

**ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN
A ENZIMAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN *Capsicum chinense* EN RESPUESTA A
LA INFECCIÓN POR *Pythium ultimum*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

SILVIA MARGARITA PÉREZ CARRILLO

DIRECTOR

Dra. Ana Luisa Ramos Díaz

Co-director

Dra. Julia del Socorro Cano Sosa

Asesor:

Teresa Hernández Sotomayor

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Guadalajara, Jalisco, México, a febrero de 2019

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Desarrollo del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollados pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Desarrollo del Estado de Jalisco, A.C y en el mismo tenor, reconozco que si derivasen de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán, en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Silvia Margarita Pérez Carrillo





Guadalajara, Jalisco a 13 de febrero de 2019

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Silvia Margarita Pérez Carrillo**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN A ENZIMAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN *Capsicum chinense* EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Pythium ultimum*.” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura con orientación al mejoramiento genético durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 13 del mes de febrero del año dos mil diecinueve

Nombre y firma

Dra. Ana Luisa Ramos Díaz

Nombre y firma

Dra. Julia del Socorro Cano Sosa

Nombre y firma

Dra. S. M. Teresa Hernán

de Sotomayor

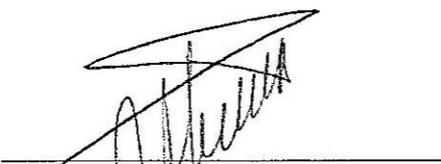
LIBERACIÓN DEL SINODO

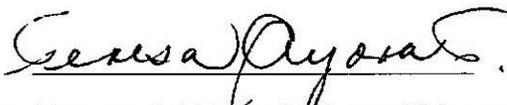
Mérida, Yucatán a 13 febrero de 2019

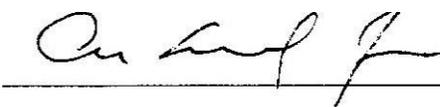
Mtra. Fátima Ordoñez de la Cruz
Coordinador Académico de la Maestría en Ciencias en Innovación tecnológica
Guadalajara, Jalisco

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado de la estudiante **SILVIA MARGARITA PÉREZ CARRILLO**, una vez leída y revisada la tesis titulada **“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS RELACIONADAS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN *Capsicum chinense* EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Pythium ultimum*”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los


Dra. S.M. Teresa Hernández Sotomayor.


Dra. Teresa del Rosario Ayora Talaver.


Dra. Ana Luisa Ramos Díaz

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), por su contribución al desarrollo de esta investigación, así como las facilidades proporcionadas para llevar a cabo los experimentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante el periodo de realización de la maestría.

Al CONACYT Ciencia de Frontera (2015). Por los fondos otorgados para la realización del proyecto: CAMBIOS METABÓLICOS Y EL SISTEMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ASOCIADOS A LA INTERACCIÓN DE CAPSICUM CHINENSE CON PYTHIUM SP. Number 35, que permitieron la realización de este trabajo de investigación.

Al cepario Czech Collection of Phytopathogenic oomycetes bank of The Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening (*R/LOG*). Por la cepa de *P. ultimum* que amablemente nos proporcionaron.

A la Dra. Ana Luisa Ramos Díaz, por su apoyo y consejos durante la dirección de la Tesis.

A la Dra. Julia Cano Sosa por la Co-dirección y su tiempo en la revisión de la Tesis.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su tiempo e invaluable revisión de la tesis.

DEDICATORIAS

A Dios todopoderoso por brindarme la oportunidad y la dicha de vivir en este mundo tan maravilloso, que me dio fuerza, sabiduría y deseos de seguir adelante en mi carrera profesional.

A mis padres por todo su apoyo, por tratarme como un ser independiente y por darme las alas para volar y así poder realizar mis sueños.

A mi esposo Samuel Chávez, por tus consejos y apoyo en este tiempo tan importante para mí.

A mis hermanitas Nancy y Genny por compartir tantos momentos felices conmigo, por ustedes, por ser su motor a seguir a pesar de los obstáculos.

A la Dra. Ana por su tiempo, por las enseñanzas, su paciencia, apoyo incondicional y por hacer posible este sueño....Gracias

El éxito no se logra sólo con cualidades especiales. Es sobre todo un trabajo de constancia, de método y de organización.

J.P. Sergent

Índice de Contenido

Índice de Abreviaturas.....	i
Índice de Tablas.....	ii
Índice de Figuras.....	iii
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Descripción botánica de <i>Capsicum chinense</i> jacq.....	3
2.2 Importancia de <i>C. chinense</i>.....	4
2.3 Producción de Chile habanero en México.....	4
2.4 Principales Patógenos del Chile habanero.....	5
2.4.1 Oomicetos.....	6
2.4.2 Género Pythium.....	6
2.5 Mecanismo de Infección de los Oomicetos.....	8
2.6 Mecanismos de defensa de las plantas.....	9
2.6.1 Especies reactivas de Oxígeno.....	10
2.7 Antioxidantes enzimáticos.....	11
2.7.1 Ascorbato Peroxidasa (APX).....	11
2.7.2 Polifenol Oxidasa (PPO).....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	15
V HIPÓTESIS.....	16
V OBJETIVOS.....	17
5.1 General.....	17
5.2 Específicos.....	17
VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
6.1 Esquema de la Estrategia Experimental.....	20
VII MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1 Diseño in silico de oligonucleótido.....	21
7.2. Desinfección de Semillas y Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. chinense</i>.....	21
7.3 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA.....	22
7.3.1 Amplificación por RT-PCR de APX, PPO y actina.....	23

7.3.2 Optimización de RT- PCR.....	23
7.4 Descripción Morfológica de <i>P. ultimum</i>	24
7.4.1 Inducción de zoosporas de <i>P. ultimum</i>	24
7.5 Evaluación de la susceptibilidad de <i>C. chinense</i> durante la infección por <i>P. ultimum</i>	25
7.5.1 Evaluación de la susceptibilidad en plántulas de <i>C. chinense</i>	25
7.5.2 Evaluación de la susceptibilidad en raíces emergentes de <i>C. chinense</i>	27
7.6. Identificación de la expresión de genes que codifican para APX y PPO en <i>C. chinense</i> infectado con <i>P.ultimum</i>	29
7.6.1 Condiciones de RT-qPCR	29
VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	30
8.1 Diseño de oligonucleótidos	30
8.2 Amplificación de APX.....	31
8.2.1 Análisis de la secuencia de APX.....	32
8.3 Amplificación de PPO.....	35
8.3.1 Análisis de la secuencia de PPO.....	35
8.4 Amplificación y Análisis de la secuencia del gen de referencia para la RT-PCR	38
8.5 Optimización de RT-PCR	41
8.6 Descripción Morfológica de <i>P. ultimum</i> en diferentes medios de crecimiento	43
8.7. Evaluación de Patogenicidad de <i>P. ultimum</i> en plántulas infectadas de <i>C. chinense</i>	45
8.7. Evaluación de la patogenicidad de <i>P. ultimum</i> en raíces emergentes	50
8.8. Análisis de expresión genética de APX.....	55
8.9 Análisis de expresión genética de PPO.....	56
IX CONCLUSIONES.....	57
X PERSPECTIVAS	58
XI REFERENCIAS	59
XII ANEXOS	68

Índice de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APX: Ascorbato Peroxidasa

ARN: Ácido ribonucleico

CAT: Catalasa

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

ETI: Inmunidad desencadenada por efectores

HR: Respuesta hipersensible

IMPI: Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

KDa: Kilo daltones

MDA: Monodeshidroascorbato

PAMP's: Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PPO: Polifenol Oxidasa

PRR: Receptores de reconocimiento de patógenos

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

SAR: Respuesta Sistémica Adquirida

SHU: Scoville Heat Units (número de unidades Scoville)

SIAP: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera

SOD: Superóxido Dismutasa

Índice de Tablas

	Paginas
Tabla 1. Principales productores de Chile habanero en México.....	4
Tabla 2. Especies Reactivas de Oxígeno	10
Tabla 3. Escala de Evaluación para la patogenicidad de la radícula de <i>C. chinense</i> inocula con <i>P. ultimum</i>.....	28
Tabla 4. Secuencia de nucleótidos de los oligos diseñados para los ensayos de RT-qPCR de APX, PPO y Actina	31
Tabla 5. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicón de APX.....	33
Tabla 6. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicon de PPO.....	36
Tabla 7. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicon de Actina	39
Tabla 8. Evaluación del grado de daño ocasionado por <i>P. ultimum</i> en radícula de <i>C. chinense</i> a la 24 y 96 h pos-inoculación.....	50

Índice de Figuras

	Paginas
Figura 1. Fruto de <i>C. chinense</i>.....	3
Figura 2. Ciclo de vida del género <i>Pythium</i>.....	8
Figura 3. Eliminación de ROS por APX en diferentes compartimentos celulares	12
Figura 4. Mecanismo de reacción de PPO en plantas.....	13
Figura 5. Limpieza de raíces de <i>C. chinense</i>. A) Eliminación de sustrato. B) Raíz limpia.....	25
Figura 6. Aclimatación de Plántulas con solución hoagland's para posterior infección con <i>P. ultimum</i>.....	26
Figura 7. Raíces emergentes. A) Tamaño de la radícula después de 7 días en obscuridad. B) Medición de la radícula antes de la inoculación.....	27
Figura 8. Semilla emergente depositada en caja magenta	28
Figura 9. Amplificado de APX: M) Marcador de masa molecular. APX) Amplicón de Ascorbato peroxidasa con 365 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR.....	32
Figura 10. Cladograma de APX. En amarillo el clado del género <i>Capsicum</i> y en rojo la secuencia amplificada.....	34
Figura 11. Amplificado de PPO: M) Marcador de masa molecular. PPO) Amplicón de polifenol oxidasa con 536 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR.....	35
Figura 12. Secuencia preliminar de PPO obtenida por amplificación y secuenciación de cDNA de <i>C. chinense</i>.....	36

Figura 13. Cladograma para la secuencia de PPO. En amarillo el clado donde se ubica el género <i>Capsicum</i> y en rojo el amplicón de PPO.....	37
Figura 14. Amplicón de Actina. M) Marcador de masa molecular, amplicón de actina con 350 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR..	38
Figura 15. Secuencia consenso de actina de 355pb obtenida por amplificación y secuenciación de cDNA de <i>C. chinense</i>.....	39
Figura 16. Cladograma de la secuencia de actina. En amarillo el clado donde se ubica el género <i>Capsicum</i> y en rojo el amplicón de actina	40
Figura 17. Optimización de la RT-PCR. A) APX, B) PPO y C) actina. Para todos los casos M) marcador de masa molecular. 1A Y 1B) cDNA a Tm de 50°C, 2A y 2B) testigo negativo de Tm 50°C, 3A y 3B) cDNA a Tm de 55°C, 4A y 4B) testigo negativo de Tm 55°C, 5A y 5B) cDNA de Tm de 58°C, 6A y 6B) Testigo negativo de Tm de 58°C, 7A y 7B) cDNA de Tm de 60°C, 8A y 8B) Testigo negativo de Tm de 60°C, 9A y 9B) cDNA de Tm de 63°C, 10A y 10B) Testigo negativo de Tm de 63°C, 11A y 11B) cDNA de Tm de 65°C, 12A y 12B) Testigo negativo de Tm de 65°C. 1C) Testigo negativo de Tm de 50°C, 2C) cDNA de Tm de 50°C 3C) Testigo negativo de Tm de 55°C, 4C) cDNA a Tm de 55°C, 5C) Testigo negativo a Tm de 58°C, 6C) cDNAa Tm de 58°C, 7C) Testigo negativo de Tm de 60°C, 8C) cDNA de Tm de 60°C, 9C) Testigo negativo de Tm de 63°C, 10C) cDNA de Tm de 63°C, 11C) Testigo negativo de Tm de 65°C, 12C) cDNA de Tm de 65°C.	42
Figura 18. Patrón de crecimiento de <i>P. ultimum</i> en diferentes medios. A) En agar dextrosa y Papa, B) En V8 5% clarificado, C) Agar-agua	44
Figura 19. Estructuras vegetativas y de reproducción de <i>P. ultimum</i>. A) Hifas cenocíticas con crecimiento irregular, B) inchazones hifales, C) Oosporas aploverotica, D) Oogonio globoso terminal, E) Oogonios globosos intercalares	45

Figura 20. Plántulas de <i>C. chinense</i> en cultivo hidropónico con 3 días pos-inoculación con zoosporas de <i>P. ultimum</i> . A) Plántulas testigo, B) Plántulas infectadas con presencia de damping-off.....	46
Figura 21. Raíces de <i>C. chinense</i> vistas al microscopio con 3 días pos-inoculación con zoosporas de <i>P. ultimum</i> . A) Raíz testigo, B) Hifas a lo largo de la raíz, C Y D) Presencia de oospora en la raíz.....	47
Figura 22. plántulas de <i>C. chinense</i> en cultivo hidroponico con 7 días pos-inoculación con zoosporas de <i>P. ultimum</i> . A) Plántula testigo, B) Presencia de damping-off, C) Presencia de root rot	48
Figura 23. Estructura de reproducción de <i>P. ulimum</i> en raíces de <i>C. chinense</i> . A y B) Testigo, C y D) Esporangios ovoides terminales sostenidos por el esporangióforos, E) Oóspora aplerótica.....	49
Figura 24. Daño en raíces emergentes a las 96 hr. A) Raíces testigo con presencia del cotiledón, B) Raíces con necrosis	51
Figura 25. Comparación del crecimiento de las radículas de <i>C. chinense</i> despues de la inoculación con <i>P. ultimum</i> a las 24 y 96 hr.....	52
Figura 26. raíces de <i>C. chinense</i> vistas en SEM después del contacto con <i>P. ultimum</i> . A y C) Raíces testigo con presencia de pelos radiculares, B) Raíz cubierta con el micelio de <i>P. ultimum</i> , D) Crecimiento irregulara del micelio sobre el tejido de la raíz.....	53
Figura 27. Raíces de <i>C. chinense</i> vistas en SEM a las 24 hr pos-inoculación con <i>P. ultimum</i> . A y B) Raíces testigo, Cy D) Crecimiento irregular del micelio sobre las raíces	54
Figura 28. Raíces testigo de <i>C. chinense</i> vistas en SEM a las 96 hr.	55

Figura 29. Análisis de la expresión genética de APX en raíces de *C. chinense* a las 24 hr pos-inoculación con *P. ultimum*. donde letras diferentes representan diferencia significativa 56

RESUMEN

Capsicum chinense es una especie de importancia económica para la Península de Yucatán; sin embargo, los cultivos están expuestos a diversos microorganismos patógenos como los oomicetos. Los oomicetos fitopatógenos del género *Pythium* causan diferentes sintomatologías como damping-off, pudrición de frutos y semillas provocando pérdidas en cultivos a nivel mundial. No obstante, las plantas han desarrollado estrategias que les permiten percibir y responder en presencia del patógeno; una de las señalizaciones más importantes es la que involucra la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Pero cuando existe una liberación excesiva de ROS estas pueden ser tóxicas para la célula, por lo que es necesario que sean estrictamente reguladas por mecanismos antioxidantes enzimáticos como la ascorbato peroxidasa (APX), la cual es importante para la degradación de ROS, además que puede regular vías de señalización involucradas en la respuesta a patógenos, otra enzima relacionada con la eliminación de ROS y la respuesta temprana a la invasión de patógeno es la polifenol oxidasa (PPO). Considerando la importancia de la señalización por ROS y su regulación durante la infección por este patógeno, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en *C. chinense* en respuesta a *P. ultimum*. Se logró la clonación de genes ortólogos de APX, PPO y Actina; se realizó la descripción morfológica de *P. ultimum*, se determinó que es altamente patogénica tanto para plántulas como para semillas en emergencia donde a las 96 hr las raíces testigo habían crecido un promedio de 17.87% más en comparación con las inoculadas. En el análisis de expresión por PCR tiempo real para PPO reveló la presencia de diferentes isomorfos, en contraste para APX, para el cual fue posible la clonación de un gen (MG911728) y el análisis de expresión en raíces *C. chinense*.

ABSTRACT

Capsicum chinense is a species of economic importance for the Yucatan Peninsula; however, the cultures are exposed to various pathogenic microorganisms such as oomycetes. The phytopathogens oomycetes of the *Pythium* genus cause different symptoms for example damping-off in fruit, seedling and seed root rot, causing losses in crops worldwide. However, plants have developed strategies that allow them to perceive and respond in the presence of the pathogen; One of the most important signs is the one that involves the production of reactive oxygen species (ROS). But when there is an excessive release of ROS these can be toxic to the cell, so it is necessary to be strictly regulated by enzymatic antioxidant mechanisms as the ascorbate peroxidase (APX), which is important for the degradation of ROS, also that can regulate signaling pathways involved in the response to pathogens, another enzyme related to the elimination of ROS and the early response to pathogen invasion is Polyphenol oxidase (PPO). Considering the importance of ROS signaling and its regulation during infection by this pathogen, the aim of this work was to evaluate the expression of genes that encode enzymes related to oxidative stress in *C. chinense* in response to *P. ultimum*. The cloning of orthologous genes of APX, PPO and Actin was achieved; it was described morphologically to *P. ultimum*; It was determined that it is highly pathogenic both for seedlings and seeds in emergencies where, at 96 hours, the control roots had grown an average of 17.87% compared to those inoculated. In the analysis of real time PCR expression for PPO revealed the presence of different isomorphs, in contrast for APX we achieved the cloning of a gene (MG911728) and the change of express in roots of *C. chinense*.

I. INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense*, jacq.) es uno de los principales cultivos para el estado de Yucatán; su fruto posee características de interés comercial debido a su alto contenido de capsaicina (Yáñez *et al.*, 2015). Es comercializado en el mercado local, nacional e internacional, donde se consume en forma de salsas o como condimento, además de ser emplearlo como materia prima para la extracción de capsaicina para producir fármacos, ungüentos, lociones y crema (Ruiz-lau, 2011). A pesar que, en 2010 el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI), otorgó la de nominación de origen a los estados de la Península de Yucatán bajo el nombre de “CHILE HABANERO DE LA PENINSULA DE YUCATÁN” la producción del estado ha ido en descenso; en el 2017 Veracruz se posicionó como el primer productor a nivel nacional con una producción de 2977.7 ton. (SIAP, 2017). Por lo que una alternativa para aumentar la producción en la región es reduciendo las pérdidas ocasionadas por los microorganismos patógenos (Moguel-Salazar *et al.*,2018).

Entre los diferentes patógenos que se han reportado que pueden infectar las plantas de chile habanero, y en general del género *Capsicum* se encuentran los oomicetos como *Pythium* spp. (Nawaz *et al.* 2015; Shahid and Ali 2017), ocasionando la pudrición de plántulas y frutos carnosos. Hasta el momento no existen medidas de control que puedan proteger a los cultivos cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables para el desarrollo de *Pythium* spp.

Para hacer frente al ataque de patógenos y en general del estrés bióticos y abióticos las plantas presentan un mecanismo de defensa, el cual es inducido por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el cual es indispensable para procesos como el crecimiento, desarrollo, la respuesta hipersensible, la muerte celular programada y el desencadenamiento de señales de traducción, que provocan la activación de genes actuar de defensa de la planta (Laxalt and Munnik, 2002; Bailey y Mittler, 2006).

Considerando que la liberación excesiva de ROS puede ocasionar daños a la célula que los produce (Caverzan *et al.* 2016) las plantas para protegerse del daño que puede ocasionar la explosión oxidativa y mantener el equilibrio entre la producción y desintoxicación de ROS, poseen mecanismos de defensa antioxidantes enzimáticos como la ascorbato peroxidasa (APX) y la polifenol oxidasa (PPO) (Gill and Tuteja, 2010). El sistema antioxidante es crucial para mantener el equilibrio celular y la respuesta antioxidante de las plantas. Por ejemplos la APX es clave en degradación del H₂O₂ (Caverzan *et al.* 2016) y PPO cataliza la hidroxilación de compuestos fenoles a orto-difenoles seguido de la oxidación de los mismos a ortoquinonas produciendo polímeros coloreados no tóxicos para la célula (Jukanti, 2017).

Considerando la importancia de la señalización por ROS y su regulación durante la infección por este patógeno y teniendo en cuenta que diferentes estudios han demostrado que la actividad de las enzimas APX y PPO se activan en las plantas en respuesta a la infección por patógenos (Gayoso *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2004; Azarabadi *et al.*, 2017; Kakueinezhad *et al.*, 2018), y que en el caso de *C. chinense* se desconoce el nivel de respuesta de durante la infección por *Pythium ultimum*, en este estudio se analizó la expresión de los genes que codifican para APX y PPO; esto con el fin desarrollar estrategias posteriores de control orientadas hacia el mejoramiento genético de *C. chinense* para poder hacer frente a dicho oomiceto.

II. ANTECEDENTES

2.1 Descripción botánica de *Capsicum chinense*

“Es un arbusto pequeño, su altura varía entre 45 a 75 cm en cultivo a cielo abierto y de 75 a 120 cm en condiciones de invernadero. Presenta una raíz pivotante que puede profundizar de 40 a 120 cm y su sistema radicular está bien desarrollado. El tallo generalmente glabro, presenta un crecimiento semi-determinado de forma gruesa y erecta; sus hojas son de tamaño variable, lisas y de forma ovadas a ovadas lanceoladas de 3.8 a 6.5 cm de ancho” (Smith y Heiser, 1957).

“La floración se presenta cuando la planta empieza a ramificarse. Las flores son de color blanco su tamaño oscila entre 1.5 a 2.5 cm de diámetro de la corola, el número de pétalos y sépalos es entre cinco y siete, el número de flores va desde una hasta grupos de dos o más. Sus frutos son bayas huecas y poco carnosas de tamaño de 2 a 6 cm y color verde cuando recién emergen y cuando van madurando puede variar entre rojo naranja y amarillo; presentan de tres a cuatro lóbulos, las semillas se encuentran alojadas en las placentas, son lisas y pequeñas, su testa es de color café claro a oscuro y presentan un periodo de germinación de ocho a quince días” (Tun-Dzul 2001) (Fig. 1).



Figura 1. Fruto de *C. chinense*

2.2 Importancia de *C. chinense*

La importancia del chile habanero radica en el fruto, el cual es exportado por México hacia Estados Unidos donde tiene gran demanda. En la escala de Scoville (SHU) es considerado uno de los chiles más picantes y aromáticos. Es utilizado en forma de pastas que fungen como salsas y en fresco como un condimento (Ruiz-Lau, 2011); sin embargo su interés no radica únicamente en el consumo humano; sino que posee un alto potencial para la extracción de la capsaicina, la cual es utilizada a nivel comercial para fabricar colorantes naturales y minerales, además de ser empleado en la industria médica y farmacéutica en forma de lociones o cremas para aliviar dolores musculares debido a su propiedad analgésica y en la industria química del chile habanero se extraen oleorresinas para la elaboración de aerosoles pimienta (Cedrón and Whitaker, 2013).

2.3 Producción de Chile habanero en México

El chile habanero a pesar de ser originario de centro América; México es uno de los principales productores con una producción de 12,038.35 toneladas, de los cuales casi el 75% del total nacional es producido por cinco estados Veracruz, Yucatán, Tabasco, Nayarit y Campeche (Tabla 1).

Tabla 1. Principales productores de Chile habanero en México

Estado	Producción (Ton)	Rendimiento Ton/ha	PMR \$/Ton	Valor de la producción (mdp)
Veracruz	2,977.70	23.08	16,200.62	48,240.60
Yucatán	1,633.31	10.43	20,171.42	32,946.19
Tabasco	1,598.50	10.02	14,673.75	23,455.98
Nayarit	1,462.30	21.35	23,714.52	34,677.74
Campeche	1,243.73	13.23	16,576.49	20,616.67

Datos tomados de SIAP, 2017

Un número considerable de productores de la región depende del cultivo del chile como fuente de ingreso. Una forma de contribuir a aumentar sus ingresos se dio en el 2010 cuando el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual le otorgo al chile habanero la denominación de origen (IMPI, 2010), no obstante a partir de 2012 a la fecha la producción de la península de Yucatán ha ido en descenso, principalmente del estado de Yucatán el cual en 2011 ocupaba el primer lugar como productor Nacional, de 2012 a 2016 fue superado por Tabasco y en el 2017 por Veracruz estado que produjo casi el 25% de total nacional mientras que Yucatán apenas el 13% (SIAP, 2017). La disminución de la producción en el estado de Yucatán puede atribuirse a los factores abióticos como la temperatura, escasez de agua y minerales (Schulze *et. al.*, 2005), pero de igual manera a las plagas y enfermedades que pueden atacar el cultivo cuando las condiciones son favorables para la infección (Martinez-Mex *et al.*, 2018).

2.4 Principales Patógenos del Chile habanero

Entre las plagas de insectos que ataca el cultivo de chile se encuentra el barrenador *Anthonomus eugenii*, el cual provoca caída de las flores y frutos y si no es controlado puede perderse hasta el 50% de la producción (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2012), Otra de las plagas de importancia que se han encontrado en chiles y de incidencia estacional es la mosquita blanca *Bemisia tabasi* vector importante de virosis (Padhi, Maity y Chattopadhyay, 2017), además de la mosquita minadora *Liriomyza* sp y el ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus*, el cual ataca el cultivo en cualquier etapa de desarrollo causando la muerte del mismo (Tun-Dzul José de la Cruz, 2001). Además de insectos, el cultivo de chile se ve amenazado por organismos fitopatógenos; hongos y oomicetos como *Pythium spp.*, los cuales pueden formar complejos y causar grandes pérdidas en los cultivos emergentes o en plántula después de la emergencia

2.4.1 Oomicetos

Los oomicetos son un grupo diverso de organismos eucariotas que han colonizado muchos hábitat, la mayoría de las especies conocidas son parásitos de plantas y ocasionan enfermedades en cultivos de importancia económica (Thines y Kamoun, 2010). Presentan una flexibilidad genética que les permite adaptarse rápidamente y desarrollar resistencia, debido a ello, la mayoría de los fungicidas no tienen efecto sobre ellos (Tyler, 2001).

2.4.2 Género *Pythium*

El género *Pythium* se han considerado como organismos parecidos a hongos o pseudo-hongos (Ho, 2009), los cuales pertenece a la clase Oomycota y a la familia Pythiaceae. (<http://www.mycobank.org>); se reportan 140 especies conocidas, 41 nuevas especies, ahora bien se han propuesto un total de 355 especies pero muchas de ellas no han sido descritas formalmente (Kageyama, 2014).

La mayoría de las especies de este género son homotáticas, sin embargo, existen siete especies heterotáticas (Lamour y Kamoun, 2009). Son a menudo patógenos de plantas, debido a su amplio rango de hospederos. Su distribución es a nivel mundial, se pueden encontrar diferentes especies en los trópicos, regiones templadas o incluso en climas fríos (Plaats-Niterink, 1981).

Se caracterizan por la producción de oosporas de paredes gruesas, las cuales pueden germinar y formar esporangios cuando las condiciones de humedad son favorables, un anteridio alargado, paredes celulares compuesta de celulosa, hifas cenocíticas con ramificaciones irregulares (Schroeder *et al.*, 2013). La mayoría de las especies de *Pytium* son capaces de reproducirse tanto sexual como asexualmente (Middleton, 1943).

La reproducción sexual tiene lugar por medio de oogonio y anteridio (Fig. 2). El oogonio es el órgano femenino, pueden ser de forma esférica a limoniformes y son intercalares o terminales. La pared oogonial puede ser lisa o adornada con proyecciones. El anteridio es el órgano masculino, consiste en una célula

anteridiana que puede ser sésil en una hifa, intercalar, o terminal en un tallo anteridial. La célula anteridiana toca el oogonio y forma un tubo de fertilización que penetra la pared oogonial. Después de la fecundación el contenido oogonial forma un cigoto, la oospora. Solamente en casos raros se produce más de una oospora dentro de un oogonio (Plaats-Niterink, 1981).

Su reproducción asexual se realiza por medio de zoosporangios y zoosporas (Fig. 2) (Plaats-Niterink, 1981). Los esporangios se separan del resto del micelio por una pared transversal, en cierto punto desarrollan un tubo de descarga por donde fluye el citoplasma, y forma una vesícula en su extremo. La vesícula está rodeada por una membrana donde el interior se empiezan a formar las zoosporas, la cuales se delimitadas y comienzan a moverse, después de algún tiempo, la pared de la vesícula desaparece y se liberan las zoosporas móviles al medio (Plaats-Niterink, 1981; Schroeder *et al.*, 2013)

Las zoosporas se mueven a través de medios líquidos dos flagelos, los cuales le sirven para desplazarse libremente a través del agua de riego. Estas zoosporas actúan como agentes infecciosos primarios, ya que son atraídas por los exudados como azúcares y aminoácidos de las raíces y las semillas germinantes presentando un quimiotropismo positivo (Donaldson and Deacon, 1993), una vez que las zoosporas tocan la superficie del hospedero se anclan a las paredes celulares e inicia la infección.

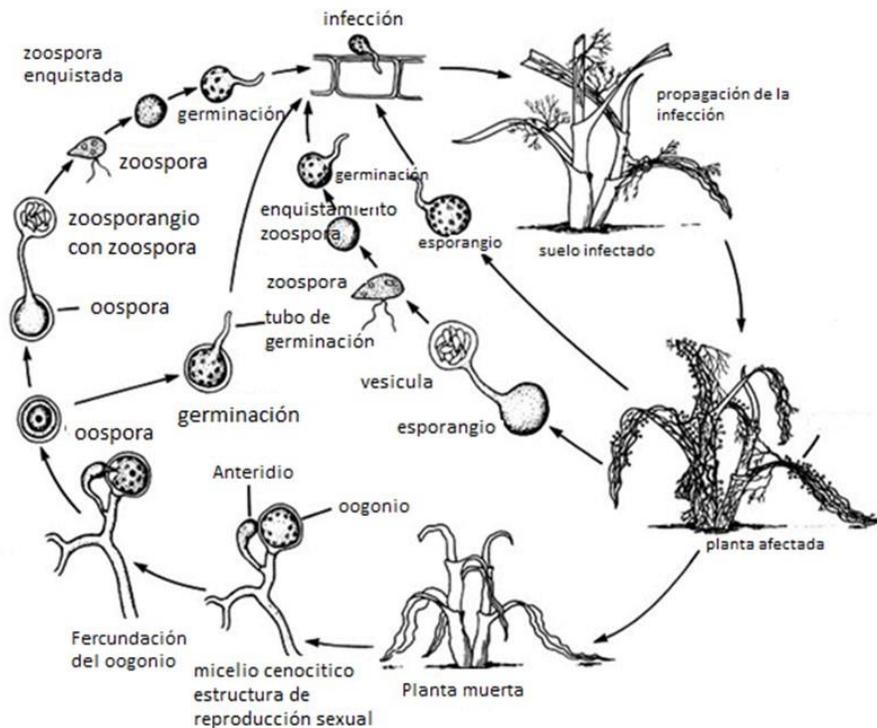


Figura 2. Ciclo de vida del género *Pythium*

Fuente: Smiley, et. al., 2005

2.5 Mecanismo de Infección de los Oomicetos

La germinación de las zoosporas del oomiceto inicia cuando entra en contacto con la planta, el patógeno se abre paso al interior de la célula vegetal, secretando enzimas hidrolíticas hacia la pared celular de la planta y las proteínas “pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), los cuales son reconocidos por los receptores de la planta llamados “receptores de reconocimiento de patógeno” (PRR), con lo que la planta inicia la defensa contra el patógeno al secretar enzimas hidrolíticas como quitinasa, glucanasa o proteasas; desencadenando la inmunidad innata, lo que lleva a la muerte celular para evitar que el patógeno avance. En respuesta el patógeno libera toxinas e inhibidores de las enzimas hidrolíticas y logra introducir hifas al tejido, una vez dentro de la planta la hifa se transforma en

haustorio, con la finalidad de absorber nutrientes y liberar proteínas efectoras, las cuales suprimen la defensa de PRR de la planta y permiten el avance de la infección.

La planta de igual manera ha desarrollado una segunda línea de defensa denominada Inmunidad desencadenada por efectores (ETI) desarrollando proteínas de resistencia para reconocer las proteínas efectoras o su actividad, A pesar de ello, eso no es suficiente ya que los oomicetos han desarrollado proteínas efectoras que no son reconocidos por la ETI, por lo que la infección es exitosa y el patógeno obtiene los nutrientes que están disponibles en el huésped (Stassen y Ackerveken, 2011). Una vez que *Pythium* sp. mata y coloniza el tejido, este esporula y produce esporangios o estructuras reproductivas para poder colonizar nuevos hospederos. A pesar de ello existen otros mecanismos de defensas que las plantas poseen para defenderse de los ataques de los patógenos.

2.6 Mecanismos de defensa de las plantas

Las plantas están constantemente sometidas a factores bióticos y abióticos. Debido a que estos factores en algún momento limitan su crecimiento y desarrollo, afectan su rendimiento y producción; esto ocurre porque la planta se encuentra en un estado de estrés que pueden ocasionar cambios fisiológicos, anatómicos, bioquímicos y moleculares (Walley *et al.*, 2007)

Para contrarrestar estas afecciones las plantas poseen mecanismos de defensa que son activados por los diferentes compuestos producidos por los patógenos, lo cual desencadena una cascada de señales de traducción, lo que lleva a la activación de genes de defensa, la respuesta hipersensible (HR), la muerte celular programada, la respuesta sistémica adquirida (SAR) (Maleck y Dietrich, 1999) y el desencadenamiento de las ROS lo que produce una explosión oxidativa (Laxalt y Munnik, 2002), todo ello proporciona resistencia durante la infección por patógenos, dando como resultado una mejor resistencia a dicho ataque.

2.6.1 Especies reactivas de Oxígeno

Las ROS, han estado presentes desde que las cianobacterias fueron capaces de realizar la fotosíntesis hace 2700 millones de años (Airaki, 2012). “son formas parcialmente reducidas o activadas del oxígeno atmosférico (O_2). Generalmente provienen de la excitación del O_2 para formar al oxígeno singulete (1O_2) o de la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar, al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), al peróxido de hidrogeno (H_2O_2) o al radical hidroxilo ($^{\circ}OH$)” (Rivera-Cabrera *et al.*, 2008) (Tabla 2). Se producen en las plantas durante el proceso de fotosíntesis, en las mitocondrias cloroplastos y peroxisomas bajo condiciones normales y se incrementan cuando la planta está expuesta a condiciones desfavorables (Airaki, 2012; Choudhury *et al.*, 2017)

Los diferentes tipos de estrés en las plantas llevan a la sobreproducción de ROS, lo que ocasiona daños en las proteínas, los lípidos, carbohidratos y al ADN, dando como resultado el estrés oxidativo. Las ROS influyen en la expresión del número de genes y es por ello que controlan los procesos de crecimiento, ciclo celular, la muerte celular programada, la respuesta de defensa contra patógenos y las respuestas al estrés abiótico (Gill y Tuteja, 2010)

Tabla 2. Especies Reactivas de Oxígeno

Radicales libre	Símbolo	No radicales	Símbolo
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Oxígeno singulete	1O_2 o $^1\Delta g$
Hidroperoxilo	HO_2	Peróxido de Hidrogeno	H_2O_2
Hidroxilo	OH°		
Peroxilo	ROO°		
Alcoxilo	RO°		

Fuente: (Fernández *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012)

Sin embargo, las plantas, para poder contrarrestar el daño que ROS pueda ocasionarles, presentan mecanismos de defensa antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005)

2.7 Antioxidantes enzimáticos

Las plantas poseen mecanismos de defensa antioxidante, presentes cerca de los lugares de producción de ROS, los cuales sirven para eliminarlas y así proteger a las células de los daños ocasionados por el estrés oxidativo; entre ellas se encuentran las enzimas tal como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPX), polifenol oxidas, etc.), compuesto no enzimáticos como el ácido ascórbico y compuestos fenólicos y alcaloides (Gill and Tuteja, 2010)

2.7.1 Ascorbato Peroxidasa (APX)

La APX (E.C.1.1.11.1) es una enzima peroxidasa monomericas de 30-40 kDa de masa molecular, es la que lleva a cabo la primera reacción del ciclo ascorbato glutatión, cuando reduce H_2O_2 a H_2O , empleado de sustrato reductor al ascorbato, el cual se oxida a monodeshidroascorbato (MDA), se puede encontrar isoformas de APX en los cloroplastos membrana del estroma y tilacoides, en el citosol, las mitocondrias y peroxisomas para regular los niveles de H_2O_2 (Fig. 3). Debido a esta isoformas las plantas son capaces de usar de manera eficiente el ascorbato, el cual es el antioxidante soluble más abundante para la eliminación de H_2O_2 . APX es la encargada de mantener el equilibrio de H_2O_2 , modular la aclimatación al estrés de la planta y regular las vías de señalización involucradas en el desarrollo de la planta (Maruta y Ishikawa, 2018)

Las APX cloroplastidicas de algunas plantas superiores como espinaca, se sabe que codifican para un único gen y sus ARNm se generan por splicing alternativos de dos exones en el extremo 3' del gen (Ishikawa *et al.*, 1997), mientras que en

arroz y *Arabidopsis* existen dos genes que codifican para la APX de cloroplasto (Teixeira *et al.*, 2006).

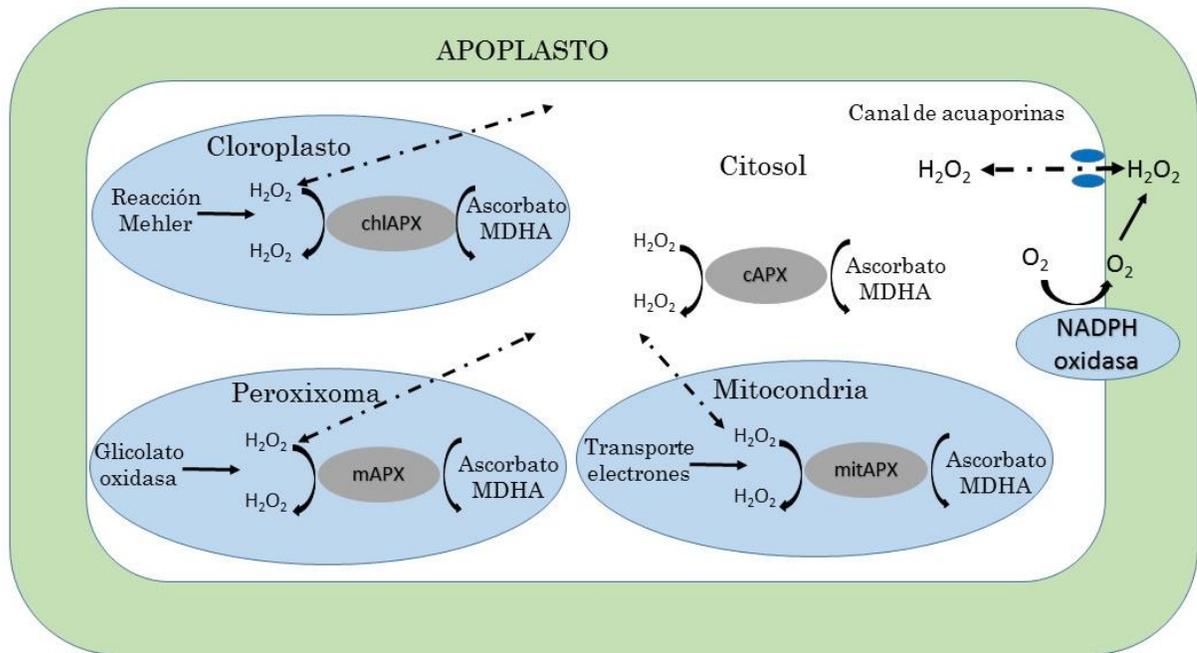


Figura 3. Eliminación de ROS por APX en diferentes compartimentos celulares

Fuente: Modificado de (Caverzan *et al.*, 2012)

2.7.2 Polifenol Oxidasa (PPO)

Es una oxidoreductasa que cataliza dos reacciones diferentes en presencia del O_2 : la o-hidroxilación de sustratos fenólicos actividad conocida como cresolasa (E.C.1.14.18.1) y la oxidación de o-difenoles a quinonas actividad catecolasa (E.C. 1.10.3.2) (Fig. 4). Estas enzimas se han relacionada con el control de los niveles de O_2 : en el fotosistema II (Sheptovitsky and Brudvig, 1996) y con la respuesta a patógenos (Lazarovits y Ward, 1982).

La mayoría de los PPO se ubican en los cloroplastos (Arnon, 1949), localizada específicamente en la membrana de los tilacoides (Nicolas *et al.*, 1994; Sommer *et*

al., 1994) justo alado de los fotosistemas I y II (Lax and Vaughn, 1991), además se han reportado PPO en el citosol (Nakayama *et al.*, 2000), en la vacuola (Ono *et al.*, 2006) y en mitocondrias no unidas a la membrana (Nicolas *et al.*, 1994).

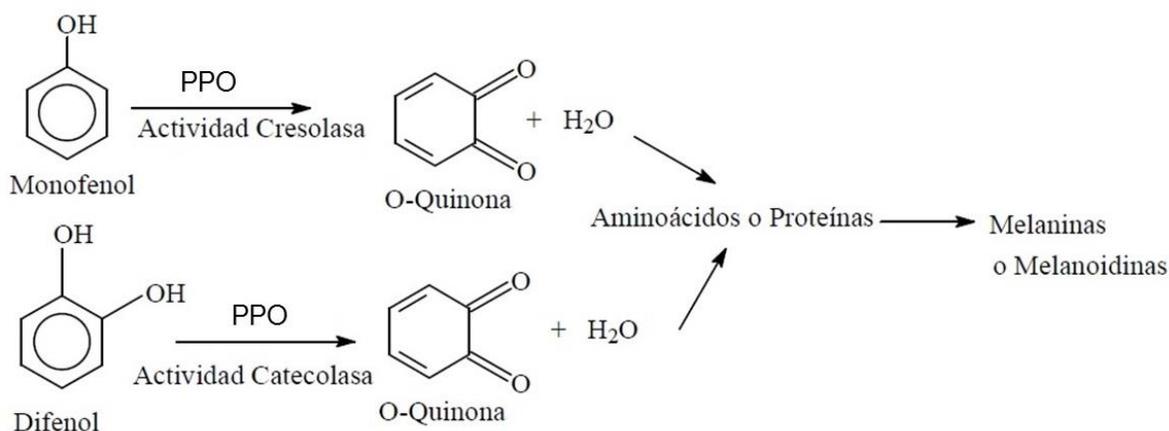


Figura 4. Mecanismo de reacción de PPO en plantas

Fuente: Modificado de (Gacche, *et. al.*, 2003)

Se han realizado estudios para evaluar la relación de ROS y los antioxidantes enzimáticos durante la interacción planta-patógeno, los cuales han demostrado que existe un aumento de la actividad de ROS en raíces de plantas después de la inoculación, lo que sugiere que existe un incremento de la explosión oxidativa durante dicha interacción.

Para contrarrestar ROS en plantas de *C. annuum* inoculadas con *Phytophthora capsici* se observó que la actividad de la CAT se vio aumentada mientras que la APX disminuyó (Gayoso *et al.*, 2004). En *Pyrus communis* infectado con *Erwinia amylovora*, se registraron actividades relativamente altas CAT, SOD y APX de 24 a 96 horas pos-inoculación (Azarabadi *et al.*, 2017). De igual manera se ha observado un incremento en la actividad de la PPO en hojas y raíces de *Capsicum sp.* infectadas con *Phytophthora capsici* (Jung *et al.*, 2004 y Jukanti, 2017). En jengibre infectadas con *Pythium aphanidermatum* La actividad de la PPO, la lipoxigenasa y la fenil amonio liasa aumentaron hasta 14 días después de la inoculación y después

disminuyeron mientras la Peroxidasa (PO) aumenta para después disminuir bruscamente (Ghosh, 2015). Por lo que esto sugiere que las enzimas antioxidantes como PPO y APX, están relacionadas con la respuesta temprana de la planta al patógeno y además son capaces de regular a las ROS compensando el estrés oxidativo.

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado una inducción temprana y un incremento en la actividad de las enzimas APX y PPO en plantas inoculadas con patógenos, lo que indica que estas enzimas se activan en respuesta a una infección; Sin embargo no se conoce si estas enzimas son capaz de activarse en *C. chinense* en presencia de *P. ultimum*, y si dicha actividad es capaz de ayudar a combatir la infección; conocer esto podría ayudar a implementar estrategias orientadas hacia el mejoramiento genético para poder combatir dicho oomiceto incluso de manera temprana.

V HIPÓTESIS

Si la actividad enzimática de APX y PPO se activa en respuesta a la infección por patógenos en plantas de *Zingiber officinale*, *Pynus communis* y *Capsicum annum*, es posible que los genes que la codifican modifiquen su expresión estén presentes en *C. chinense* en respuesta a la infección por *P. ultimum*

V OBJETIVOS

5.1 General

Analizar la expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con el estrés oxidativo en *C. chinense* en respuesta a la infección por *P. ultimum*.

5.2 Específicos

- Clonar los genes que codifican para las enzimas ascorbato peroxidasa y polifenol oxidasa en *C. chinense*.
- Describir morfológicamente *P. ultimum*
- Evaluar la susceptibilidad de *C. chinense* durante la infección con *P. ultimum*.
- Identificar la expresión de los genes APX y PPO de *C. chinense* relacionados con la respuesta a la infección por *P. ultimum*.

VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El proyecto se dividió en cuatro etapas para su desarrollo:

1^{er} ETAPA. Clonación de los genes que codifican enzimas relacionadas con el estrés oxidativo

Inicio con el diseño de oligos, que consistió en la búsqueda y análisis *in silico* de secuencias conservadas de las enzimas APX y PPO relacionadas con el género *Capsicum*. Se prosiguió con la clonación de los genes que codifican APX y PPO; para lo que se realizó germinación de semillas *in vitro* el mantenimiento de las plántulas de *C. chinense* germinadas y el mantenimiento de la cepa de *Pythium ultimum*. Posteriormente se realizó extracción de ARN total de las plántulas, para síntesis de cDNA, PCR punto final, electroforesis y purificación de los productos obtenidos. Los productos obtenidos de la PCR, fueron secuenciados por la empresa Macrogen inc. las secuencias se analizaron con el software BioEdit; de igual manera se compararon en la base de datos BLAST de la NCBI y se realizó el registro de la secuencia obtenida en la base de datos de la NCBI.

2^{da} Etapa Inducción de zoosporas *P. ultimum*

La cepa de *P. ultimum* fue resembrada en PDA, V8% clarificado y agar-agua para su evaluación, para cada resiembra se realizó frotis para constatar la pureza del cultivo y para observar las estructuras morfológicas de *P. ultimum*, en paralelo se inoculaban frutos de chile habanero para corroborar la patogenicidad de la cepa.

3^{er} ETAPA Evaluación de la susceptibilidad de *C. chinense* durante la infección por *P. ultimum*

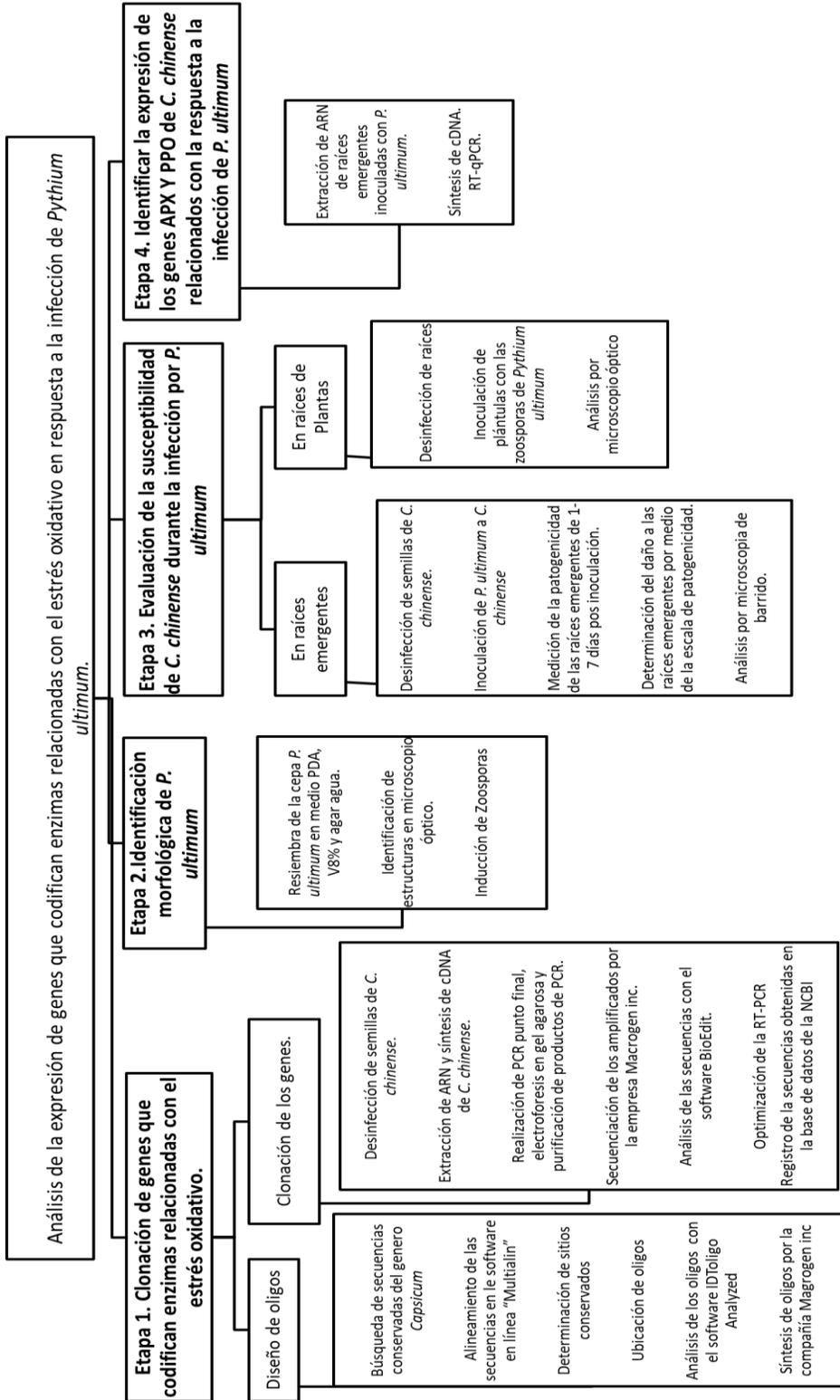
Para esta etapa se utilizaron raíces emergentes y plántulas *C. chinense* la cuales se desinfectaron y después de 7 días se inocularon con fragmentos de micelio de *P. ultimum*, se midió la patogenicidad y se determinó el daño a las raíces emergentes, además que se observó en microscopio electrónico de barrido. En las plántulas de *C. chinense* se les realizó la desinfección de raíces y la infección de las

plántulas con zoosporas de *P. ultimum*, las raíces se observaron en microscopio óptico.

4^{er} ETAPA. Identificación de la expresión de genes que codifican las enzimas APX y PPO relacionadas con la respuesta a la infección por *P. ultimum*

Se desinfectaron semillas de *C. chinense* var. Chichen Itza Seminis®, la infección de las raíces emergentes, para después realizar la extracción de ARN total a partir del tejido de las raíces emergentes infectadas, la síntesis de cDNA, y por último se determinó la expresión de los genes que codifican las enzimas de APX y PPO por la realización de la qRT-PCR.

6.1 Esquema de la Estrategia Experimental



VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño *in silico* de oligonucleótido

Elegir los oligonucleótidos apropiados para el análisis de expresión de los genes que codifican las enzimas APX, PPO y actina, es de gran importancia para la PCR, debido a que un mal diseño de los mismos puede tener repercusiones como amplificar fragmentos inespecíficos. No se tienen reportes de cebadores para APX y PPO en *C. chinense*, por lo tanto, fue necesario diseñarlos.

Se realizó una búsqueda y selección *in silico* de secuencias conservadas de las enzimas APX y PPO relacionadas con el género *Capsicum* en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI). Posteriormente se alinearon las secuencias obtenidas con ayuda del programa en línea Multiple sequence alignment (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), con el propósito de ubicar los sitios conservados de las secuencias. Seguidamente se emplearon dos software en línea: NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) y primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Si bien el resultado de la RT-PCR puede verse afectado por varios factores, como la calidad de ARN, también es de suma importancia asegurar el diseño de los oligos. Por lo que una vez seleccionado el tamaño y la secuencia de los oligos, estos se analizaron con el software IDTOligoAnalyzed 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), para determinar la probabilidad de generar estructuras secundarias como hairpin, self-dimer, hetero dimer o mismatch, luego fueron sintetizados por la compañía Macrogen inc.

7.2. Desinfección de Semillas y Cultivo *in vitro* de *C. chinense*

Las semillas de *Capsicum chinense* var. Chichen Itzá utilizadas en este experimento fueron de la marca seminis®.

La desinfección se llevó a cabo en condiciones asépticas. Primero se enjuagaron con agua destilada estéril cuatro veces para eliminar el fungicida, después las

semillas fueron introducidas en etanol al 80% (v/v) por 5 min, seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril y posteriormente con hipoclorito de sodio al 30% (v/v) (Cloralex® 5%), adicionando una gota de Tween 20 por 15 min con movimientos constantes, por último, se realizaron cuatro enjuagaron con agua destilada estéril. Después de la desinfección las semillas, se depositaron en cajas Petri que contenían papel filtro humedecido, se dejaron en oscuridad por 7 días (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014).

Transcurrido los 7 días las semillas que presentaron radícula fueron depositadas individualmente en magentas de cristal con sustrato esterilizado en autoclave a 121°C por 20 min compuesto de 75% peat moos y 25% perlita, se les adiciono 10 ml de solución Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture (sigma-Aldrich), preparada según indicaciones del fabricante y diluido 1:5 v/v. Se incubaron en el cuarto de cultivo con una temperatura de 25±2°C, 40% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16/8 horas

7.3 Extracción de ARN y Síntesis de cDNA

Se tomaron plántulas de *C. chinense* cultivadas *in vitro* de 45 días después de la germinación se les realizó una extracción de ARN total empleando el protocolo TRIzol™ Reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para comprobar la integridad del ARN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, y se corrió durante 35 min a 80V en cámara de electroforesis (CBS, Scientific), con un marcador de masa molecular Trackit™ Invitrogen 100 bp. Para su digitalización se fotografió con un fotodocumentador UV (High Performance UV transilluminator).

La síntesis de cDNA se realizó usando Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit para APX y PPO y Verso 1-step RT-PCR Hot-Start para Actina empleado como gen de referencia, según indicaciones del fabricante.

7.3.1 Amplificación por RT-PCR de APX, PPO y actina

Para la amplificación de APX, PPO y actina (gen de referencia), se realizó una PCR punto final. La reacción se preparó en tubos de 0.2 ml con el kit Platinum® Taq DNA Polymerase (según indicaciones del fabricante); La mezcla de reacción contenía 1µl de cada oligo (Tabla 4), 5 µl de buffer 10x PCR, 1 µl de dNTP's 10mM, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1µl de DMSO, 0.2µl de Platinum® Taq y 2µl de la muestra de cDNA, en un volumen final de 50µl por muestra, ajustada con agua didestilada.

Se emplearon las siguientes condiciones en el termociclador: Desnaturalización inicial 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, un alineamiento de 58°C para APX, 53°C para PPO y 55°C para actina por 30 s, una extensión de 72 °C por 1min y una extensión final de 72°C por 5 min. Se empleó un testigo el cual no contenía cDNA sino agua didestilada, esto para la validación de la prueba de PCR. Para la comprobación de la amplificación de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo empleando el PureLink® PCR Purification kit siguiendo las indicaciones del fabricante, las muestras purificadas se almacenaron a -20°C y posteriormente fueron secuenciadas por la compañía MacroGen inc. Las secuencias recibidas fueron analizadas y limpiadas con el programa BioEdit (versión 7.2.5); una vez que se limpiaron las secuencias, se realizó un alineamiento en BLAST con otras secuencias reportadas en la base de datos de la NCBI.

7.3.2 Optimización de RT- PCR

La optimización se realizó empleando la Platinum® Taq y las condiciones descritas anteriormente, con variaciones únicamente en las temperaturas de alineamiento, donde se usaron temperaturas de 50°, 55°, 58°, 60°, 63°, 65°C, para cada uno de los juegos de oligos de APX, PPO y actina.

7.4 Descripción Morfológica de *P. ultimum*

La cepa utilizada fue *P. ultimum* (P233.08) obtenida de The Czech Collection of Phytopathogenic oomycetes bank of The Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening (RILOG).

Para la descripción morfológica de la cepa, se inoculo un fragmento de micelio (7.3mm de diámetro) en el centro de la placa cada 7 días en medio Agar dextrosa y papa (PDA Difco™), en medio V8 5% por 30 días y en agar-agua por 15 días en oscuridad a 25°C para promover la formación de estructuras vegetativas, reproductoras y de resistencia (. El micelio se observó en el microscopio óptico (Nikon, Eclipse E200) con tinción de azul de metileno.

Para corroborar la patogenicidad de la cepa se infectaron frutos de *C. chinense*, previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 20 min; en cada una de las resiembras que se realizaron.

7.4.1 Inducción de zoosporas de *P. ultimum*

La inducción de zoosporas se realizó tomando la cepa crecida en PDA por tres días de edad, se cortó en la periferia del cultivo fragmentos de 7.3 mm de diámetro; cada fragmento fue colocado en cajas Petri con medio agar-V8 al 5% e incubado en oscuridad por 7 días en la cámara bioclimática (Aralab®) a 25°C y 60% de humedad relativa. Transcurrido los días, se les agregó 15 ml de agua destilada estéril y se mantuvieron por 3 hr bajo luz indirecta; con ayuda del filo de un bisturí se efectuó un barrido del micelio (sin romper el agar-V8) y se colecto la solución que contenía las zoosporas en un vaso precipitado estéril (Pettitt *et al.*, 2002, modificado).

Para el conteo de las zoosporas se tomaron 10 µl de la solución recuperada, se depositaron en la cámara de Neubauer y se observó en microscopio (Nikon, Eclipse E200) a 40X. Para poder determinar la concentración de zoosporas por ml se aplicó la siguiente formula:

$$\text{Concentración (zoosporas/ml)} = \frac{\text{Número de zoosporas} \times 10,000}{\text{Número de cuadros}}$$

7.5 Evaluación de la susceptibilidad de *C. chinense* durante la infección por *P. ultimum*

Se emplearon semillas (*C. chinense* var. Chichen Itzá seminis®) y plántulas adquiridas en invernadero local, Las cuales fueron desinfectadas en condiciones aséptica (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014).

7.5.1 Evaluación de la susceptibilidad en plántulas de *C. chinense*

Se tomaron plántulas de *C. chinense* de 48 días después de la germinación, se eliminó el exceso de sustrato golpeando lentamente las raíces (Fig. 5a), después se enjuagando con agua corriente; las raíces completamente limpias (Fig. 5b), fueron sumergidas agua destilada estéril.



Figura 5. Limpieza de raíces de *C. chinense*. A) Eliminación de sustrato. B) Raíz limpia

Para realizar la desinfección de las raíces, estas se depositaron en una solución de alcohol al 80% (v/v) por 5 min, luego se enjuagaron con agua destilada estéril, después se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) (Cloralex® 5%) adicionado con una gota de tween 20 por 15 min, se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014) y se depositaron en charolas de plástico con 4 L solución Hoagland's; preparadas con soluciones stock del 1-6 (ver anexo 1.). Se les colocó una bomba de aire para oxigenar el agua y se dejaron toda la noche para corroborar su integridad antes de la infección (Fig. 6).



Figura 6. Aclimatación de Plántulas con solución hoagland's para posterior infección con *P. ultimum*

Para la infección de las plántulas se preparó en una charola de plástico 3 L de agua destilada estéril adicionada con 1.02×10^4 zoosporas/ml. Se tomaron 30 plántulas a las cuales se les realizó un corte en la base del tallo con el filo de un bisturí. Se sumergieron las raíces en la solución de zoosporas, la evaluación se realizó a 24, 96 h y a los 7 días pos-infección en cultivo hidropónico, las cuales se fotografiaron y se observaron en el microscopio óptico (Nikon, Eclipse E200).

Se emplearon 30 plántulas como testigo del experimento, a las cuales se les realizó el mismo corte en la base del tallo, y se sumergieron en 3 L de agua destilada estéril, sin solución de zoosporas y se evaluaron de la misma forma que las plántulas infectadas.

7.5.2 Evaluación de la susceptibilidad en raíces emergentes de *C. chinense*

Las Semillas desinfectadas se pusieron a germinar en papel filtro en oscuridad (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014); después de 7 días en oscuridad se tomaron 46 semillas que presentaron radícula emergente las cuales se midieron (Fig. 7a y 7b) y se separaron en dos tratamientos; los testigos se sumergieron en 100 ml de agua destilada estéril y el grupo infectado se sumergieron en una solución preparada con el total de micelio crecido en caja petri en agar-V8 5% cortado en fragmentos y depositado en 100ml de agua destilada estéril e incubado por un día en cámara bioclimática (Aralab®) en condiciones de oscuridad a 25°C y 60% de humedad relativa.

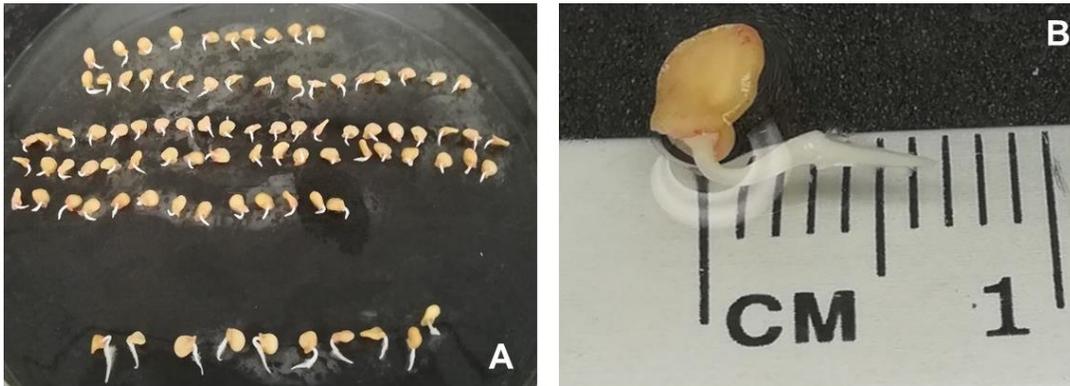


Figura 7. Raíces emergentes. A) Tamaño de la radícula después de 7 días en oscuridad. B) Medición de la radícula antes de la inoculación

Cada una de las raíces emergentes de los dos tratamientos fueron depositadas individualmente en cajas Magenta® (Fig. 8) con 30 ml de medio agar, preparado con MS (Murashigue y Skoog 4.3g, 30g de sacarosa y 2.2g Phytigel). Se incubaron en la cámara bioclimática en oscuridad y se realizó la evaluación de la susceptibilidad de *C. chinense* por medio de la escala de patogenicidad (Tabla 3) y midiendo el crecimiento de la radícula a las 24 y 96 horas pos inoculación.

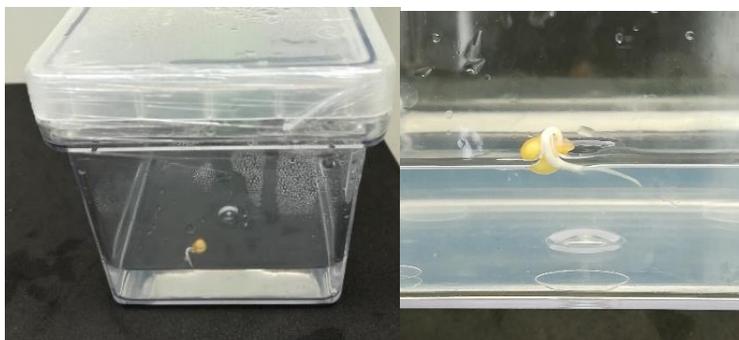


Figura 8. Semilla emergente depositada en caja magenta

Tabla 3. Escala de Evaluación para la patogenicidad de la radícula de *C. chinense* inocula con *P. ultimum*

Escala de Patogenicidad	
Grado de Daño	Síntomas
0	Síntomas no visibles
1	Radícula ligeramente necrótica 1-30%
2	La radícula necrótica de 31-60%
3	La radícula necrótica 61-90%
4	La radícula necrótica $\geq 91\%$

Modificado de (Sabbagh *et al.*2018)

7.5.2.1 Microscopia Electrónica de Barrido

Las raíces emergentes testigo e infectadas con *P. ultimum* después de las 24 y 96 h se fijaron en solución FAA (Formaldehído 10%, Ácido acético 5% y Etanol 50% v/v/v), durante dos horas al vacío. Después de la fijación el tejido se deshidrató en gradientes de etanol al 70% dos veces por 2 min, después 85% 95% y 100% v/v por intervalos de 15 min, para luego depositarlas en etanol al 70% (v/v). Para la preparación del tejido este se depositó dos veces en etanol al 100% por intervalo de 15 min y se realizó el secado a punto crítico en el secador (Tousimis Sandri-795®), intercambiando el etanol con CO₂ líquido y CO₂ gaseoso; por ultimo las muestras se montaron en una película de carbón adhesivo y se cubrieron con un metalizado de oro (Denton Vacuum Desk II®). Las muestras se visualizaron en el Microscopio Electrónico de Barrido JEOL modelo JSM-6360LV®.

7.6. Identificación de la expresión de genes que codifican para APX y PPO en *C. chinense* infectado con *P.ultimum*

La extracción de ARN total se realizó tomando los tejidos de raíces emergentes infectadas y testigo del experimento anterior en tiempo 0 y 24h y empleando el kit ZR Plant RNA MiniPrep™, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (mencionado antes), para verificar la calidad del ARN extraído. Se cuantificó el total de ARN obtenido, con el Quantus™ Fluorometer (Promega). Todas las muestras se ajustaron a una concentración de 20ng/μl. Para la síntesis de cDNA se empleó Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, según indicaciones del fabricante.

7.6.1 Condiciones de RT-qPCR

La RT-qPCR se llevó a cabo en placas de 96 pozos con un sistema de PCR en tiempo real PikoReal 96 y software PikoReal 2.1 (Thermo Scientific) utilizando el ensayo de PCR basado en SYBR Green. Cada mezcla de reacción contenía 10 μl de SYBR Green Master Mix 2x (Thermo Scientific), 1 μl de cada cebador (Tabla 4) y 3 μl de cDNA hasta un volumen final de 20 μl. Se sometió a las siguientes condiciones: 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 1 min y una extensión final de 72°C durante 5 min. Las melting curve se analizaron a 60-95°C después de los 35 ciclos. Cada análisis se realizó por triplicado, y el análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics Centurion 16.1.11.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1 Diseño de oligonucleótidos

De la búsqueda de secuencias realizada en la base de datos de la NCBI, sólo se eligieron cinco para cada enzima, relacionadas con el género *Capsicum*. Dichas secuencias se alinearon con el software en línea Multiple sequence alignment, donde se determinaron los sitios conservados. Ubicados los sitios conservados, se tomó una de las cinco secuencias las que presentara más similitud con la secuencia consenso dado por el programa; a esta secuencia se le realizó un análisis para determinar los oligonucleótidos, con dos softwares en línea: NCBI y primer3, se obtuvieron un total de catorce pares de oligonucleótidos, se eligieron tres pares para cada una de las enzimas (Tabla 4) los cuales se verificaron que se encontrara en los sitios conservados.

Se determinó que los oligonucleótidos diseñados de APX y PPO presentan una delta mayor (ΔG) que oscila entre -3.61 a -13.19 y -1.95 a 6.76 respectivamente. Los oligonucleótidos sintetizados presentan temperaturas de alineamiento que van de 58.4 a 62.5 para APX, 56.4 a 58.4 PPO y 58.8 y 60.5 para actina (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos diseñados para los ensayos de RT-qPCR de APX, PPO y Actina

Nombre	Secuencia	Tm	Máxima ΔG
APX1F	TGTGCTCCTCTTATGCTCCG	60.5	-3.61
APX1R	ACCTCAACAGCAACAACACG	58.4	-3.61
APX2F	GCWGGTGTGTTGTTGCTGTTGA	58.4	-5.09
APX2R	GCATCAGGCAAGCGACCTTC	62.5	-4.67
APX3F	ATGCTCCGTCTHGCATGGCAC	63.3	-8.96
APX3R	CTTCCCAAGGTATGGCCACC	62.5	-13.19
PPO1F	GGTCTCTATGGTGTTGCTAA	56.4	-3.14
PPO1R	GGTCTCTATGGTGTTGCTAA	58.4	-6.76
PPO2F	GATTACGCACCAATGCCAC	60.5	-5.09
PPO2R	GTATAGCTCCCCGCGAACTC	62.5	-6.34
PPO3F	TTCTACTCAGCTGGTTTGA	56.4	-1.95
PPO1R	GGTCTCTATGGTGTTGCTAA	58.4	-6.76
*PRIMER_2_F_ACTINE	ACTGGTGTGATGGTTGGCAT	58.4	-3.43
*PRIMER_2_R_ACTINE	GATGGGAAGTGTGTGGCTGA	60.4	-3.14

*Chan, 2016 no publicado.

8.2 Amplificación de APX

Para determinar los oligonucleótidos adecuados para el análisis de expresión se realizó un ensayo de amplificación en PCR punto final donde se usaron los oligonucleótidos APX3F y APX3R (Tabla 4), el resultado de la reacción se presenta en la figura 9, donde se observa en el primer carril el marcador de masa molecular, en el segundo carril el amplificado por RT-PCR de una banda que corresponde a 395 pb aproximadamente y el ultimo carril el control negativo el cual sirvió para la validación de la reacción.

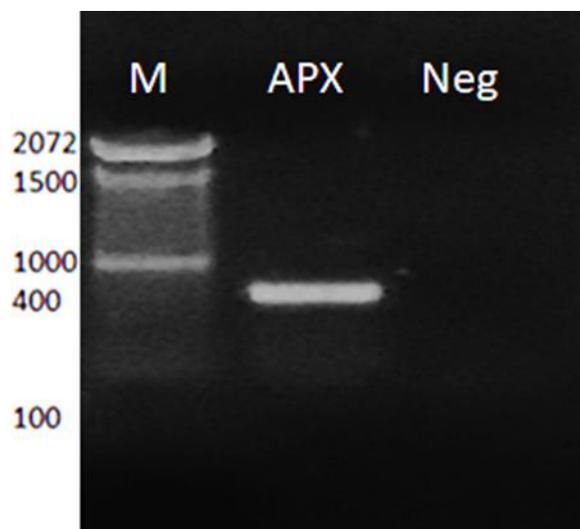


Figura 9. Amplificado de APX: M) Marcador de masa molecular. APX) Amplicón de Ascorbato peroxidasa con 365 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR

8.2.1 Análisis de la secuencia de APX

El fragmento obtenido de APX fue purificado y se mandó a secuenciar a la empresa MacroGen inc. Las secuencias recibidas se analizaron y limpiaron con el programa BioEdit, posteriormente se alinearon en el programa multAlin para corroborar su similitud, la secuencia obtenida de 304 pb fue analizada y se realizó un alineamiento (NCBI-BLAST), donde se obtuvo un 99% de identidad con ascorbato peroxidasa de la especie *C. annum* y *C. chinense* (Tabla 5), además se realizó el cladograma donde se observa que la secuencia analizada (en rojo) se ubica dentro del clado que agrupa a los miembros del género *Capsicum*, con lo que se confirmó que lo que se obtuvo es APX de *Capsicum* (Fig. 10). La secuencia fue registrada en la base de datos de la NCBI con el número MG911728.

Tabla 5. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicón de APX

Descripción	Max Score	Total Score	Query cover	E value	Ident	Accesión
Capsicum annuum L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic-like (LOC107873435), mRNA	564	564	99%	1e-157	99%	NM 001325038
Capsicum annum L-ascorbate peroxidasa 1 cytosolic-like (LOC107873435), transcript variant X3, misc, RNA	564	564	100%	8e-157	99%	XR 001675330.1
Capsicum annum L-ascorbate peroxidasa 1 cytosolic-like (LOC107873435), transcript variant X2, mRNA	564	564	100%	8e-157	99%	XM 016720285.1
Capsicum chinense CcAPX mRNA for ascorbate peroxidase partial cds	564	564	100%	8e-157	99%	AY078080.1

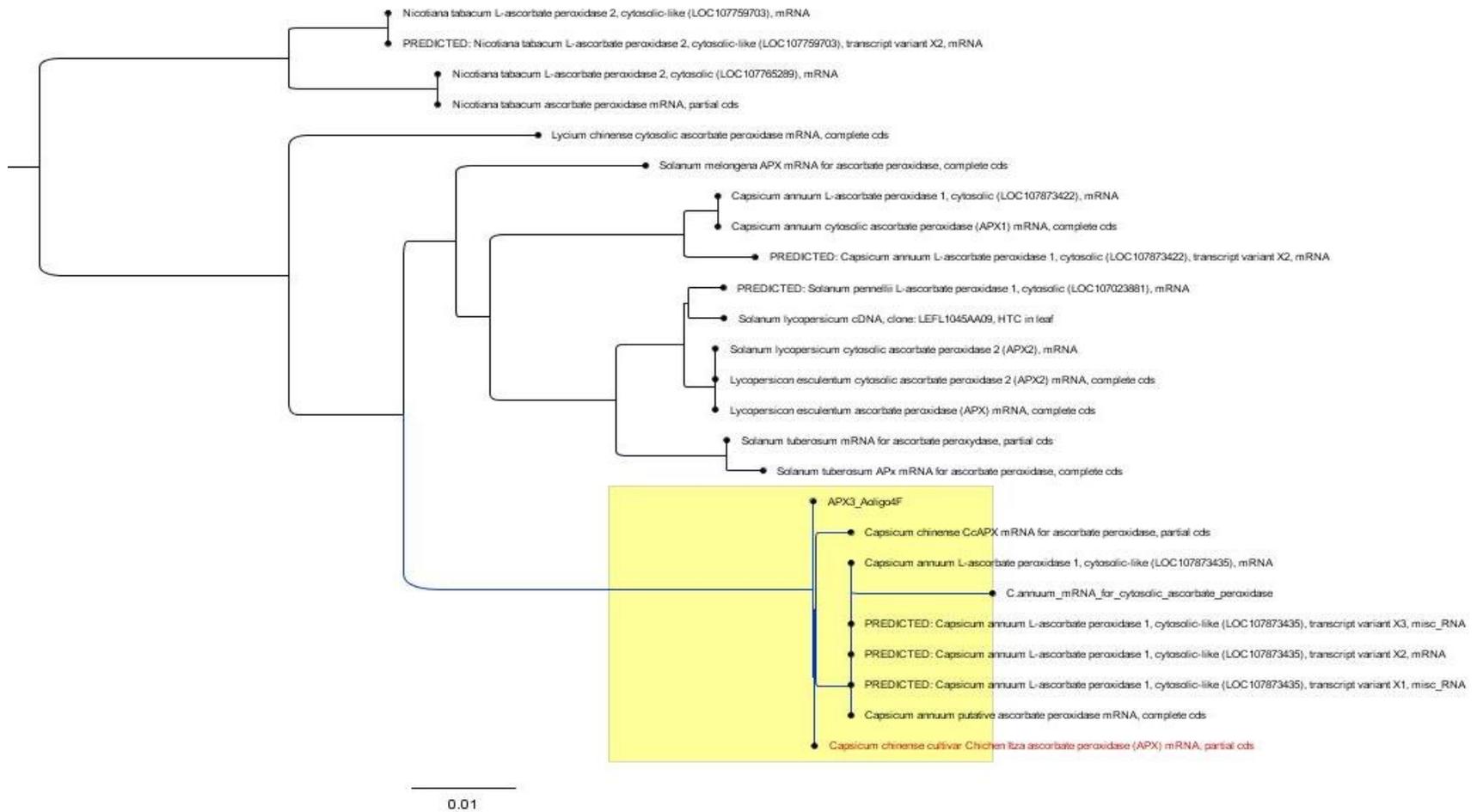


Figura 10. Cladograma de APX. En amarillo el clado del género *Capsicum* y en rojo la secuencia amplificada

8.3 Amplificación de PPO

Para determinar los oligonucleótidos adecuados para el análisis de expresión se realizó un ensayo de amplificación en PCR punto final (condiciones mencionadas antes) donde se usaron los oligonucleótidos PPO1F y PPO1R (Tabla 4), el resultado de la reacción se presenta en la figura 11, donde se observa en el primer carril el marcador de masa molecular, en el segundo carril el amplificado por RT-PCR con banda que corresponde a 536 pb aproximadamente y el ultimo carril el testigo negativo el cual sirvió para la validación de la reacción.

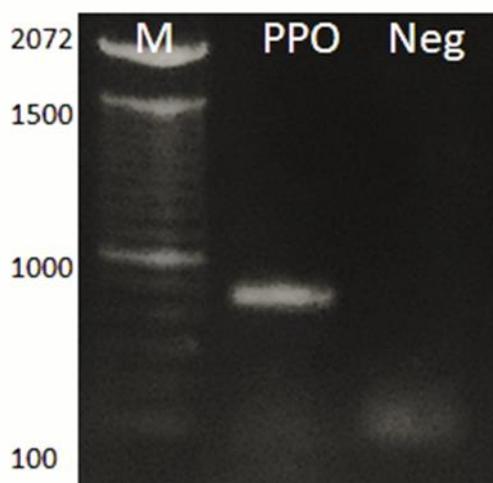


Figura 11. Amplificado de PPO: M) Marcador de masa molecular. PPO) Amplicón de Polifenol oxidasa con 536 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR

8.3.1 Análisis de la secuencia de PPO

El fragmento obtenido de PPO fue purificado y se mandó a secuenciar por la empresa Macrogen inc. Las secuencias recibidas se analizaron y limpiaron con el programa BioEdit. Se obtuvo una secuencia preliminar de 431 pb (Fig. 12), la cual fue analizada (NCBI-BLAST), donde se encontró que presenta una similitud de 85 a 92 % con polifenol oxidasa de la especie *C. annum* (Tabla 5), de igual manera se realizó el cladograma donde se observa la secuencia analizada (en rojo) se ubica

dentro del clado que agrupa a los miembros del género *Capsicum*, con lo que se confirmó que lo que se clono el gen de PPO de *Capsicum* (Fig. 13).

```
>PPO1_Poligo1R
GCTTAGTAGTACATCTATGGACGGGAGAAGCCACGAGTTATGAACTTGTAACCTC
TTTGCCACCTATTATGTAAGCACCATTGCAATAAGCACAATGGATATTGGCTTGT
TGCTTAAACCCAAGAGGGTTTAAAGGATCGGTTTTATCAAGTTCCTTCATTTTGC
TAATGGCCAAATTGTAAGTGGCAATATACTCCTCATCAGCATTGAGCAGGGGG
AACGGATACGGAGCTTGGTCATGGTAGGAACTTGTAGTATGGAATGTTGTCAT
AATTATCTGGAATAGGAGGGGGGCAACAACACTAGGTACTATTGGACCATTTTCTA
TGATGGCTCTAGAACCATAATTTTAAACATGGGATGGTGAAGAGTAATAGATG
ATGCTGATAAAGGTGCAGGATCACATAAACACCAACACCAATACCAACCA
```

Figura 12. Secuencia preliminar de PPO obtenida por amplificación y secuenciación de cDNA de *C. chinense*

Tabla 6. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicón de PPO

Descripción	Max Score	Total Score	Query cover	E value	Ident	Accesión
<i>Capsicum annuum</i> polyphenol oxidase B, chloroplastic-like (LOC107860389), mRNA	427	427	70%	1e-115	92%	XM 016705729.1
<i>Capsicum annuum</i> protein unc-50 homolog (LOC107840224) mRNA	405	405	67%	5e-109	91%	XM 016684022.1
<i>Capsicum annuum</i> polyphenol oxidase B, Chloroplastic-like (LOC107851011), mRNA	401	401	69%	7e-108	91%	XM 016695899.1
<i>Capsicum annuum</i> polyphenol oxidase B, chloroplastic-like (LOC107871326) mRNA	319	319	71%	4e-83	85%	XM 016718232.1

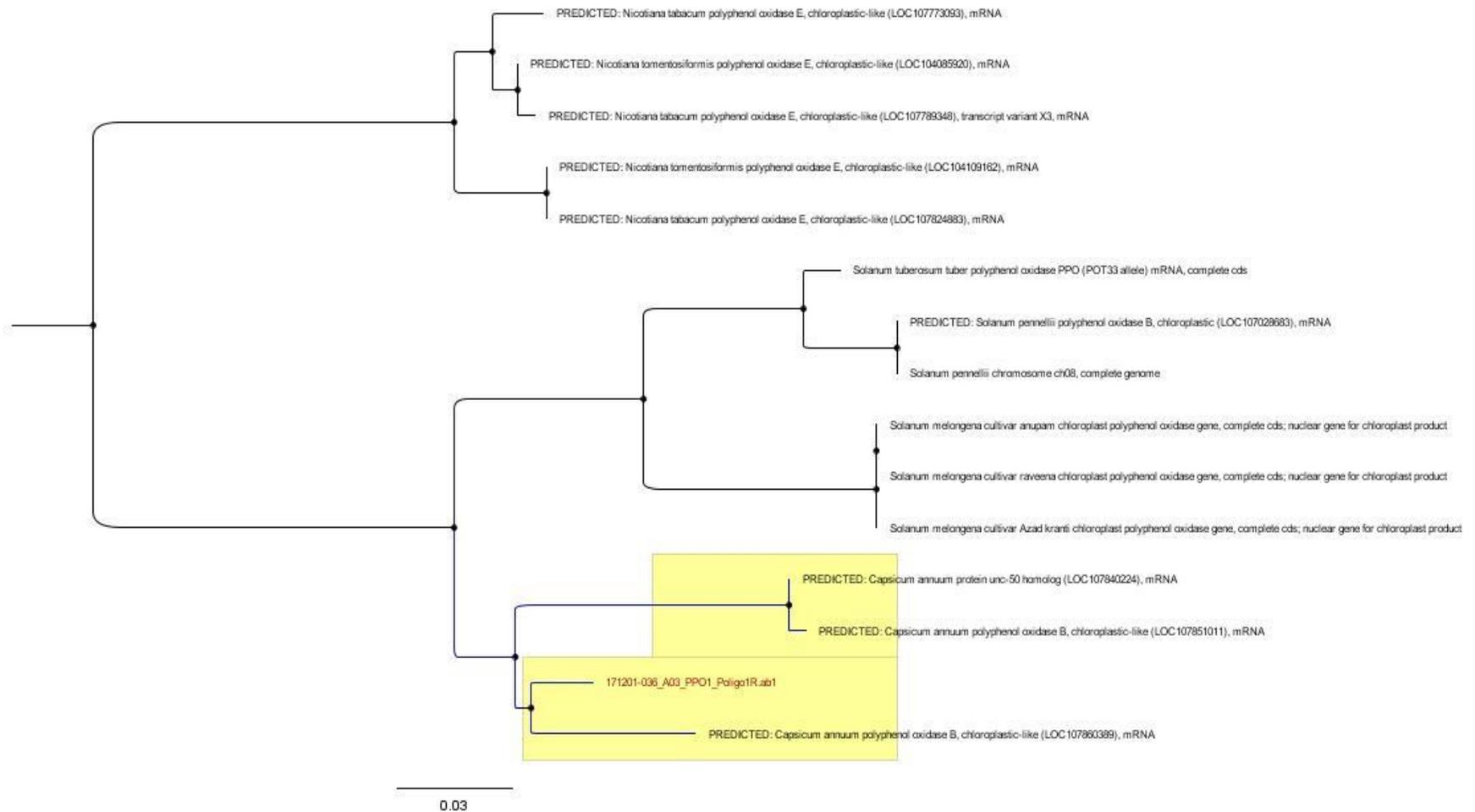


Figura 13. Cladograma para la secuencia de PPO. En amarillo el clado donde se ubica el género *Capsicum* y en rojo el amplicón de PPO

8.4 Amplificación y Análisis de la secuencia del gen de referencia para la RT-PCR

Para poder realizar la tercera fase del trabajo de investigación se requirió un gen de referencia, por lo que se seleccionó Actina. Se realizó un ensayo de amplificación de PCR punto final con las mismas condiciones mencionadas antes y empleando los oligonucleótidos PRIMER_2_F_ACTINE y PRIMER_2R_ACTINE (Tabla 4), el resultado de la reacción de RT-PCR se puede observar en la figura 14, donde se puede apreciar en el primer carril el marcador de masa molecular, el segundo carril el amplificado de aproximadamente 350pb y el tercer y último carril, el testigo negativo de la reacción.

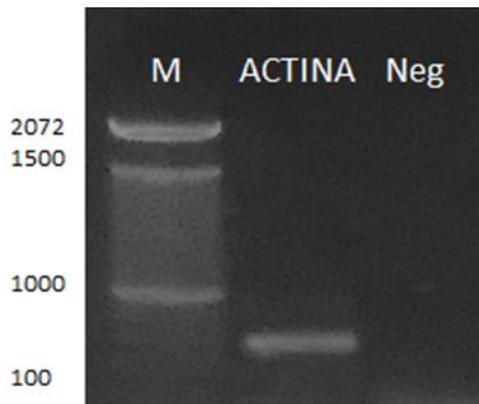


Figura 14. Amplicón de Actina. M) Marcador de masa molecular, amplicón de actina con 350 pb aprox. Neg) Testigo negativo de la reacción de RT-PCR

El fragmento obtenido de Actina fue purificado y se mandó a secuenciar por la empresa Macrogen inc. Las secuencias recibidas se analizaron y limpiaron con el programa BioEdit. Se obtuvo una secuencia consenso de 355 pb (Fig. 15), la cual fue analizada en NCBI-BLAST, donde se encontró que representa una similitud del 99% con el gen de actina de la una secuencia parcial de la especie *C. chinense* (Tabla 7), de igual forma se realizó el cladograma, donde la secuencia amplificada (en rojo) se ubica dentro del clado que agrupa a los miembros del género *Capsicum* (Fig.16).

```

>ConsensusACTINE_2ACTINE
GRGAGTGGCATGGGCCAGAAAGATGCGTATGTTGGTGACGAGGCTCAATC
CAAAGGGGTATTTTGACTTTGAAATATCCAATTGAACATGGTATTGTTAGC
AACTGGGATGACATGGAGAAGATTGGGCATCATACCTTTTACAATGAACTTC
GTGTGGCTCCAGAGGAGCACCCAGTTCTCCTCACAGAAGCTCCTCTTAACC
CAAAGCCAATCGAGAGAAGATGACTCAGATCATGTTTGAAACCTTCAACA
CCCCTGCCRTGTATGTTGCRATTGAGGCCGTCCTTTCCCTCTATGCCAGTG
GACGTACAACCTGGAATTGTGCTGGATTCTGGAGATGGTGTGAGCCAG

```

Figura 15. Secuencia consenso de actina de 355pb obtenida por amplificación y secuenciación de cDNA de *C. chinense*

Tabla 7. Análisis BLAST en la base de datos de la NCBI para el amplicón de Actina

Descripción	Max Score	Total Score	Query cover	E value	Ident	Accesión
PREDICTED: <i>Capsicum annum</i> actin-66 (LOC107843797), mRNA	664	664	97%	0.0	99%	XM 016688188.1
<i>Capsicum chinense</i> partial mRNA (act gene)	664	664	97%	0.0	99%	AM168448.1
PREDICTED: <i>Solanum tuberosum</i> actin-(Tom52), mRNA	610	610	97%	1e-170	97%	NM 001345841.1
PREDICTED: <i>Solanum tuberosum</i> actin-66 (LOC102597225), mRNA	610	610	97%	1e-170	97%	XM 006351284.2

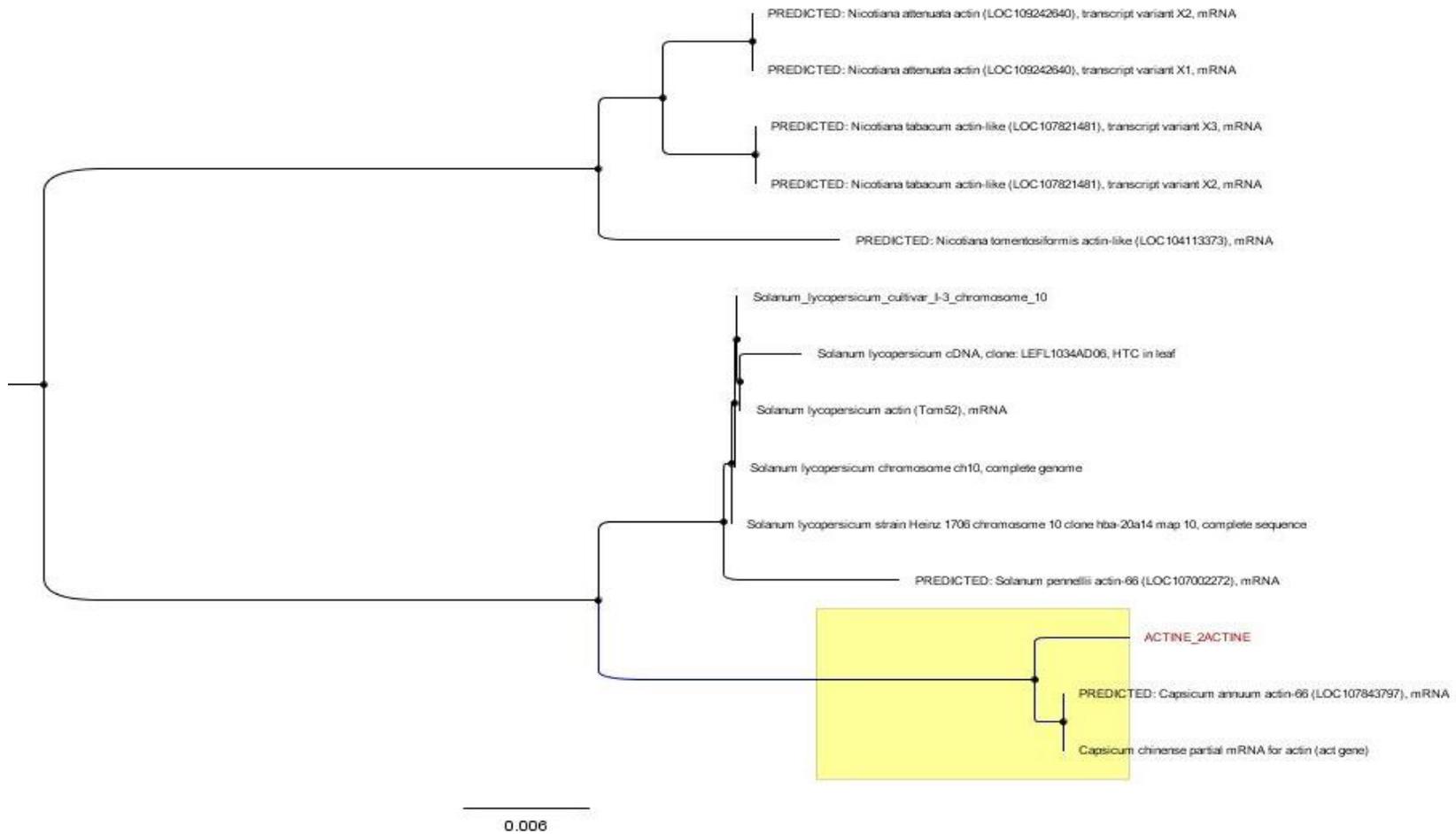


Figura 16. Cladograma de la secuencia de actina. En amarillo el clado donde se ubica el género *Capsicum* y en rojo el amplicón de actina

8.5 Optimización de RT-PCR

Una vez corroborado que los amplificadores de PCR fueron homólogos para cada uno de los genes que codifican las enzimas APX, PPO y Actina, se realizó una optimización para la qPCR, determinar la temperatura de alineamiento adecuado para cada uno. Para comprobar la amplificación de los productos de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Las fotografías se muestran en la figura 17a para APX, 17b para PPO y 17c para actina. Con este experimento se acordó la temperatura adecuada para determinar el análisis de expresión de los genes de APX y PPO por RT-qPCR; se observa amplificadores en todas las temperaturas, sin embargo, se consideró 60°C como temperatura óptima para la qPCR, debido a que es la temperatura más acorde a la cual trabajan los oligonucleótidos.

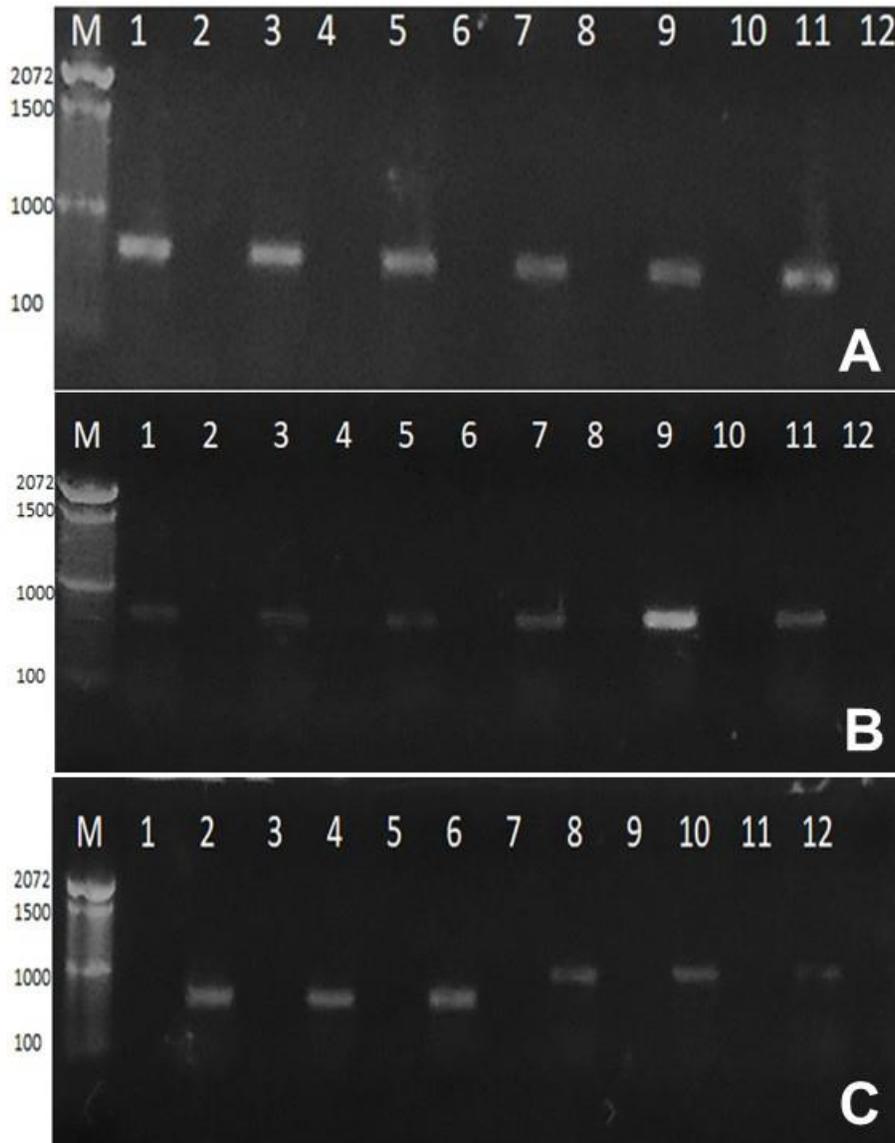


Figura 17. Optimización de la RT-PCR. A) APX, B) PPO y C) actina. Para todos los casos M) marcador de masa molecular. 1A Y 1B) cDNA a Tm de 50°C, 2A y 2B) testigo negativo de Tm 50°C, 3A y 3B) cDNA a Tm de 55°C, 4A y 4B) testigo negativo de Tm 55°C, 5A y 5B) cDNA de Tm de 58°C, 6A y 6B) Testigo negativo de Tm de 58°C, 7A y 7B) cDNA de Tm de 60°C, 8A y 8B) Testigo negativo de Tm de 60°C, 9A y 9B) cDNA de Tm de 63°C, 10A y 10B) Testigo negativo de Tm de 63°C, 11A y 11B) cDNA de Tm de 65°C, 12A y 12B) Testigo negativo de Tm de 65°C. 1C) Testigo negativo de Tm de 50°C, 2C) cDNA de Tm de 50°C 3C) Testigo negativo de Tm de 55°C, 4C) cDNA a Tm de 55°C, 5C) Testigo negativo a Tm de 58°C, 6C) cDNAa Tm de 58°C, 7C) Testigo negativo de Tm de 60°C, 8C) cDNA de Tm de 60°C, 9C) Testigo negativo de Tm de 63°C, 10C) cDNA de Tm de 63°C, 11C) Testigo negativo de Tm de 65°C, 12C) cDNA de Tm de 65°C.

8.6 Descripción Morfológica de *P. ultimum* en diferentes medios de crecimiento

El crecimiento de la cepa se evaluó en medio PDA, V8 y agar agua, medios comúnmente empleados para describir la morfología de la colonia (Gilchrist *et al.*, 2005). En medio PDA se observa el crecimiento de manera irregular con el micelio aéreo en forma algodonosa (18 A), similar al crecimiento que reporta *P. myriotylum* en el mismo medio (Kageyama, *et al.*, 1998; Kageyama, 2014), el crecimiento en V8 (Fig. 18B), no presenta un patrón especial de crecimiento, pero es especialmente utilizado para la producción de zoosporas (Dandurand *et al.*, 1994; Wulff *et al.*, 1998; Pettitt *et al.*, 2002; Owen-Going *et al.*, 2003; Hultberg *et al.*, 2010) y en el medio agar agua el crecimiento es ramificado en forma de árbol (Fig. 18 C y D) donde las hifas crecen dentro del agar, es decir denominadas intramatriales (Middleton, 1943) y no sobre él como sucede en el medio PDA y V8. El agar agua es empleado para aislamiento (Tsukiboshi *et al.*, 2007), así como para mantenimiento (Paulitz y Baker 1988).

El crecimiento del micelio (Fig. 19 A), se observa de forma irregular, con filamentos cilíndricos, hialinos y cenocíticos (Middleton, 1943; Plaats-Niterink, 1981). De igual manera se pueden observar hinchazones hifales (Fig. 19 B), que en *P. ultimum* corresponden a los esporangios, los cuales no producen zoosporas, pero pueden ser infectivas (Ho, 2011).

Las especies de *Pythium* para su clasificación se basan en la morfología de las estructuras sexuales y asexuales (Plaats-Niterink, 1981). Para *P. ultimum* se observaron oosporas apleróticas globosas sin ornamentaciones (Fig. 19 C); los oogonios globosos lisos terminales (Fig. 19 D) e intercalares (Fig. 19 E), estructuras similares a las reportadas por (Cannon, 2005; Tsukiboshi *et al.*, 2007; Schroeder *et al.*, 2013). La morfología y la temperatura a la cual creció la cepa confirma que se trata de *P. ultimum* var. *ultimum* (Plaats-Niterink, 1981).

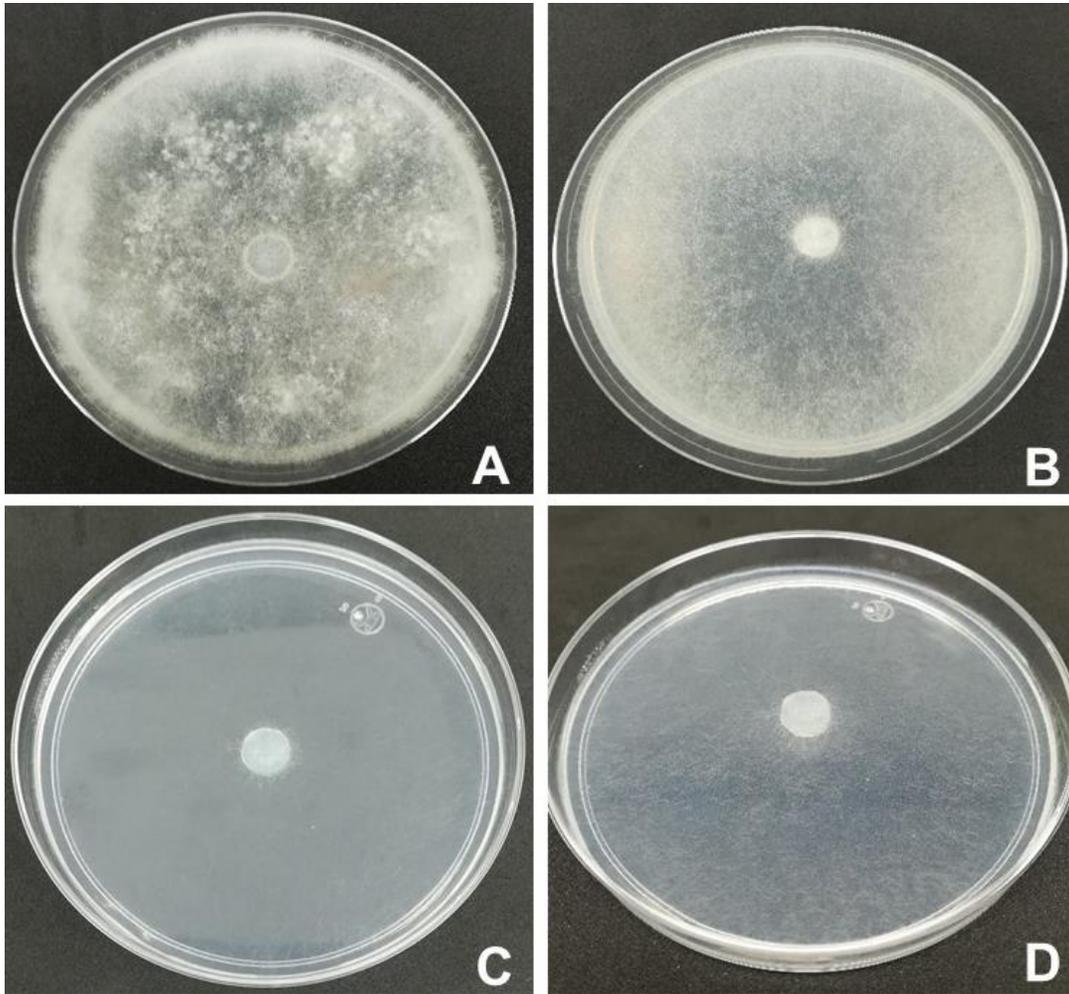


Figura 18. Patrón de crecimiento de *P. ultimum* en diferentes medios. A) En agar dextrosa y Papa, B) En V8 5% clarificado, C) Agar-agua

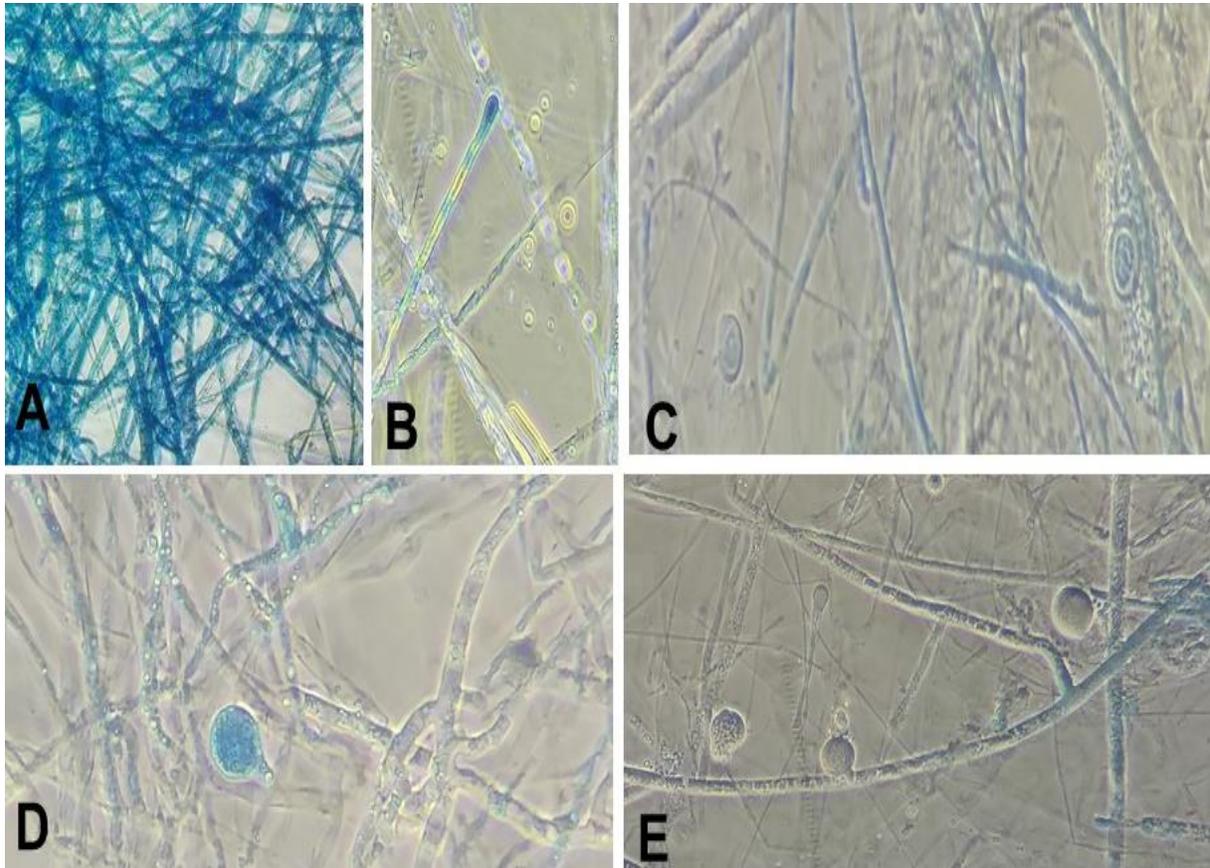


Figura 19. Estructuras vegetativas y de reproducción de *P. ultimum*. A) Hifas cenocíticas con crecimiento irregular, B) inchazones hifales, C) Oosporas aplerótica, D) Oogonio globoso terminal, E) Oogonios globosos intercalares

8.7. Evaluación de Patogenicidad de *P. ultimum* en plántulas infectadas de *C. chinense*

Se evaluaron plántulas en cultivo hidropónico a los 3 días pos-infección (Fig. 20 A), el 100% presentaban síntomas característicos de damping-off y root rot, tales como doblamiento del tallo, marchitamiento y defoliación, así como necrosis en raíces y disminución de las misma en comparación de las plántulas no infectadas (20 B), en el agua se pudo observar emergencia de hifas los cuales se sujetaban de las raíces de las plántulas de *C. chinense*, los síntomas son similares a los reportados en *C. annum var. annum*, *C. frutescens*, *Zea mays*, *solanum tuberosum* y *Pinus* spp. (Farr y Rossman, 2019) y en plantas ornamentales como crisantemo (Tsukiboshi *et al.*, 2007), geranio y Poitessia (Del Castillo y Hausbeck, 2016)

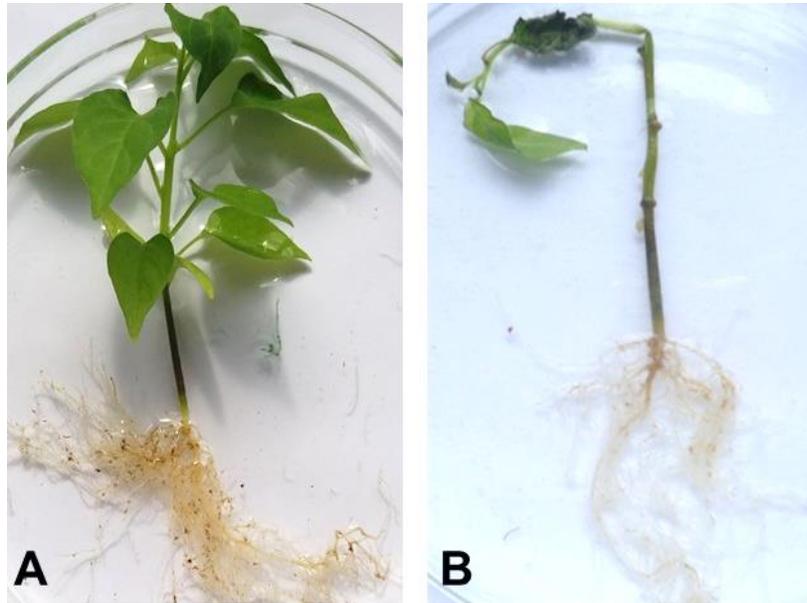


Figura 20. Plántulas de *C. chinense* en cultivo hidropónico con 3 días pos-inoculación con zoosporas de *P. ultimum*. A) Plántulas testigo, B) Plántulas infectadas con presencia de damping-off

De igual forma se observaron las raíces sanas e infectadas en microscopio (Nikon, Eclipse E200) y se fotografiaron con cámara Samsun® de 10X, se aprecia el crecimiento de abundante micelio formado por hifas extramatriacales e intramatriacales (Middleton, 1943) a lo largo de la raíz de *C. chinense* (Fig. 21 B y C), presencia de clamidosporas de *P. ultimum* dentro y fuera del tejido de la raíz (Fig. 21 C y D) a diferencia del testigo (Fig. 21 A) en el cual no se observa presencia de *P. ultimum*. (Green y Jensen, 2000) menciona que el crecimiento hacia afuera del micelio en las raíces de las primeras plántulas infectadas es la principal forma de inóculo de *P. ultimum* var. *ultimum*, hacia las plántulas adyacentes, lo que provoca la propagación de damping-off en todo el cultivo.

Por lo tanto, a los tres días pos-infección con la cantidad de zoosporas empleadas en el experimento fue suficiente para que el micelio *P. ultimum* creciera dentro y fuera de las raíces de *C. chinense* y se tuvieran los primeros síntomas de Damping-off.

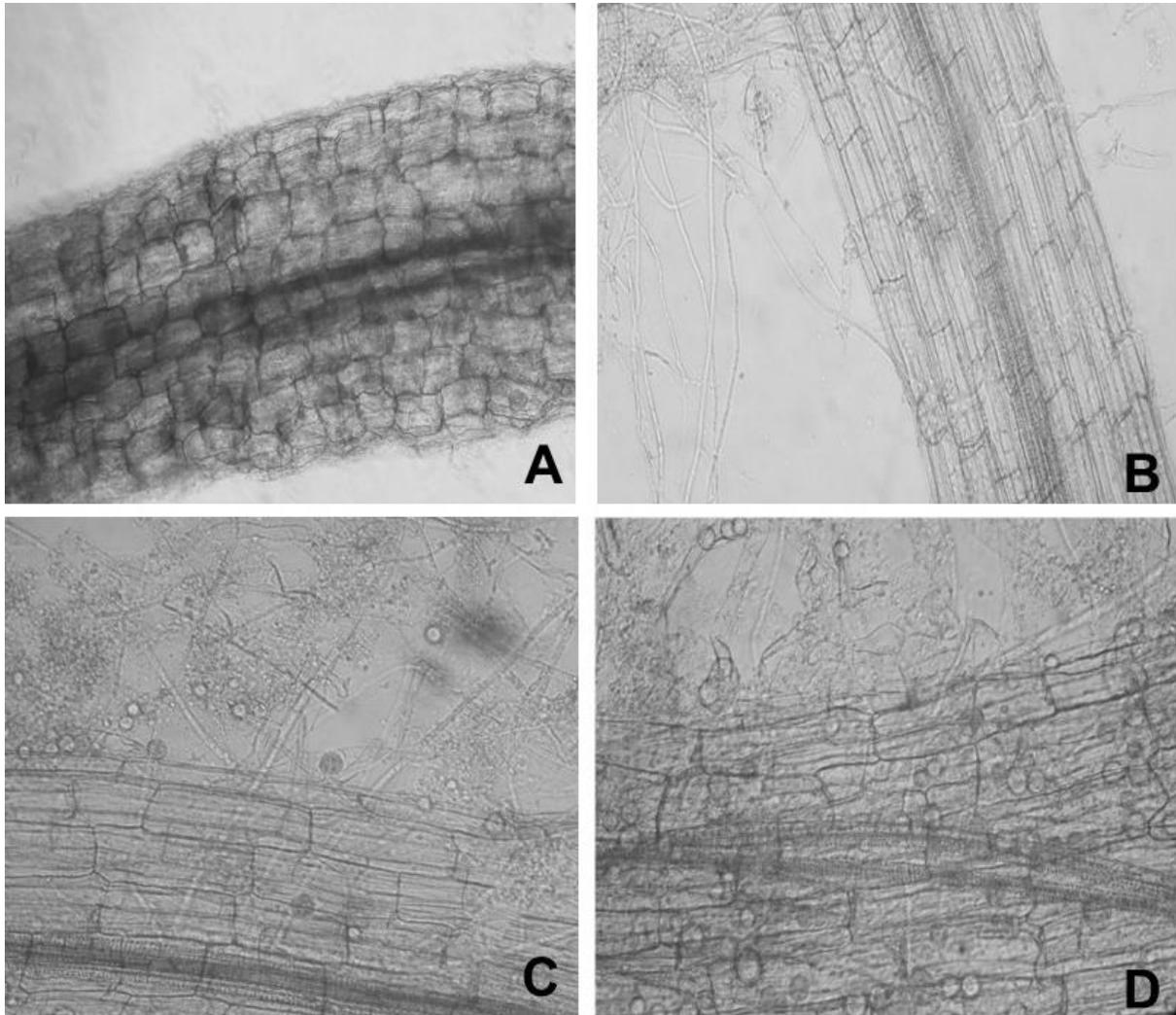


Figura 21. Raíces de *C. chinense* vistas al microscopio con 3 días pos-inoculación con zoosporas de *P. ultimum*. A) Raíz testigo, B) Hifas a lo largo de la raíz, C Y D) Presencia de oospora en la raíz

Para los siete días después de la infección los síntomas del damping-off ya eran más severos con respecto a las plantas testigo (Fig. 22 A). En las plántulas infectadas el 100% presentaba necrosis completa con desprendimiento de hojas (Fig. 22 B), y root rot en las raíces las cuales tenían presencia de micelio y se desprendían con facilidad (Fig. 22 C), síntomas similares reportados en *Euphorbia pulcherimma*, *Gazania rigene*, *Ocimum basilium* y *Actinidia deliciosa* después de siete días pos inoculación con *P.ultimum var ultimum* (Palmucci, 2015)



Figura 22. plántulas de *C. chinense* en cultivo hidropónico con 7 días pos-inoculación con zoosporas de *P. ultimum*. A) Plántula testigo, B) Presencia de damping-off, C) Presencia de root rot

Las fotografías tomadas para las raíces de siete días después de la infección muestran presencia de hifas cenocíticas y esporangios en la superficie de las raíces (Fig. 23 C y D), así como presencia de oósporas apleróticas (Fig. 23 E), en comparación con las raíces de las plántulas testigo que se observan completamente sanas (Fig. 23 A y B).

A los siete días pos-inoculación es posible observar sobre el tejido de las raíces estructuras de reproducción como esporangios, oósporas y la liberación de zoosporas, al respecto (Johnson, 1983) refiere que la generación de zoosporas que surgen de los esporangios formados sobre las raíces infectadas en un cultivo hidropónico son la segunda forma de infección de *P. ultimum* para continuar la propagación del damping-off y el root rot.

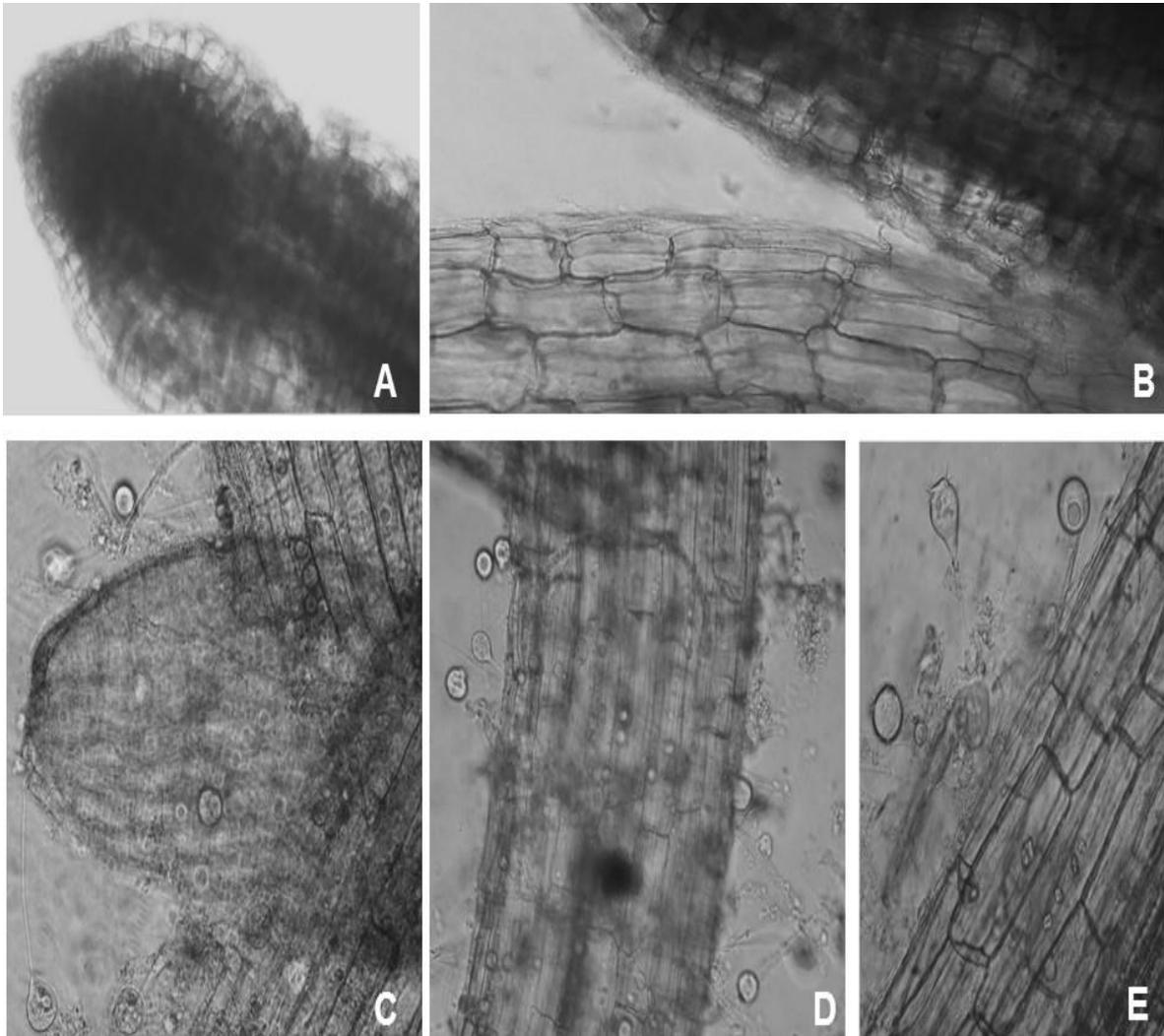


Figura 23. Estructura de reproducción de *P. ulimum* en raíces de *C. chinense*. A y B) Testigo, C y D) Esporangios ovales terminales sostenidos por el esporangióforos, E) Oóspora aplerótica

8.7. Evaluación de la patogenicidad de *P. ultimum* en raíces emergentes

El grado de daño ocasionado por *P. ultimum* en raíces emergentes se evaluó según la escala de patogenicidad (Tabla 3). Las raíces inoculadas en emergencia a las 24 hr muestran un poco más del 90% ubicado entre 1 y 3 de grado de daño, en comparación con las raíces emergentes del testigo que a las 24 hr el 95.7 % no muestra ningún daño. A las 96 hr el daño en las raíces emergentes inoculadas fue de 96.47%, de las cuales el grado 2 fue el de mayor porcentaje seguido de 4, 3 y 1, en comparación con el testigo el cual 86.96% no presenta ningún daño (Tabla 8).

Tabla 8. Evaluación del grado de daño ocasionado por *P. ultimum* en radícula de *C. chinense* a la 24 y 96 h pos-inoculación.

Grado de daño	24h pos-inoculación		96h pos-inoculación	
	Testigo (%)	Inoculado (%)	Testigo (%)	Inoculado (%)
0	95.7	8.7	86.96	4.35
1	4.3	43.48	13.04	8.7
2	-	30.43	-	47.83
3	-	17.39	-	13.04
4	-	-	-	26.09

Debido al daño ocasionado por *P. ultimum* a las raíces emergentes fue imposible su desarrollo a la etapa e plántula como se observa en la figura 25, donde las semillas testigo desarrollaron hasta formar el cotiledón (Fig. 24 A), mientras que en las semillas inoculadas presentan daño por root rot (Fig 24 B).



Figura 24. Daño en raíces emergentes a las 96 hr. A) Raíces testigo con presencia del cotiledón, B) Raíces con necrosis

Se realizó la comparación del crecimiento de las radículas de *C. chinense* inoculadas con *P. ultimum* y el testigo. A las 24 y 96 hr se observa que existe una diferencia significativa entre el crecimiento de las raíces testigo y las inoculadas; donde el promedio de crecimiento de las raíces testigo a las 24 hr fue de 11% en comparación con las inoculadas con un 6.83 % y a las 96 hr para las raíces testigo fue de 17.87% en comparación con 7.22% de las raíces inoculadas (Fig. 25).

Lo que indica que el contacto con el micelio *P. ultimum* es suficiente para inhibir el crecimiento y desarrollo de *C. chinense*. Similar a lo reportado por (Del Castillo y Hausbeck, 2016) donde *Pythium* spp. causaron síntomas de enfermedad en las plántulas de geranio fue altamente virulento e inhibió la germinación de más del 85% de las semillas. De igual manera veinte especies de *Pythium* causaron damping-off en la pre emergencia en soya, con menos del 50% de germinación en comparación con el testigo en el cual el 100% de germinación (Zitnick-Anderson and Nelson Jr, 2015).

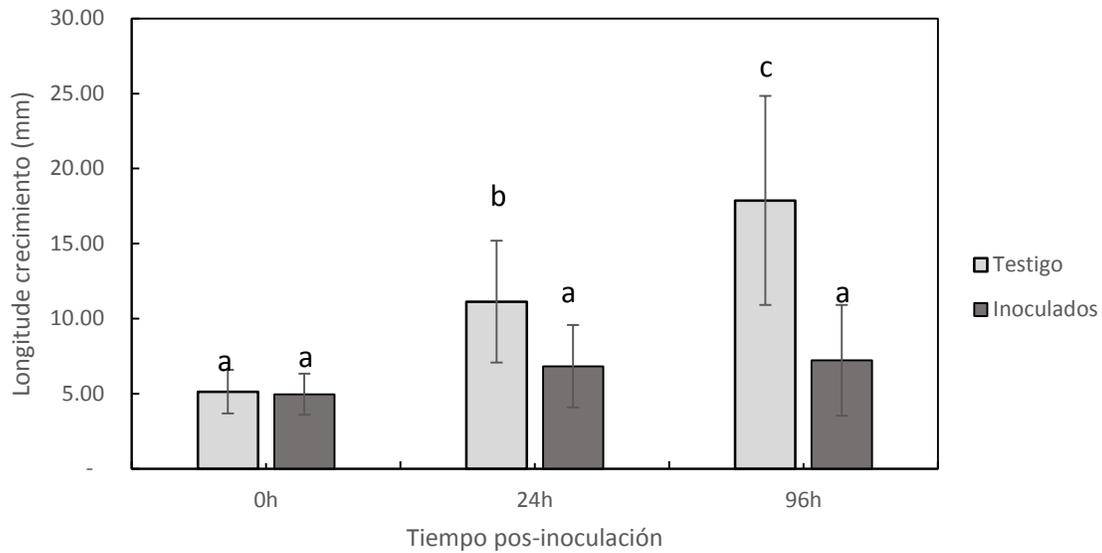


Figura 25. Comparación del crecimiento de las radículas de *C. chinense* después de la inoculación con *P. ultimum* a las 24 y 96 hr.

Para visualizar el daño ocasionado por *P. ultimum* en raíces emergentes se observaron en el SEM, donde en la figura 26 A y B se observa como el micelio cubre el apice de la raíz, en un acercamiento hacia la raíz (Fig. 26 D), podemos constatar que efectivamente es el micelio de *P. ultimum*, debido a su crecimiento irregular sobre la raíz. A las 24 hr pos-inoculación en las raíces testigo se observa los pelos radiculares y raíces sin ningún daño evidente (Fig. 27 A y B), mientras que en las raíces inoculadas se observa el crecimiento del micelio de *P. ultimum* y el rompimiento de las raíces por el daño ocasionado.

Por ultimo a las 96 hr, únicamente se tiene las imágenes de las raíces sanas (Fig.28 A y B), debido que el daño ocasionada por *P. ultimum* era tan severo (Fig. 24 B) que, al momento de realizar el tratamiento de montaje para poder visualizar las fotos, las raíces se disolvieron. Esto sugiere que *P. ultimum* es altamente patogénico.

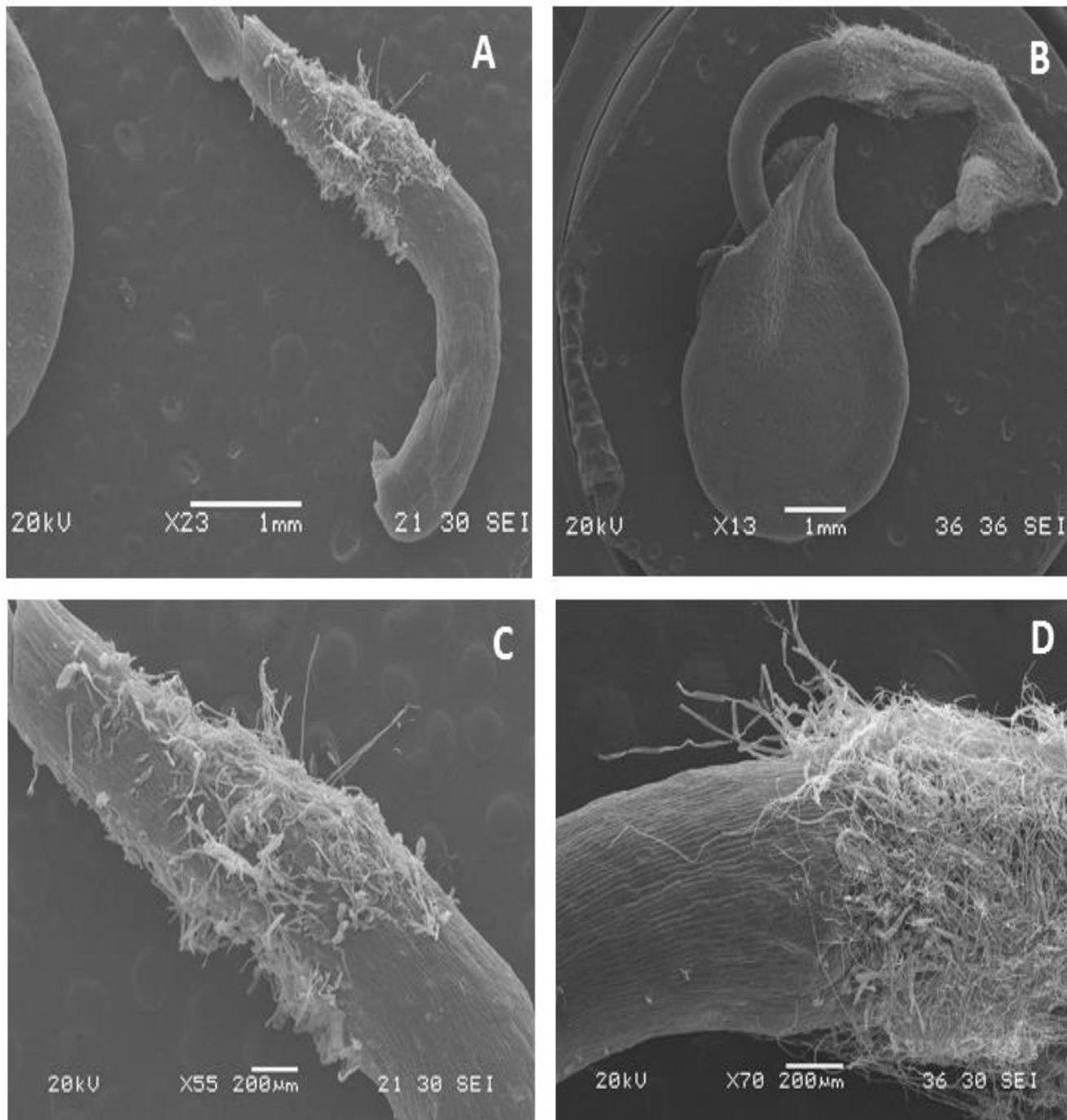


Figura 26. raíces de *C. chinense* vistas en SEM después del contacto con *P. ultimum*. A y C) Raíces testigo con presencia de pelos radiculares, B) Raíz cubierta con el micelio de *P. ultimum*, D) Crecimiento irregular del micelio sobre el tejido de la raíz

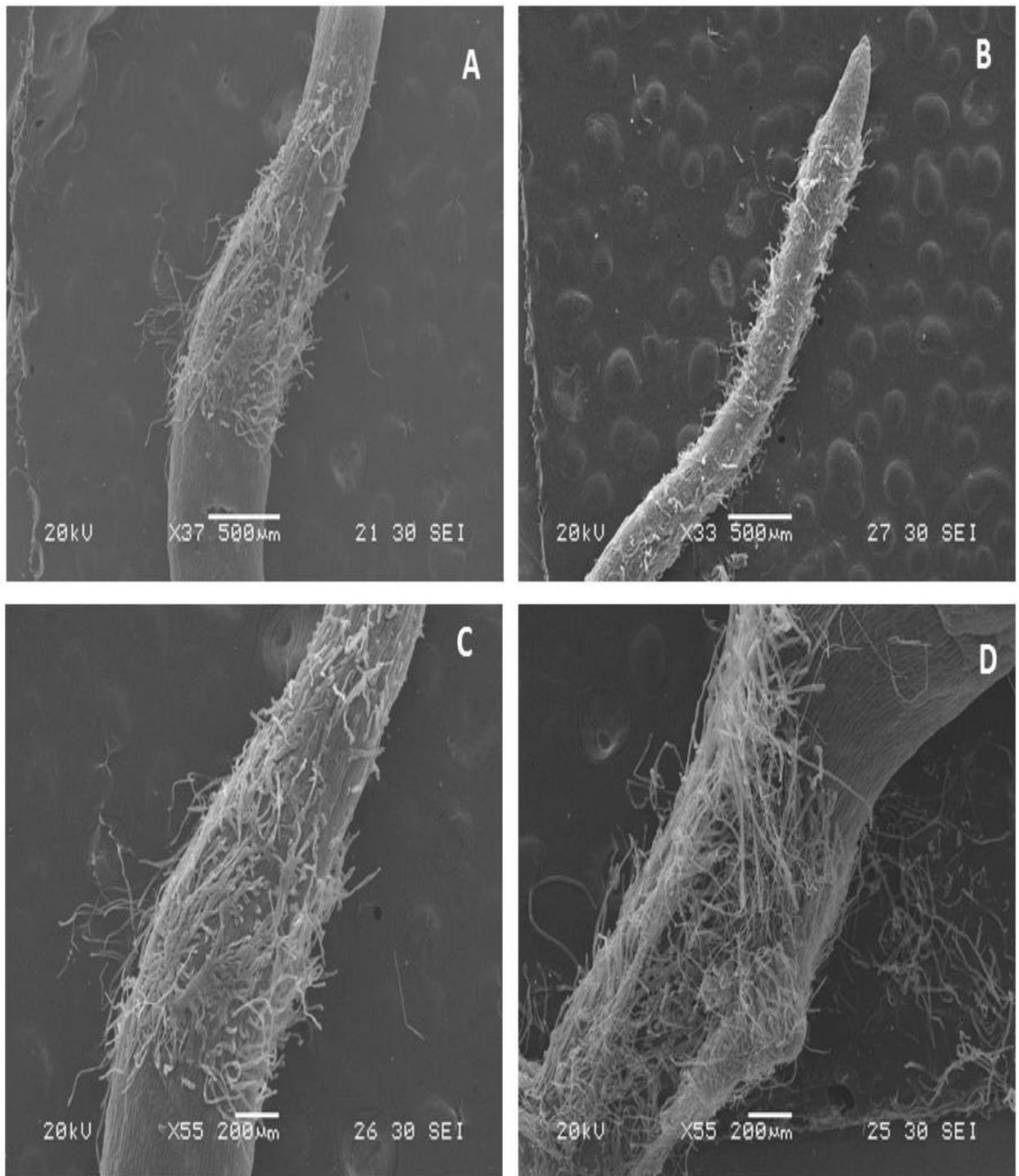


Figura 27. Raíces de *C. chinense* vistas en SEM a las 24 hr pos-inoculación con *P. ultimum*. A y B) Raíces testigo, C y D) Crecimiento irregular del micelio sobre las raíces

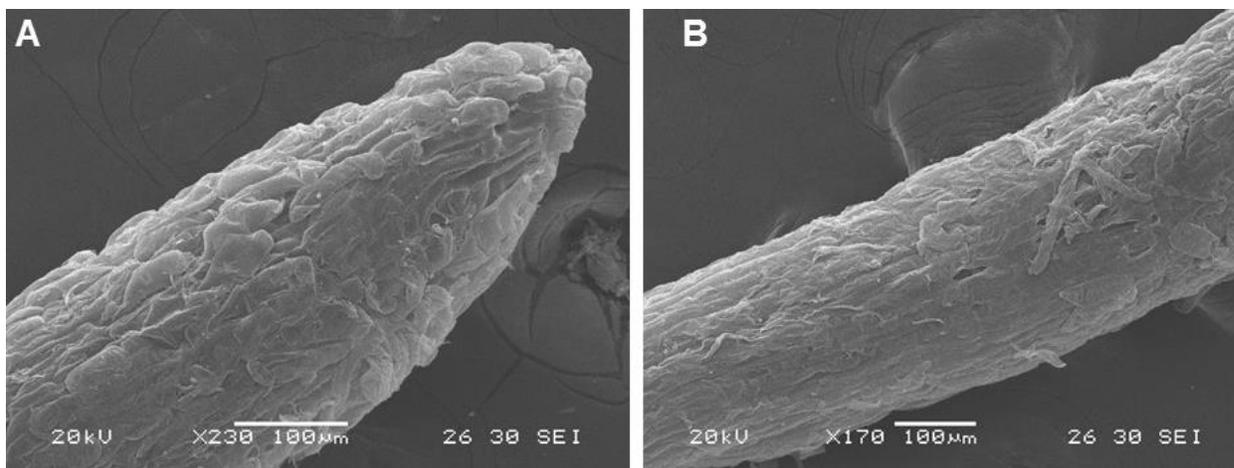


Figura 28. Raíces testigo de *C. chinense* vistas en SEM a las 96 hr.

8.8. Análisis de expresión genética de APX

El análisis de expresión para de APX del testigo no muestra diferencia significativa con respecto al tiempo cero, sin embargo, existe un aumento significativo en las raíces inoculada a las 24 hr con respecto al tiempo cero (Fig. 29), sin embargo, el daño ocasionado por *P. ultimum* en las raíces demostraron una reducción y un retraso en el desarrollo de *C. chinense*. (Nounjan, Tuan and Theerakulpisut, 2012) reporta que en plantas de arroz expuesta a estrés por salinidad la actividad de la APX aumento en comparación con la SOD y POD la cuales disminuyeron, pese a ello aún se observó inhibición en el crecimiento de las plántulas sometidas a estrés por salinidad.

De igual manera las plantas de sorgo expuestas a estrés por sequía, la expresión de APX y GPX presentan una regulación positiva en las partes aéreas de las plantas, mientras en las raíces su regulación fue negativa (Akbuldak *et al.*, 2018), esto sugiere que esté pasando algo similar en las plántulas de *C. chinense* donde el análisis de expresión de APX no se tan alto. Todo esto indicaría que los factores de estrés podrían inducir la expresión de los genes de APX de forma dependiente y que la célula podría aumentar la expresión de los genes de APX para suprimir o eliminar el factor estresante.

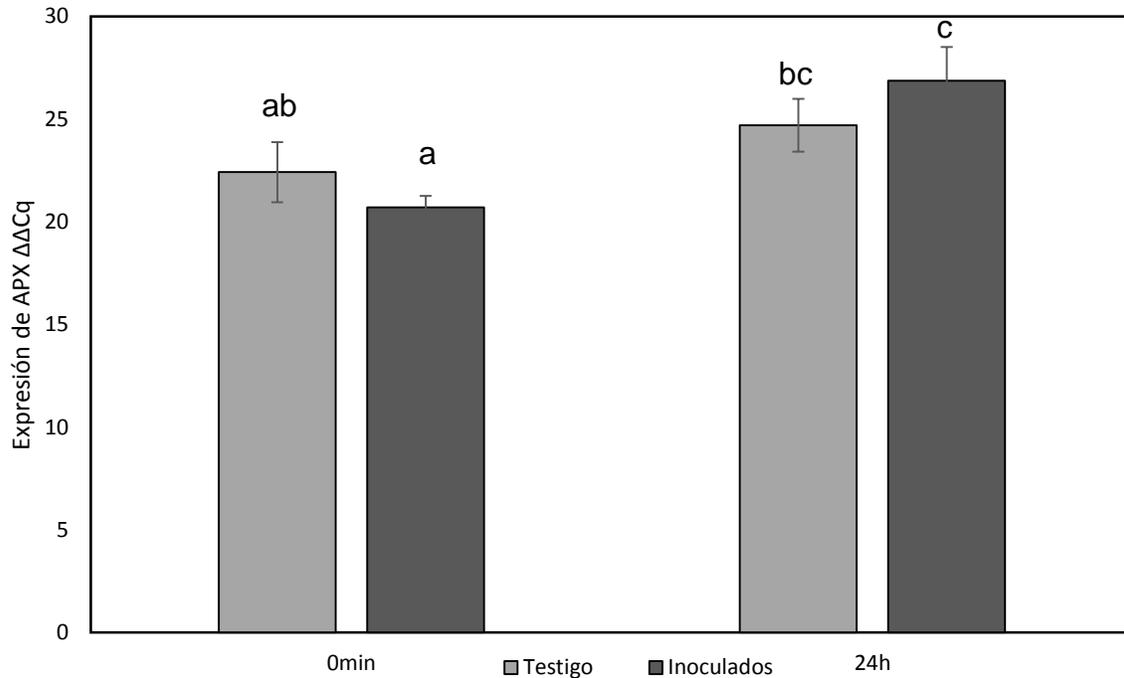


Figura 29. Análisis de la expresión genética de APX en raíces de *C. chinense* a las 24 hr pos-inoculación con *P. ultimum*. donde letras diferentes representan diferencia significativa

8.9 Análisis de expresión genética de PPO

Durante el análisis de expresión por PCR tiempo real se revelo la presencia de diferentes isóformas (Anexo 3), por lo que es posible que estemos analizando diferentes PPO, por lo que se recomienda realizar un nuevo diseño de oligos o realizar un nuevo alineamiento.

IX CONCLUSIONES

- El análisis y selección *in silico* de las secuencias de las enzimas APX y PPO, permitió el diseño de oligonucleótidos, para la amplificación de los genes que codifican dichas enzimas, lo que nos permitió clonar genes ortólogos de APX, PPO y Actina utilizando los oligonucleótidos diseñados en este estudio.
- Se describieron morfológicamente estructuras vegetativas y reproductoras de *P. ultimum* las cuales se desarrollaron en medio V8; mientras que en medio PDA y Agar agua únicamente se desarrolló micelio cenocítico, con lo que se confirmó que la variedad empleada en este estudio fue *ultimum*.
- El modelo de infección utilizado en este experimento nos permitió evaluar la susceptibilidad de plántulas y semillas en emergencia de *C. chinense* inoculadas con *P. ultimum*. En plántulas se observaron estructuras reproductoras tanto dentro como fuera de las raíces a partir del día tres y para el día siete las plántulas ya estaban necróticas y se deshacían y en semillas emergentes frenó su desarrollo.
- El análisis de expresión para APX que se observó fue significativamente diferente al tiempo cero, mientras que para PPO se observa diferentes isomorfos.

X PERSPECTIVAS

Realizar hibridaciones in situ para determinar la posición de las enzimas dentro de la célula.

Emplear microscopio de epifluorescencia para monitorear la activación de ROS en plántulas infectadas y testigos.

Analizar otras enzimas relacionadas con las ROS para poder realizar un modelo de activación.

XI REFERENCIAS

A.M., L. and T., M. (2002) 'Phospholipid signalling in plant defence Ana M Laxalt and Teun Munnik *', *Elsevier Science Plant Biology*, 5, pp. 1–7. doi: 10.1016/S1369-5266(02)00268-6.

Airaki, M. (2012) Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo en plantas de pimiento (*Capsicum annuum L*) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura.

Akbudak, M. A. *et al.* (2018) 'Genome-Wide Identification and Expression Profiling of Ascorbate Peroxidase (APX) and Glutathione Peroxidase (GPX) Genes Under Drought Stress in Sorghum (*Sorghum bicolor L .*)', *Journal of Plant Growth Regulation*. Springer US, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s00344-018-9788-9.

Arnon, D. I. (1949) 'Copper enzymes in isolated choroplasts polyphenol oxidase in Beta vulgaris', *Plant Physiology*, 24(1), pp. 1–16.

Azarabadi, S. *et al.* (2017) 'ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis L*)', *European Journal of Plant Pathology*. European Journal of Plant Pathology, 147(2), pp. 279–294. doi: 10.1007/s10658-016-1000-0.

Bailey-Serres, J. and Mittler, R. (2006) 'The roles of reactive oxygen species in plant cells', *Plant Physiology*, 141(June), p. 900191. doi: 10.1104/pp.104.900191.Plant.

Bojórquez-Quintal, E. *et al.* (2014) 'Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense Jacq.*): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation.', *Frontiers in plant science*, 5(November), p. 605. doi: 10.3389/fpls.2014.00605.

Cannon, P. F. (2005) 'Pythium ultimum.', *Trow, Annals of Botany*, 15(300), p. 1901.

Del Castillo, M J. Hausbeck, M. K. (2016) 'Characterization of Pythium Species

Associated With Greenhouse Floriculture Crops in Michigan', *American Phytopathological Society*, 100(3), pp. 569–576.

Caverzan, A. *et al.* (2012) 'Plant responses to stresses : role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection Plant Responses to Stresses Ascorbate Peroxidase in Plants', *Genet. Mol. Biol*, 35(4), pp. 1011–19. doi: 10.1590/S1415-47572012000600016.

Caverzan, A., Casassola, A. and Brammer, S. P. (2016a) 'Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress', in.

Caverzan, A., Casassola, A. and Brammer, S. P. (2016b) 'Reactive Oxygen Species and Antioxidant Enzymes Involved in Plant Tolerance to Stress', *Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives*. doi: 10.5772/61368.

Cedrón, J. C. and Whitaker, F. S. (2013) 'La Capsaicina', 27, pp. 7–8.

Choudhury, F. K. *et al.* (2017) 'Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination', *Plant Journal*, 90(5), pp. 856–867. doi: 10.1111/tpj.13299.

Dandurand L.M., K. G. R. y S. D. J. (1994) 'Quantion of Pythium ultimum var. Sporangiiiferum Zoospore Encystment Patterns Using Geostatistics', *The American Phytopathological society*, 85, p. 186190.

Donaldson, B. Y. S. P. and Deacon, J. W. (1993) 'Effects of amino acids and sugars on zoospore taxis , encystment and cyst germination in Pythium aphanidermatum', pp. 289–295.

Farr, D.F., y Rossman, A. Y. (2019) *No Title Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA*.

Fernández J.M., Da Silva-Griolletto M.E., T.-F. I. (2009) 'Estés oxidativo inducido por el ejercicio', *Rev Andal Med Deporte*, 2(1), pp. 19–34.

Foyer, C. H. and Noctor, G. (2005) 'Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling:

A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses', *the Plant Cell Online*, 17(7), pp. 1866–1875. doi: 10.1105/tpc.105.033589.

Gacche, R. N., Zore, G. B. and Ghole, V. S. (2003) 'Kinetics of inhibition of polyphenol oxidase mediated browning in apple juice by β -Cyclodextrin and L-Ascorbate-2-triphosphate', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18(1), pp. 1–5. doi: 10.1080/1475636031000062874.

Gayoso, C. *et al.* (2004) 'Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon', *Scientia Horticulturae*, 102(1), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.scienta.2003.11.015.

Gilchrist-Saavedra, L. Fuentes-Dávila, G. MartNez-Cano, C. López Atilano R.M. Duveiller, E. Singh, R.P. Henry, M. Garcia, I. (205AD) *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*.

Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) 'Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants', *Plant Physiology et Biochemistry*. Elsevier Masson SAS, 48(12), pp. 909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Green, H. and Jensen, D. F. (2000) 'Disease Progression by Active Mycelial Growth and Biocontrol of *Pythium ultimum* var. *ultimum* Studied Using a Rhizobox System', *American Phytopathological Society*, 90(9), pp. 1049–1055.

Ho, H. H. (2009) 'The genus *Pythium* in Taiwan, China (1) - a synoptic review', *Frontiers of Biology in China*, 4(1), pp. 15–28. doi: 10.1007/s11515-009-0009-6.

Ho, H. H. (2011) 'The genus *Pythium* in Taiwan (2)-An Illustrated diagnostic key', *Mycotaxon*, 116, pp. 33–47. doi: 10.5248/116.33.

Hultberg M. Alsberg, B. K. S. and B, A. (2010) 'Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*', *International Organization for Biological Control*, 55, pp. 435–444. doi: 10.1007/s10526-009-9261-6.

Ishikawa, T. *et al.* (1997) 'peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts', *Biochemical Journal*, 328(3), pp. 795–800.

Johnson, L.F., A. T. (1983) 'Germinación Of Oosporas of *Pythium ultimum* in the Cotton Rhizosphere', *American Phytopathological Society*, 73, pp. 1620–1624.

Jukanti, A. (2017) *Polyphenol oxidases (PPOs) in plants*, *Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants*. doi: 10.1007/978-981-10-5747-2.

Jung, W. J. *et al.* (2004) 'Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*', *Biological Control*, 30(3), pp. 645–652. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.03.006.

Kageyama, K. Uchino, H. Hyakumachi, M. (1998) 'Characterization of the Hyphal Swelling Group of *Pythium*: DNA Polymorphisms and Cultural and Morphological Characteristics', *The American Phytopathological society*, 82(2), pp. 218–222.

Kageyama, K. (2014) 'Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species', *Journal of General Plant Pathology*, 80(4), pp. 314–326. doi: 10.1007/s10327-014-0526-2.

Kakueinezhad, M. *et al.* (2018) 'Resistance assessment and biochemical responses of sugar beet lines against *Pythium aphanidermatum*, causing root rot', *European Journal of Plant Pathology*. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), pp. 307–319. doi: 10.1007/s10658-017-1373-8.

Lax, A. R. and Vaughn, K. C. (1991) 'Colocalization of Polyphenol Oxidase and Photosystem 11 Proteins', *Plant Physiol.*, 96, pp. 26–31.

Lazarovits, G. and Ward, E. W. B. (1982) 'Polyphenoloxidase activity in soybean hypocotyls at sites inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*', *Physiological Plant Pathology*, 21(2), pp. 227–236. doi: 10.1016/0048-4059(82)90041-8.

Maleck, K. and Dietrich, R. A. (1999) '<Trends in Plant Science 1999 Maleck K.pdf>', *Plant Science*, 4(6), pp. 215–219.

Martinez M.R., Nexticapan G.A., Pérez B.D., y L. S. A. (2018) 'Las principales plagas en chile habanero y su manejo en la Península de Yucatán', in *Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán*, pp. 87–95.

Maruta, T. and Ishikawa, T. (2018) 'Ascorbate Peroxidase Functions in Higher Plants: The Control of the Balance Between Oxidative Damage and Signaling BT - Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants', in Gupta, D. K., Palma, J. M., and Corpas, F. J. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 41–59. doi: 10.1007/978-3-319-75088-0_3.

Middleton, J. T. (1943) 'The Taxonomy, Host Range and Geographic distribution of the genus *Pythium*', *Torrey Botanical Society*, 20(1), pp. 1–171.

Moguel-Salazar, F., Carballo-Bautista, M., Brito-Argáez, L., alcocer Álvarez, C. y (2018) 'Aislamiento de hongos y bacterias a partir de plantas de chile habanero cultivadas en distintos municipios del estado de Yucatán', in *Mejoramiento Genético del Chile habanero de la Península de Yucatán*, pp. 157–163.

Nakayama, A. T. *et al.* (2000) 'Aureusidin Synthase : Polyphenol Oxidase Homolog Responsible for Flower', *American Association for the Advancement of Science*, 290, pp. 1163–1166.

Nawaz, K. *et al.* (2015) 'First Report of *Pythium spinosum* Causing Root Rot of Chili (*Capsicum annum*) in Pakistan', *Plant Disease*, p. PDIS-07-15-0745-PDN. doi: 10.1094/PDIS-07-15-0745-PDN.

Nicolas, J. J. *et al.* (1994) 'Enzymatic browning reactions in apple and apple products', *Food Science and Nutrition*, 34(2), pp. 109–157.

Nounjan, N., Tuan, P. and Theerakulpisut, P. (2012) 'Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes', *Journal of Plant*

Physiology. Elsevier GmbH., 169(6), pp. 596–604. doi: 10.1016/j.jplph.2012.01.004.

Ono, E. *et al.* (2006) 'Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles', *Plant Journal*, 45, pp. 133–143. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02625.x.

Owen-Going, N Sutton, J. C. and Grodzinski, B. (2003) 'Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25, pp. 155–167.

Padhi, G. K., Maity, L. and Chattopadhyay, A. (2017) 'Population dynamics of whitefly (*Bemisia tabaci* Genn .) in chilli and screening of genotypes against chilli leaf curl virus Population dynamics of whitefly (*Bemisia tabaci* Genn .) in chilli and screening of genotypes against chilli leaf curl virus', (January).

Palmucci, H. E. (2015) Caracterización de especies fitopatógenas de en cultivos ornamentales del cinturón verde la plata-buenos aires y otras áreas. Tesis

Paul G. Smith and Charles B. Heiser, J. (1957) 'Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq . and the Geographic Distribution of the Cultivated *Capsicum* Species Author (s): Paul G . Smith , Charles B . Heiser and Jr . Source : Bulletin of the Torrey Botanical Club , Vol . 84 , No . 6 (Nov . - Dec . , 1957), p', 84(6), pp. 413–420.

Paulitz, T. C. y B. R. (1988) 'Of secondary sporangia by *Pythium ultimum*: the influence of organic amendments and *Pythium zvuun*', *Soil Biol. Biochem*, 20(2), pp. 151–156.

Pettitt, T. R. *et al.* (2002) 'Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water', *Plant Pathology*, 51(6), pp. 720–727. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00759.x.

Plaats-Niterink, a J. V. (1981) 'Monograph of the genus *Pythium*', *Studies in Mycology*, 21(June), pp. 1–242. doi: 10.1016/S0007-1536(82)80143-5.

Rivera Cabrera F., Buentello Volante, B., Díaz de León Sánchez, F. Y Pérez- Flores, L. J. (2008) 'Las especies reactivas de oxígeno en plantas.', in *Radicales libres y*

estrés oxidativo. Aplicaciones medicas, p. Cap. 34; 493-516.

Rodríguez-Leyva, E. *et al.* (2012) 'New Records of Species and Locations of Parasitoids of the Pepper Weevil ¹ in Mexico', *Southwestern Entomologist*, 37(1), pp. 73–83. doi: 10.3958/059.037.0109.

Ruiz-lau, N. F. M. L. y M. M. E. (2011) 'El chile habanero: su origen y usos', *Ciencia*, pp. 70–77.

Sabbagh E., Sabbagh K.S., Panjehkeh N., B.-Y. H. R. (2018) 'Pythium aphanidermatum ile Bulaşık Hıyarlarda Jasmonik Asitin Uyardığı Sistemik Dayanıklılık Jasmonic Acid Induced Systemic Resistance in Infected Cucumber by Pythium aphanidermatum', *journal of Agricultural Science*, 24, pp. 143–152.

Schroeder, K. *et al.* (2013) 'Molecular Detection and Quantification of Pythium Species- Evolving Taxonomy, New Tools and Challenges', *Plant Disease*, 97(1), p. 120703085216007. doi: 10.1094/PDIS-03-12-0243-FE.

Schulze, E.D., Beck, E., y Hohenstein, K. M. (2005) 'Environment as stress factor: stress physiology of plants', *Plant Ecology*, pp. 7–19.

Shahid, A. A., Ali, M. and Ali, S. (2017) 'First report of pythium debaryanum causing chili damping off in Pakistan', *Plant Disease*, 101(2). doi: 10.1094/PDIS-08-16-1209-PDN.

Sharma, P. *et al.* (2012) 'Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions', *Journal of Botany*, 2012, pp. 1–26. doi: 10.1155/2012/217037.

Sheptovitsky, Y. G. and Brudvig, G. W. (1996) 'Isolation and Characterization of Spinach Photosystem II Membrane-Associated Catalasa and Polyphenol Oxidase', *Biochemistry*, 35(50), pp. 16255–63. doi: 10.1007/s10773-007-9455-6.

SIAP (2017) *Producción Pecuaria 1980-2017: Otros productos. Resumen nacional por estado*. México.

Sommer, A. *et al.* (1994) 'Import , Targeting , and Processing of a Plant Polyphenol Oxidase ', *Plant Physiology*, 105, pp. 1301–1311.

Stassen, J. H. M. and Ackerveken, G. Van Den (2011) 'How do oomycete effectors interfere with plant life ?', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 14, pp. 407–414. doi: 10.1016/j.pbi.2011.05.002.

Teixeira, F. K. *et al.* (2006) 'Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments', *Planta*, 224(2), pp. 300–314. doi: 10.1007/s00425-005-0214-8.

Thines, M. and Kamoun, S. (2010) 'Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 13(4), pp. 427–433. doi: 10.1016/j.pbi.2010.04.001.

Tsukiboshi, T Chkuo, Y Ito. Y Matsushita, Y. K. K. (2007) 'Root and stem rot of chrysanthemum caused by five Pythium species in Japan', *journal Gen Plant Pathology*, 73, pp. 293–296. doi: 10.1007/s10327-007-0015-y.

Tun-Dzul José de la Cruz (2001) *Chile Habanero Características y Tecnología de Producción*.

Tyler, B. M. (2001) 'Genetics and genomics of the oomycete host interface', *Trends in Genetics*, 17(11), pp. 611–614. doi: 10.1016/S0168-9525(01)02517-3.

Walley, J. W. *et al.* (2007) 'Mechanical Stress Induces Biotic and Abiotic Stress Responses via a Novel cis -Element', *PLos Genetics*, 3(10), pp. 1800–1812. doi: 10.1371/journal.pgen.0030172.

Wulff, E. G. *et al.* (1998) 'Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic Pythium species: Differential zoospore accumulation , colonization ability and plant growth response', *European Journal of Plnt pathology*, 104, pp. 69–76.

Yáñez P., Balseca D., R. L. y L. C. (2015) 'Características Morfológicas y de

Concentración de Capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador', *LA GRANJA: Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), pp. 12–32. doi: 10.17163/lgr.n22.2015.02.

Zitnick-anderson, K. K. and Jr, B. D. N. (2015) 'Identification and Pathogenicity of *Pythium* on Soybean in North Dakota', *The American Phytopathology society*, 99(1), pp. 31–38.

XII ANEXOS

Anexo 1

Preparación de 1L de las soluciones madres:

Macronutrientes:

- 1) 1.00 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, usar 1 mL/L de solución de nutrientes
- 2) 1.00 M KNO_3 , usar mL/L de solución de nutrientes
- 3) 1.00 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ usar 4 mL/L de solución de nutrientes
- 4) 1.00 M MgSO_4 usar 2 mL/L de solución de nutrientes

Micronutrientes:

Para la preparación de los micronutrientes, se combinan las siguientes cantidades en un litro de agua destilada, y luego se emplea 1ml/L de la mezcla madre

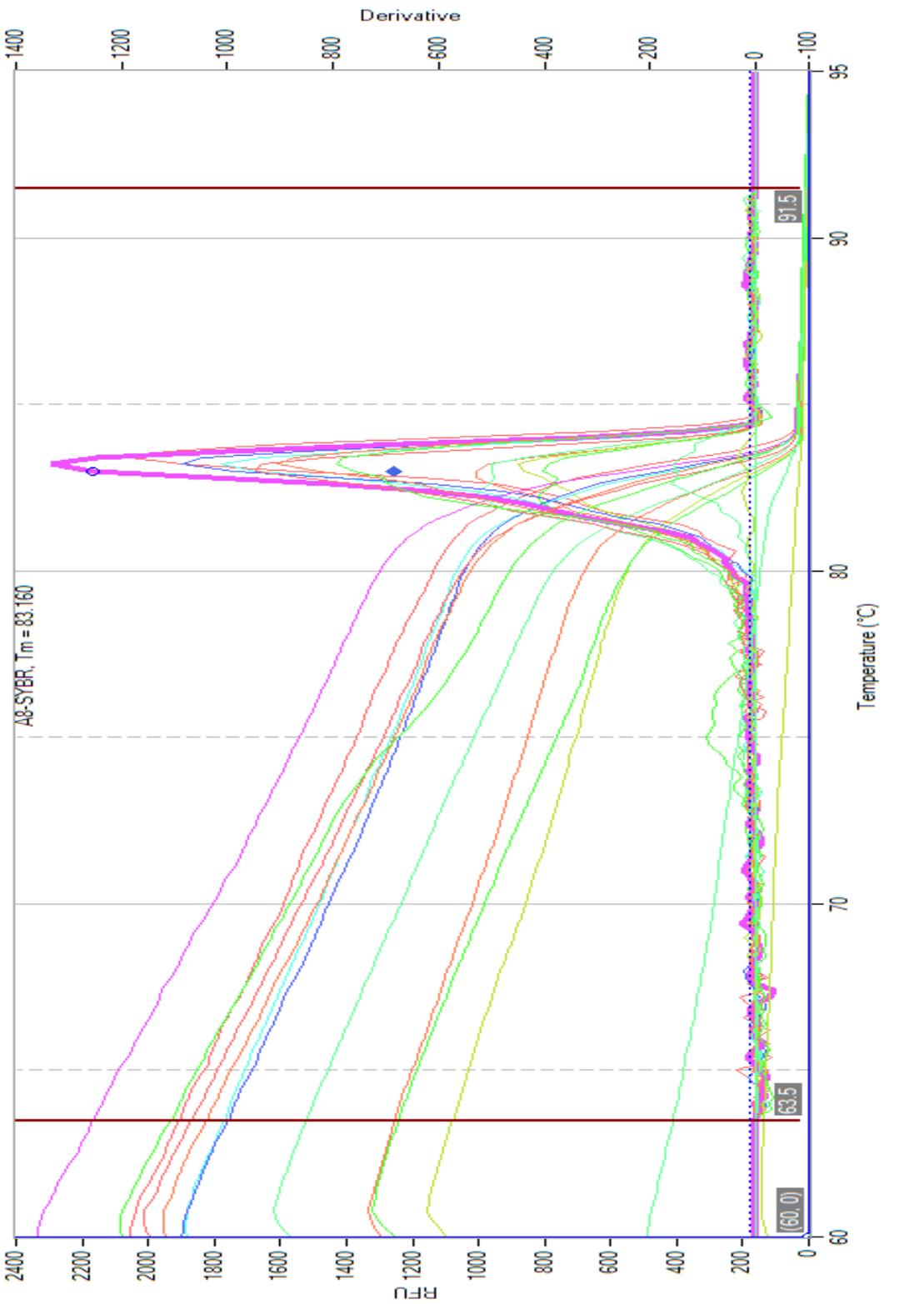
- 5) 2.86 g H_3BO_3
1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0.22 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.08 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0.02 g $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

6) solución de hierro:

Se toman 26.1 g de EDTA y se disuelve en 286 ml de agua destilada, luego se disuelve 24.9 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 500ml de agua. Se agrega lentamente la solución de sulfato de hierro a la solución de EDTA, cubrir la solución con papel aluminio y dejar en agitación toda la noche. Aforar a 1L. Agregar 0.25ml de la solución de hierro en 1L de solución de nutrientes.

Anexo 2

Grafica de la Melting Curve de APX



Anexo 3

Grafica de la Melting Curve de PPO

