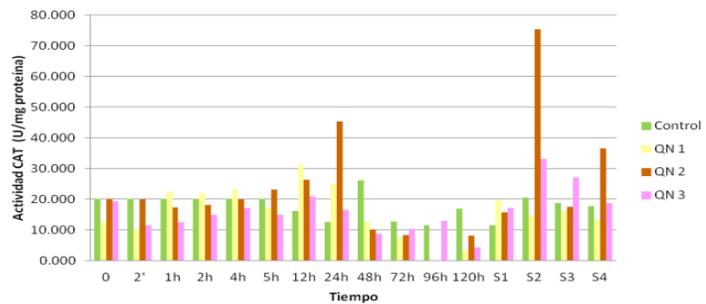
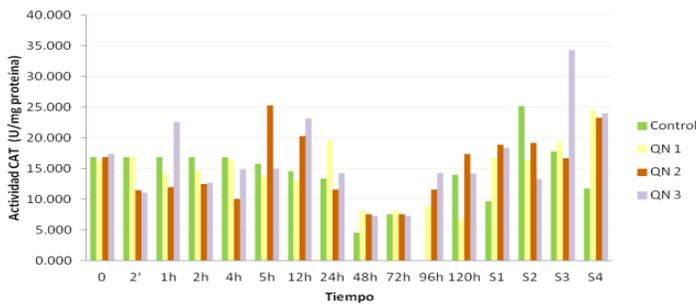
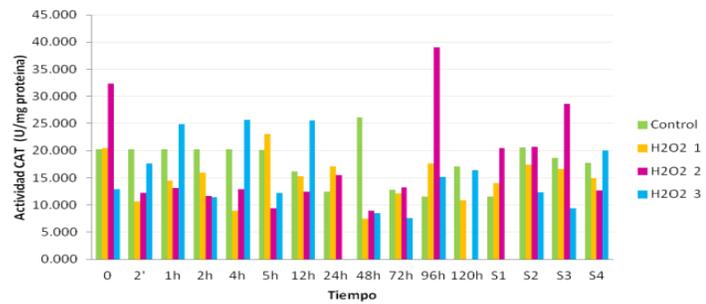
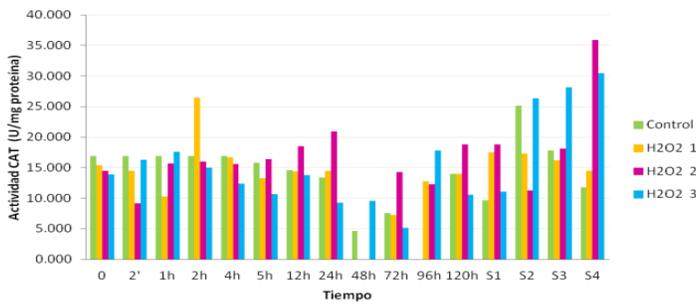
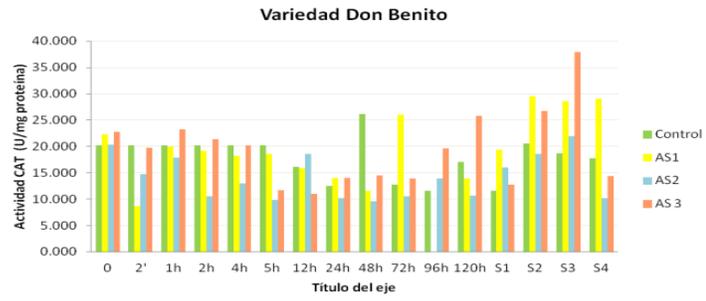
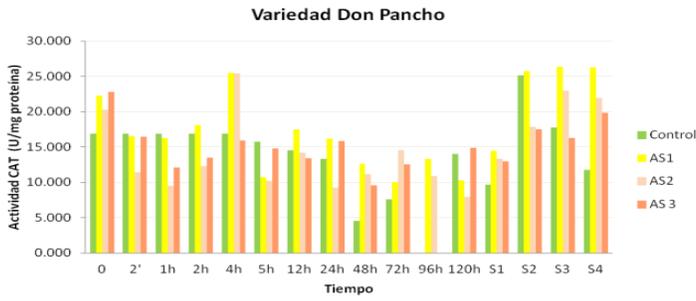
**b) Grafica de diámetro y altura de la planta variedad Don Benito**



## IV.2 Tendencia de contenido de Peróxido de Hidrógeno en ambas variedades de *C. annuum* L. por efecto de la aplicación de elicitors.



### IV.3 Tendencia de actividad catalasa en ambas variedades de *C. annuum* L. por efecto de la aplicación de elicitores.



**ANEXO V. ANÁLISIS DE VARIANZA DE CONTENIDO DE PERÓXIDO Y  
ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE *C. annuum* L.**

**V.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
variedad Don Benito**

a) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.529894
Ajuste de R cuadrada	0.375368
Error de la raíz del cuadrado medio	1.143805
Respuesta de la media	3.250413
Observaciones	288

b) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Ácido salicílico variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	318.53024	4.48634	3.4292	<.0001
Error	216	282.59053	1.30829		
C. Total	287	601.12077			

c) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.673557
Ajuste de R cuadrada	0.566254
Error de la raíz del cuadrado medio	0.942404
Respuesta de la media	3.224699

Observaciones	288
---------------	-----

d) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	395.8172	5.57489	6.2771	<.0001
Error	216	191.83497	0.88812		
C. Total	287	587.65218			

e) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quitosán

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.563185
Ajuste de R cuadrada	0.419602
Error de la raíz del cuadrado medio	1.065149
Respuesta de la media	3.027274
Observaciones	288

f) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quitosán variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	315.95687	4.4501	3.9224	<.0001
Error	216	245.06093	1.13454		
C. Total	287	561.0178			

## V.2 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de actividad CAT

a) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.97636
Ajuste de R cuadrada	0.953047
Error de la raíz del cuadrado medio	48.60681
Respuesta de la media	525.7484
Observaciones	144

b) ANOVA producción de actividad CAT–Ácido salicílico variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	7025551.3	98951.4	41.882	<.0001
Error	72	170108.8	2362.6		
C. Total	143	7195660.1			

c) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.973691
Ajuste de R cuadrada	0.947747
Error de la raíz del cuadrado medio	52.05859
Respuesta de la media	515.0627
Observaciones	144

d) ANOVA producción de actividad CAT–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	7221538.1	101712	37.5307	<.0001
Error	72	195126.9	2710		
C. Total	143	7416665.1			

e) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–Quitosán

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.921139
Ajuste de R cuadrada	0.843373
Error de la raíz del cuadrado medio	89.35192
Respuesta de la media	536.385
Observaciones	144

f) ANOVA actividad CAT–Quitosán variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	6714325	94568	11.845	<.0001
Error	72	574831.1	7983.8		
C. Total	143	7289156.1			

### V.3 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de actividad PAL variedad Don Benito

a) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.718138
Ajuste de R cuadrada	0.625489
Error de la raíz del cuadrado medio	2.960139
Respuesta de la media	10.27427
Observaciones	288

b) ANOVA producción de actividad PAL–Ácido salicílico variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	4822.2415	67.9189	7.7512	<.0001
Error	216	1892.6838	8.7624		
C. Total	287	6714.9252			

c) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.799844
Ajuste de R cuadrada	0.734052
Error de la raíz del cuadrado medio	2.544132
Respuesta de la media	9.618333
Observaciones	288

d) ANOVA producción de actividad PAL–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	5586.889	78.6886	12.1572	<.0001
Error	216	1398.0828	6.4726		
C. Total	287	6984.9718			

e) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–Quitosán

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.852614
Ajuste de R cuadrada	0.804167
Error de la raíz del cuadrado medio	2.338086
Respuesta de la media	10.1958
Observaciones	288

f) ANOVA actividad PAL–Quitosán variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	6830.7795	96.2082	17.5991	<.0001
Error	216	1180.7955	5.4666		
C. Total	287	8011.575			

#### V.4 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Pancho

a) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.715618
Ajuste de R cuadrada	0.622141
Error de la raíz del cuadrado medio	0.851361
Respuesta de la media	3.36581
Observaciones	288

b) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Ácido salicílico variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	393.9682	5.54885	7.6555	<.0001
Error	216	156.56018	0.72482		
C. Total	287	550.52839			

c) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.742859
Ajuste de R cuadrada	0.658335
Error de la raíz del cuadrado medio	0.867019
Respuesta de la media	3.340021
Observaciones	288

d) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	469.07801	6.60673	8.7888	<.0001
Error	216	162.37188	0.75172		
C. Total	287	631.44989			

e) Resumen de ajuste dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quitosán

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.742859
Ajuste de R cuadrada	0.658335
Error de la raíz del cuadrado medio	0.867019
Respuesta de la media	3.340021
Observaciones	288

f) ANOVA producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quitosán variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	469.07801	6.60673	8.7888	<.0001
Error	216	162.37188	0.75172		
C. Total	287	631.44989			

## V.5 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de actividad CAT variedad Don Pancho

a) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.887799
Ajuste de R cuadrada	0.777156
Error de la raíz del cuadrado medio	181.5596
Respuesta de la media	650.6619
Observaciones	144

b) ANOVA producción de actividad CAT–Ácido salicílico variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	18779647	264502	8.024	<.0001
Error	72	2373401	32964		
C. Total	143	21153047			

c) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.861583
Ajuste de R cuadrada	0.725089
Error de la raíz del cuadrado medio	166.0721
Respuesta de la media	595.0527
Observaciones	144

d) ANOVA producción de actividad CAT–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	12360428	174091	6.3122	<.0001
Error	72	1985755	27580		
C. Total	143	14346183			

e) Resumen de ajuste dinámica de actividad CAT–Quitosán

Ajuste	Var. Don Benito
R cuadrada	0.891286
Ajuste de R cuadrada	0.784081
Error de la raíz del cuadrado medio	133.4065
Respuesta de la media	597.2608
Observaciones	144

f) ANOVA actividad CAT–Quitosán variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	10505501	147965	8.3139	<.0001
Error	72	1281406	17797		
C. Total	143	11786907			

## V.6 Análisis de Varianza (ANOVA) de dinámica de actividad PAL variedad Don Pancho

a) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–Ácido salicílico

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.773901
Ajuste de R cuadrada	0.699581
Error de la raíz del cuadrado medio	3.049424
Respuesta de la media	11.97021
Observaciones	288

b) ANOVA producción de actividad PAL–Ácido salicílico variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	6875.0336	96.8315	10.4131	<.0001
Error	216	2008.5806	9.299		
C. Total	287	8883.6142			

c) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.780566
Ajuste de R cuadrada	0.708438
Error de la raíz del cuadrado medio	3.017711
Respuesta de la media	11.47431
Observaciones	288

d) ANOVA producción de actividad PAL–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	6997.058	98.5501	10.8219	<.0001
Error	216	1967.0206	9.1066		
C. Total	287	8964.0787			

e) Resumen de ajuste dinámica de actividad PAL–Quitosán

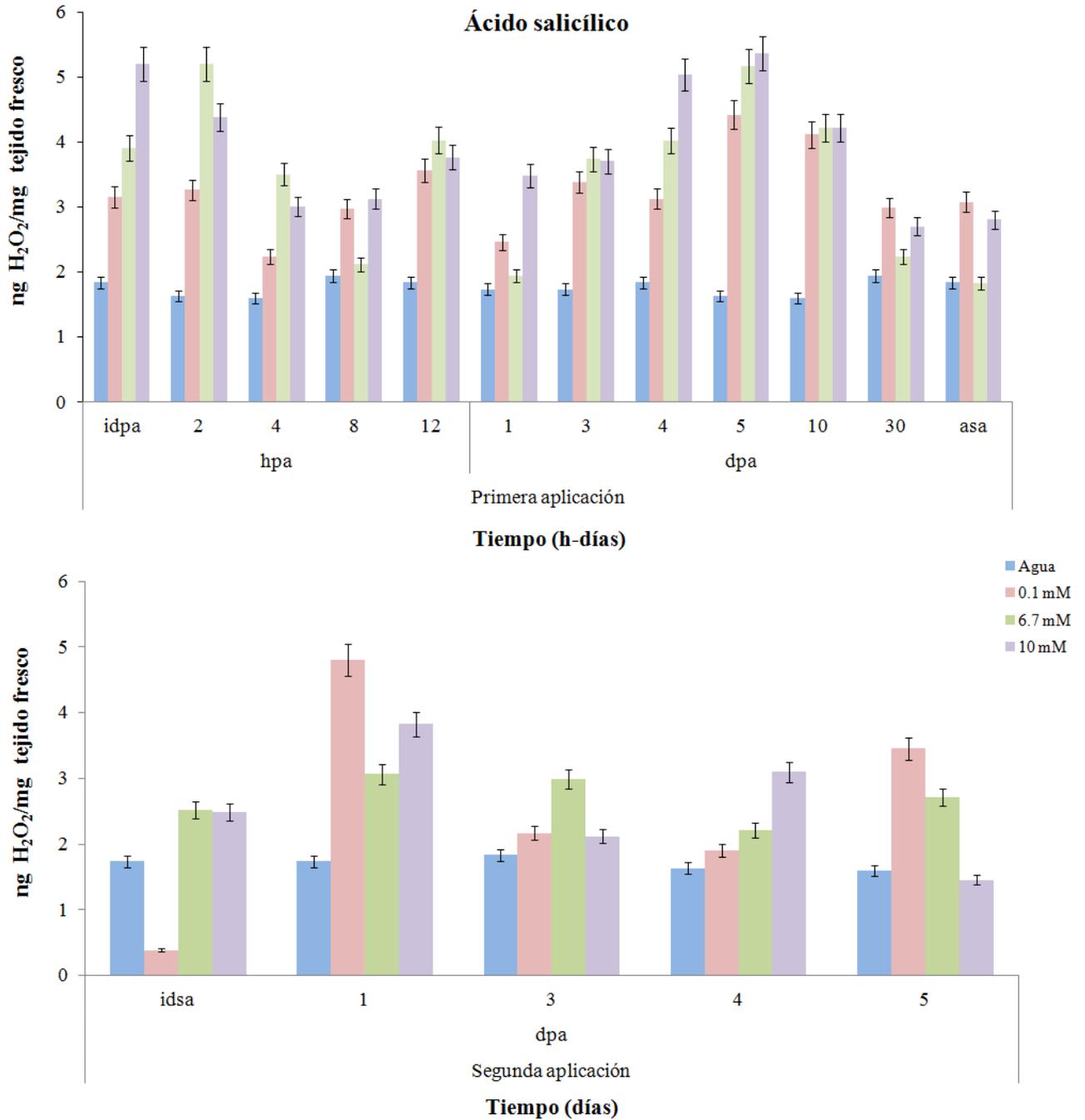
Ajuste	Var. Don Pancho
R cuadrada	0.781239
Ajuste de R cuadrada	0.709331
Error de la raíz del cuadrado medio	2.482069
Respuesta de la media	10.02872
Observaciones	288

f) ANOVA actividad PAL–Quitosán variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ )

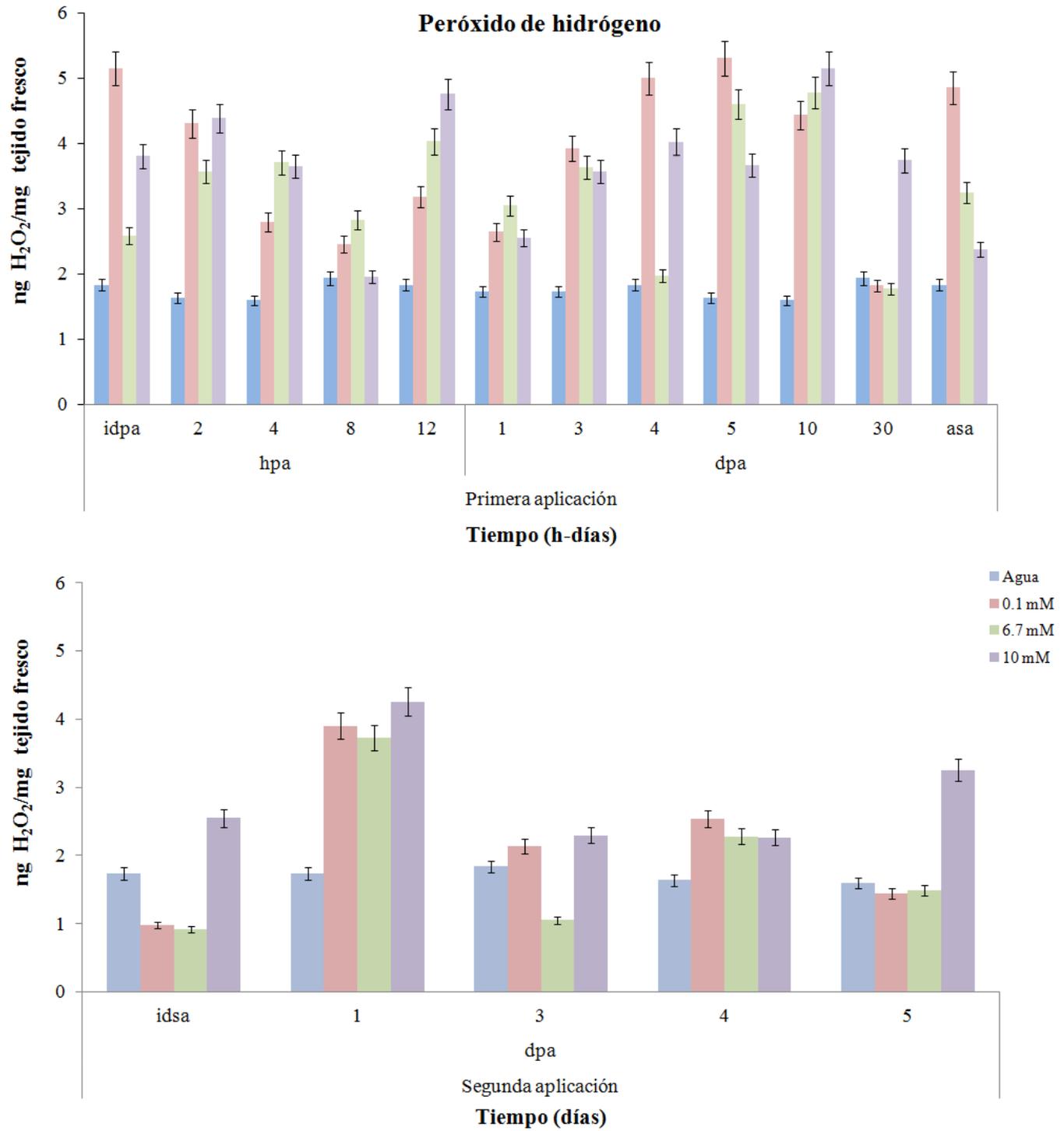
Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	71	4752.2002	66.9324	10.8645	<.0001
Error	216	1330.7042	6.1607		
C. Total	287	6082.9044			

## V.7 Comportamiento de la dinámica de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por efecto de la aplicación de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en variedad Don Pancho de *C. annuum* L.

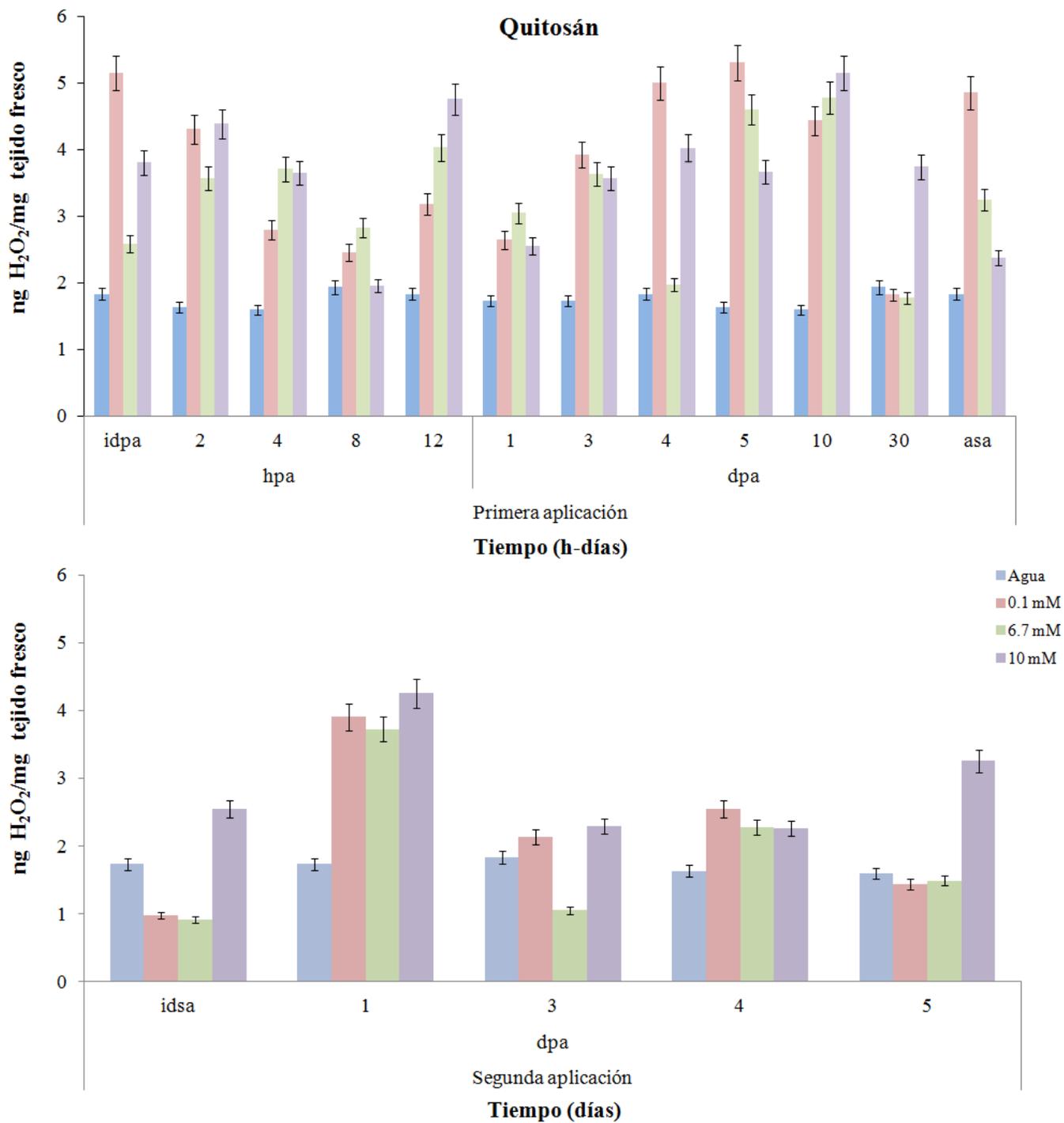
a) Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en variedad Don Pancho inducido por AS



b) Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en variedad Don Pancho inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

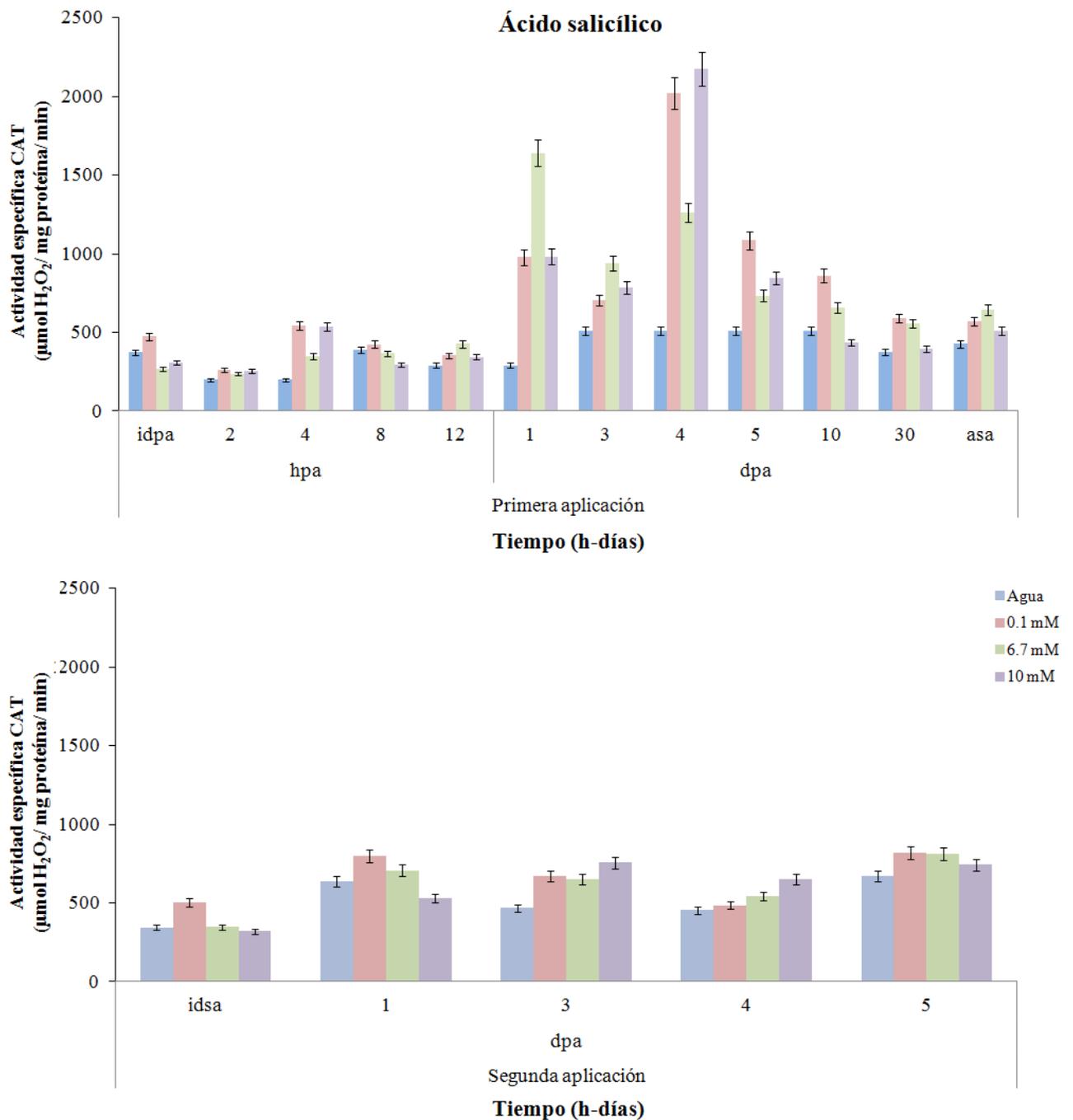


c) Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en variedad Don Pancho inducido por QN

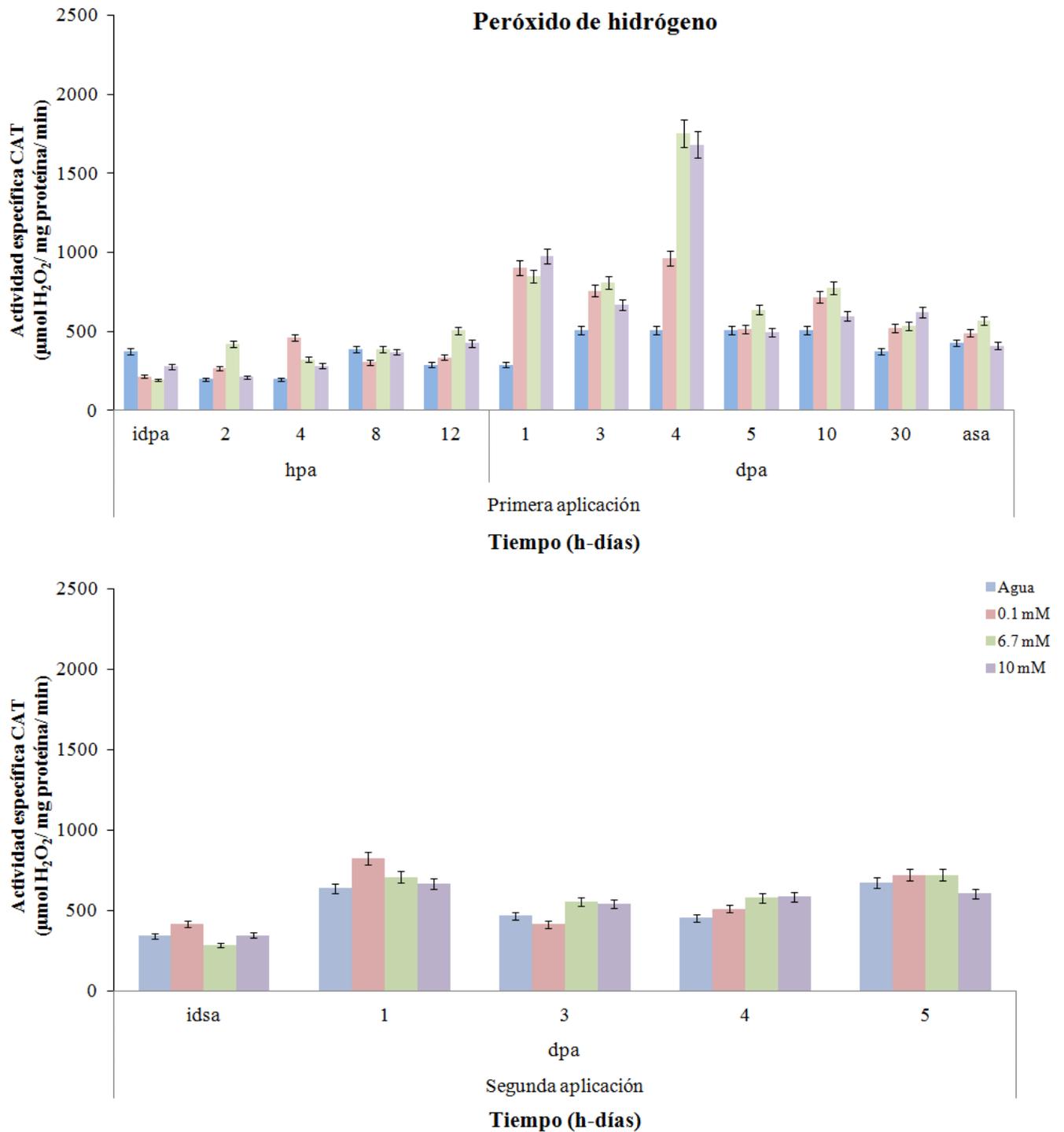


## V.8 Comportamiento de la dinámica de actividad catalasa (CAT) por efecto de la aplicación de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en variedad Don Pancho de *C. annuum* L.

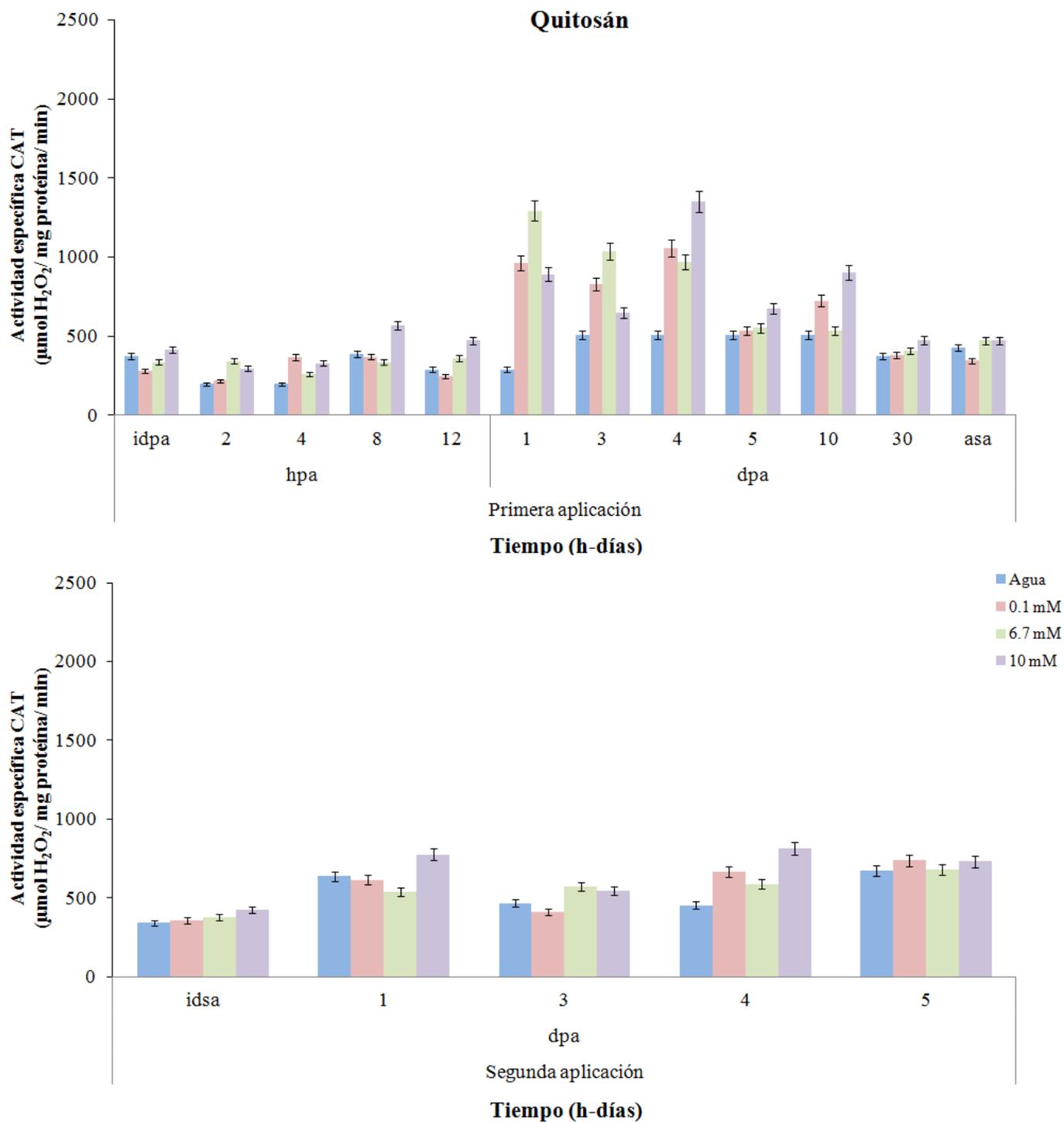
a) Actividad CAT en variedad Don Pancho inducida por AS



b) Actividad CAT en variedad Don Pancho inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

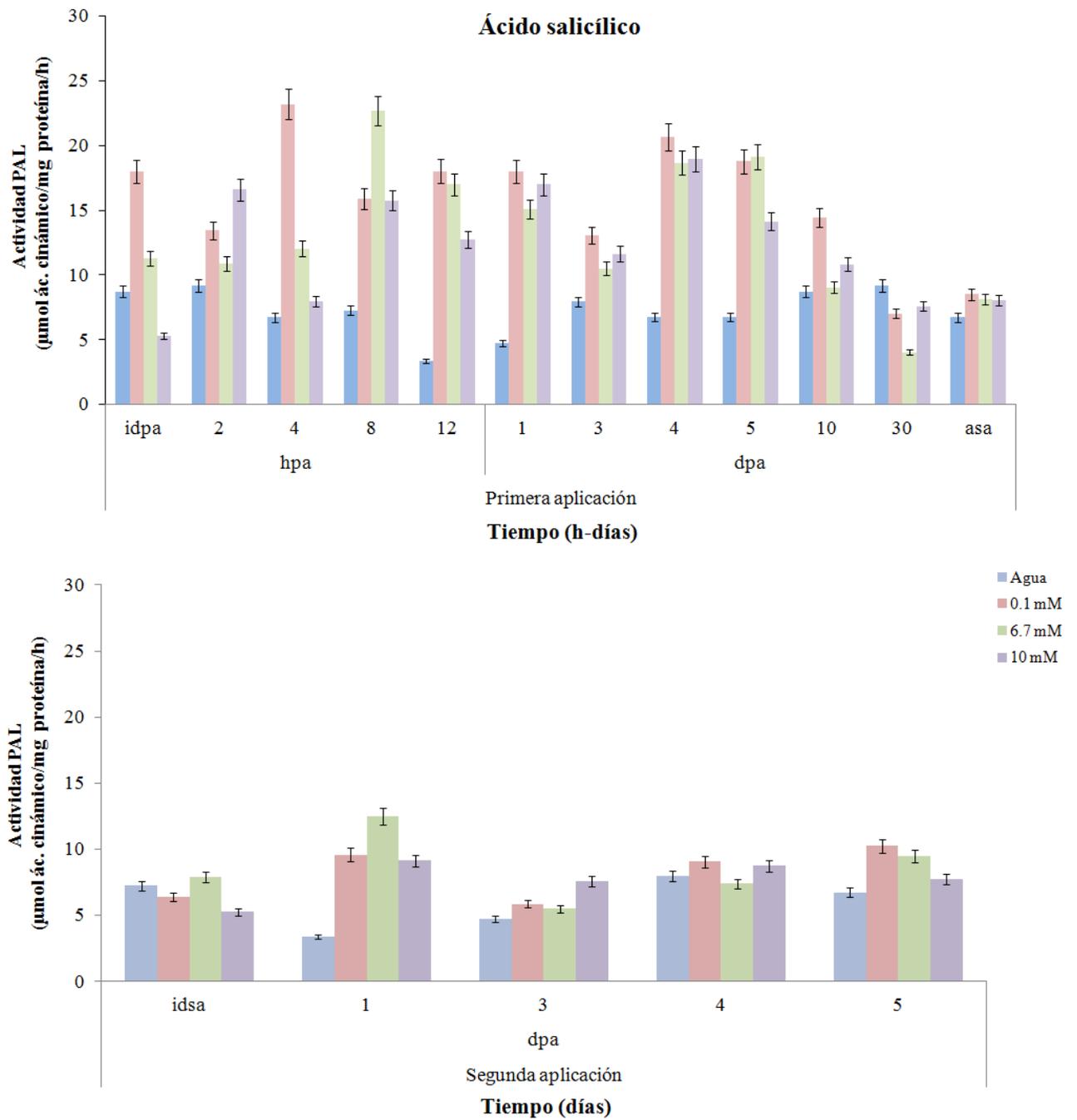


c) Actividad CAT en variedad Don Pancho inducida por QN



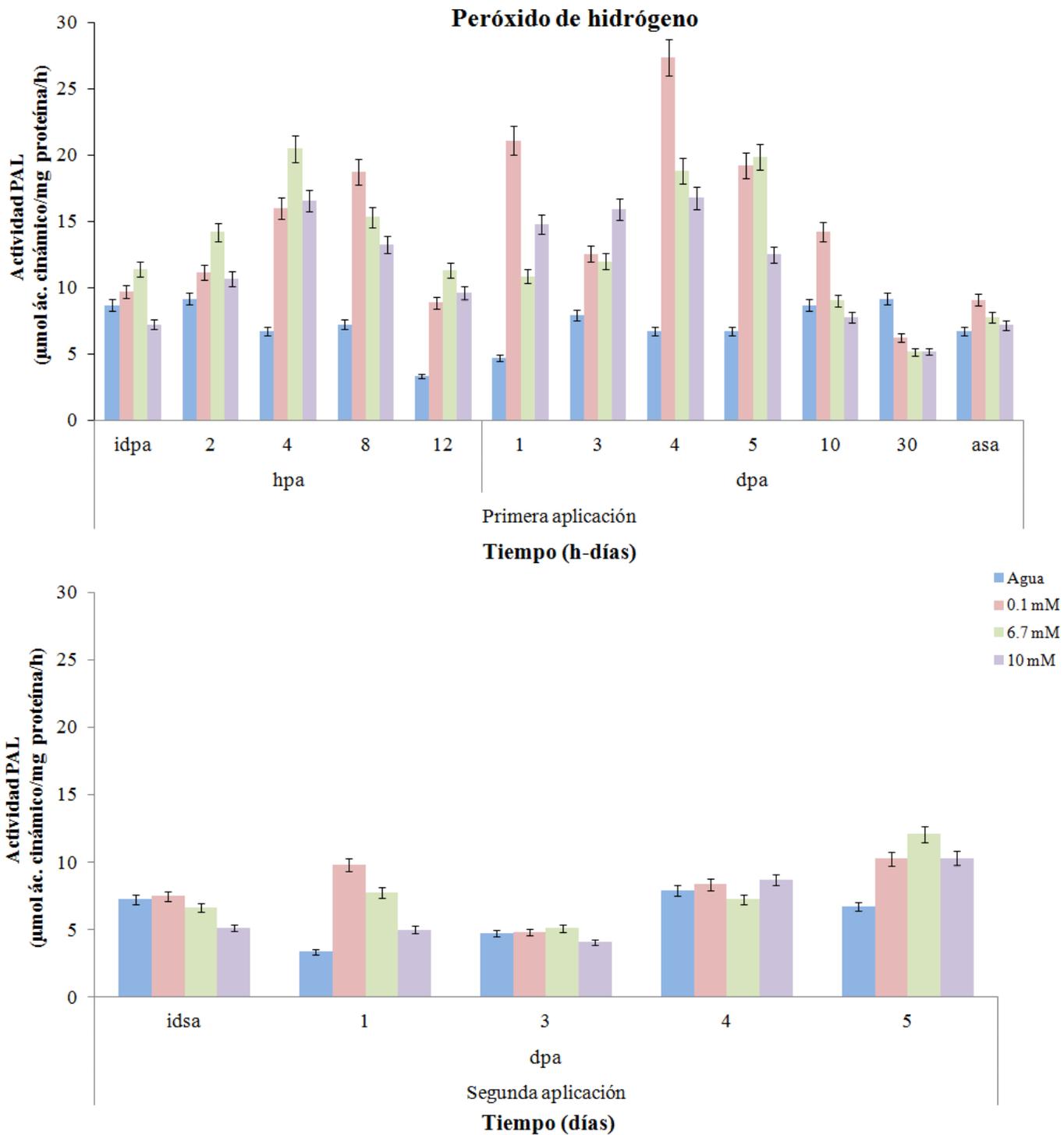
**V.9 Comportamiento de la dinámica de actividad fenilalana amonio liasa (PAL) por efecto de la aplicación de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y QN en variedad Don Pancho de *C. annuum* L.**

a) Actividad PAL en variedad Don Pancho inducida por AS

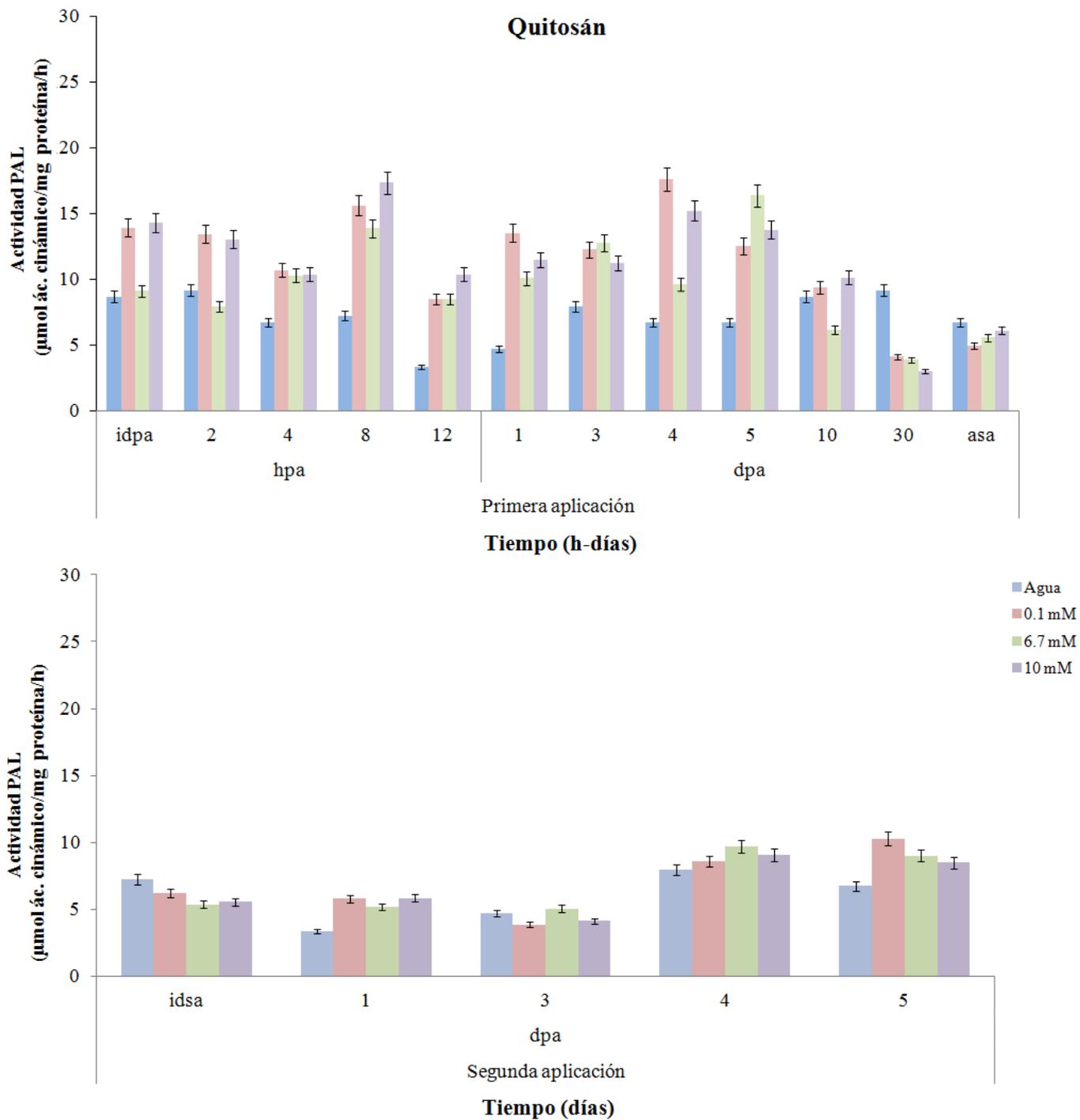




b) Actividad PAL en variedad Don Pancho inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



c) Actividad PAL en variedad Don Pancho inducida por QN



**ANEXO VI. ANÁLISIS DE VARIANZA DE CONTENIDO DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE *C. annuum* L.**

**VI.1 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido total de fenoles de la variedad Don Benito.**

a) Resumen de ajuste de contenido de fenoles totales, variedad Don Benito.

Resumen de ajuste	Periodo analizado			
	2 h	5 dpa	42* dpa	42** dpa
R cuadrada	0.856429	0.981523	0.700402	0.988677
Ajuste de R cuadrada	0.791822	0.973208	0.565583	0.983582
Error de la raíz del cuadrado medio	13.25233	3.59163	21.04327	7.047976
Respuesta de la media	222.1858	194.6448	198.2787	182.9781
Observaciones	30	30	30	30

b) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a las 2 h, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	20952.637	2328.07	13.256	<.0001
Error	20	3512.484	175.62		
C. Total	29	24465.121			

c) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 5 dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	13704.905	1522.77	118.0458	<.0001	13704.905
Error	257.996	12.9			257.996
C. Total	13962.901				13962.901

d) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 42\* dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	20704.528	2300.5	5.1951	0.0011
Error	20	8856.385	442.82		
C. Total	29	29560.913			

e) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 42\*\* dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	10	87659.66	8765.97	176.47	<.0001
Error	20	993.479	49.67		

C. Total	30	88653.14			
----------	----	----------	--	--	--

**VI.2 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido total de fenoles de la variedad Don Pancho.**

a) Resumen de ajuste de contenido de fenoles totales.

Resumen de ajuste	Periodo analizado			
	2 h	5 dpa	42* dpa	42** dpa
R cuadrada	0.856429	0.981523	0.700402	0.988677
Ajuste de R cuadrada	0.791822	0.973208	0.565583	0.983582
Error de la raíz del cuadrado medio	13.25233	3.59163	21.04327	7.047976
Respuesta de la media	222.1858	194.6448	198.2787	182.9781
Observaciones	30	30	30	30

b) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a las 2 h, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	59797.296	6644.14	4.9608	0.0014
Error	20	26786.797	1339.34		
C. Total	29	86584.093			

c) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 5 dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	45873.99	5097.11	56.9414	<.0001
Error	20	1790.301	89.52		
C. Total	29	47664.292			

d) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 42\* dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

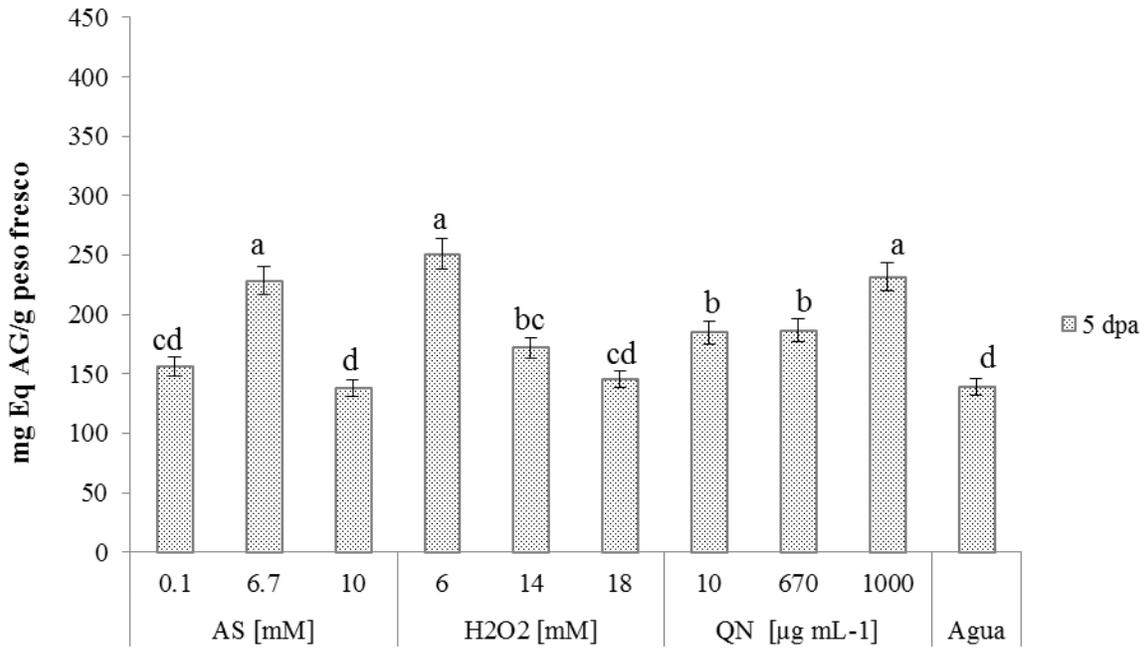
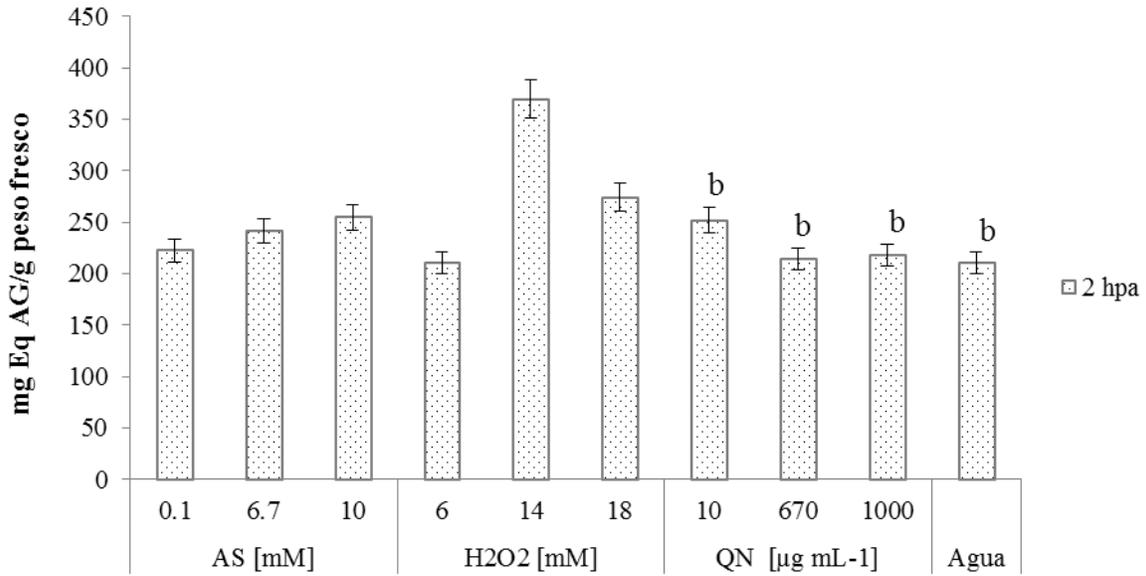
Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	21460.9	2384.54	33.4087	<.0001
Error	20	1427.497	71.37		
C. Total	29	22888.398			

e) ANOVA contenido total de fenoles por tratamiento a los 42\*\* dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

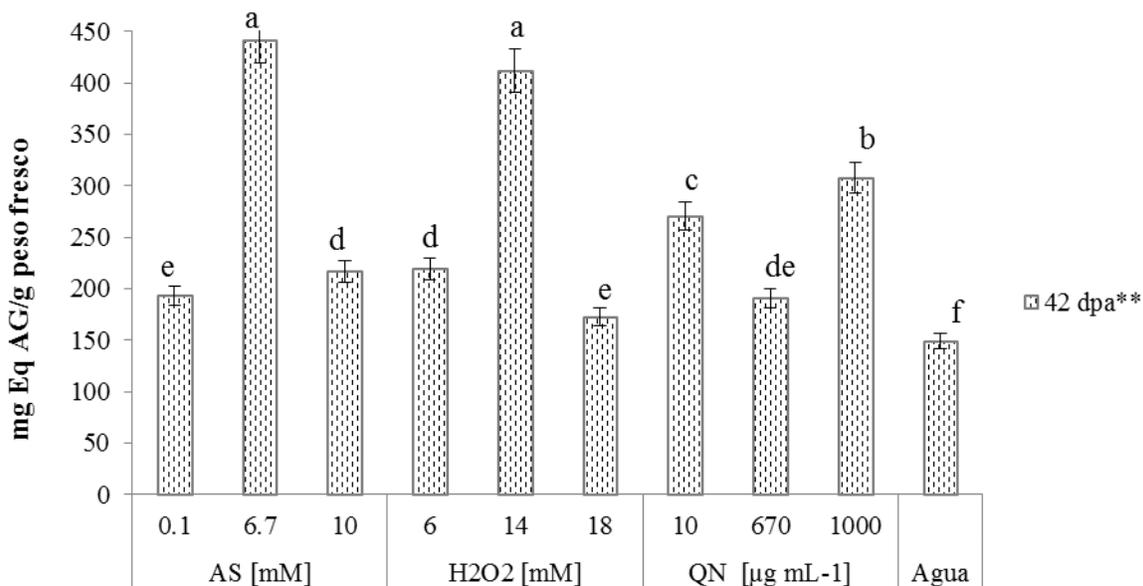
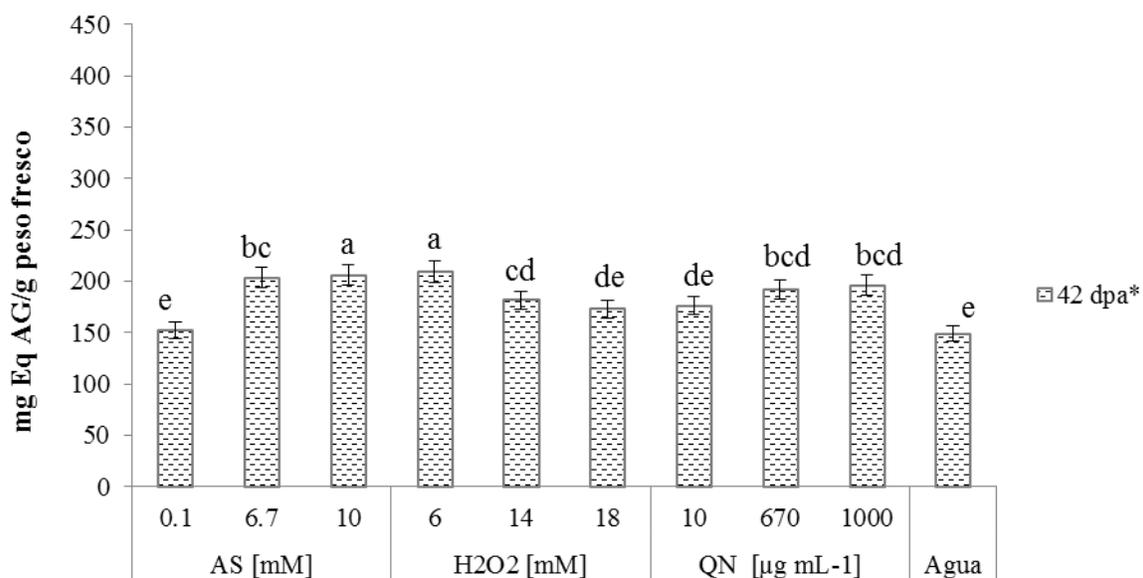
Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	273878.98	30431	406.5945	<.0001
Error	20	1496.87	74.8		

C. Total	29	275375.85			
----------	----	-----------	--	--	--

f) Gráfica de contenido de fenoles a las 2 hpa y al 5 dpa en variedad Don Pancho.



g) Gráfica de contenido de fenoles al 42 dpa antes y después de la segunda aplicación de elicitors, en variedad Don Pancho.



**VI.3 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido total de flavonoides de la variedad Don Benito y Don Pancho, por tratamientos 2 hpa.**

a) Resumen de ajuste de contenido de flavonoides totales, variedad Don Benito.

Resumen de ajuste	Periodo analizado			
	2 h	5 dpa	42* dpa	42** dpa
R cuadrada	0.632885	0.833036	0.89865	0.913605
Ajuste de R cuadrada	0.467683	0.757902	0.853042	0.874727
Error de la raíz del cuadrado medio	3.015164	0.784826	0.699205	0.633468
Respuesta de la media	18.7572	12.3027	10.3844	9.959433
Observaciones	30	30	30	30

b) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a las 2 h, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	313.45403	34.8282	3.831	0.0059
Error	20	181.82424	9.0912		
C. Total	29	495.27827			

c) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 5 dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	61.463387	6.82927	11.0873	<.0001
Error	20	12.319027	0.61595		
C. Total	29	73.782414			

d) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 42\* dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	86.697087	9.63301	19.7039	<.0001
Error	20	9.777761	0.48889		
C. Total	29	96.474847			

e) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 42\*\* dpa, variedad Don Benito ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	84.869072	9.4299	23.4995	<.0001
Error	20	8.025631	0.40128		

C. Total	29	92.894703			
----------	----	-----------	--	--	--

**VI.4 Análisis de varianza (ANOVA) del contenido total de flavonoides de la variedad Don Pancho.**

a) Resumen de ajuste de contenido de flavonoides totales, variedad Don Pancho.

Resumen de ajuste	Periodo analizado			
	2 h	5 dpa	42* dpa	42** dpa
R cuadrada	0.337573	0.928739	0.716332	0.833341
Ajuste de R cuadrada	0.03948	0.896671	0.588682	0.758344
Error de la raíz del cuadrado medio	6.395462	0.772333	1.664195	0.97681
Respuesta de la media	18.57057	11.88547	12.09453	11.3205
Observaciones	30	30	30	30

b) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a las 2 h, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	416.8722	46.3191	1.1324	0.3862
Error	20	818.0386	40.9019		
C. Total	29	1234.9107			

c) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 5 dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	155.48192	17.2758	28.962	<.0001
Error	20	11.92996	0.5965		
C. Total	29	167.41187			

d) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 42\* dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

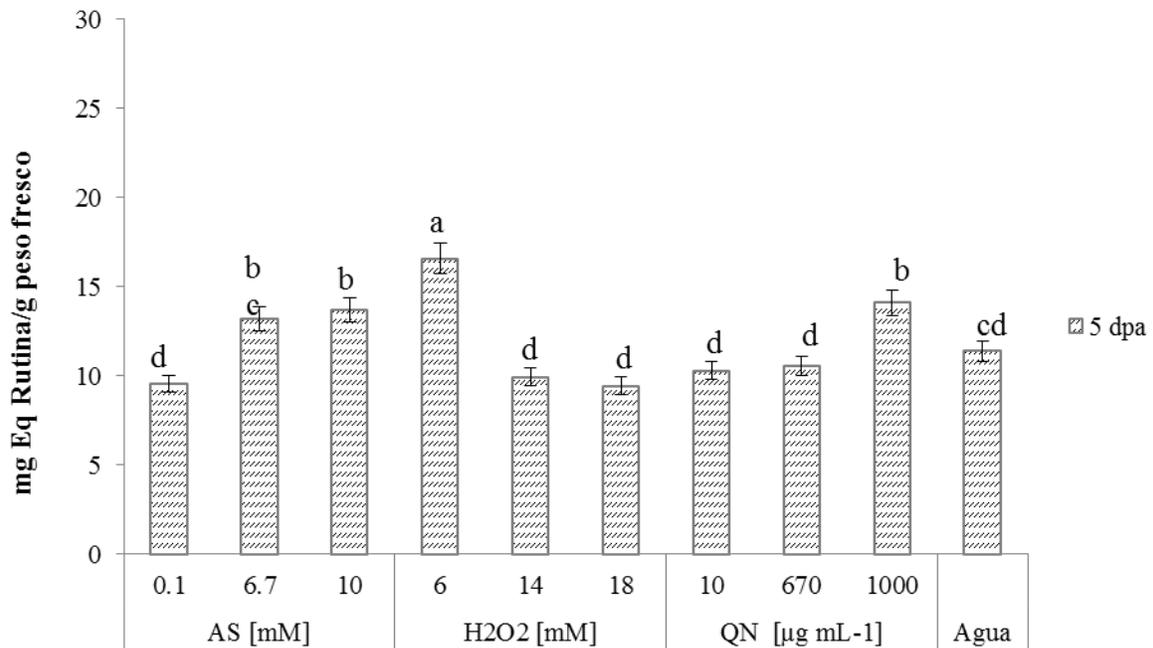
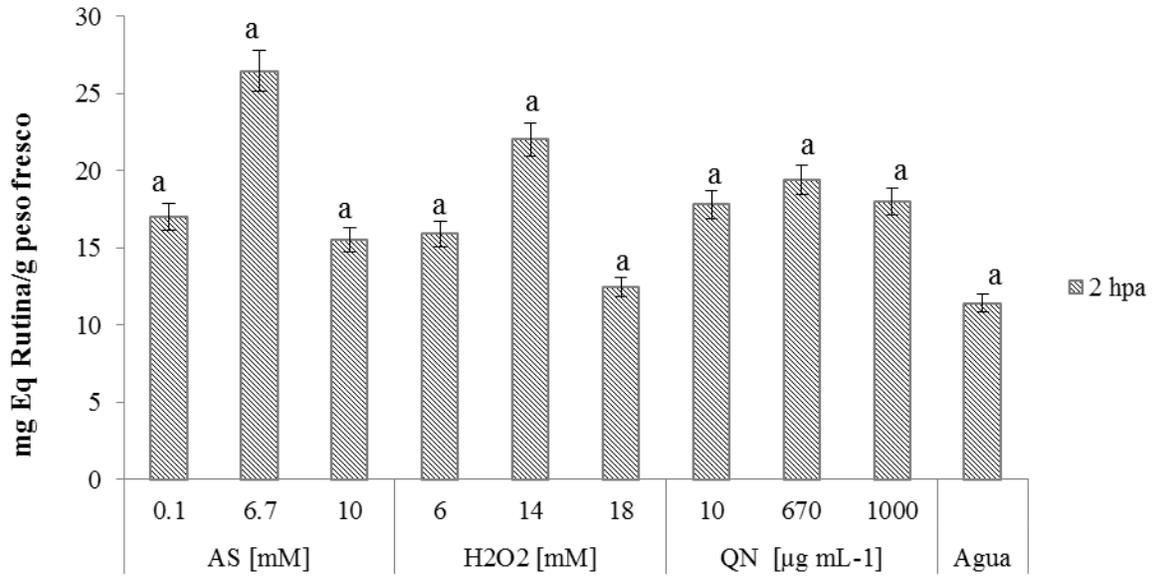
Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	139.87589	15.5418	5.6117	0.0007
Error	20	55.39087	2.7695		
C. Total	29	195.26675			

e) ANOVA contenido total de flavonoides por tratamiento a los 42\*\* dpa, variedad Don Pancho ( $\alpha=0.05$ ).

Fuente	GF	Sum. de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Prob > F
Tratamiento	9	95.42076	10.6023	11.1117	<.0001
Error	20	19.08316	0.9542		

C. Total	29	114.50392			
----------	----	-----------	--	--	--

f) Gráfica de contenido de flavonoides a las 2 hpa y al 5 dpa en variedad Don Pancho.



g) Gráfica de contenido de flavonoides al 42 dpa antes y después de la segunda aplicación de elicitors, en variedad Don Pancho.

