



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

COMPARACIÓN DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN CÉLULAS DE CHILE CM334 EN
UNA INTERACCIÓN COMPATIBLE Y UNA INCOMPATIBLE

DIANA SANZÓN GÓMEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La presente tesis, titulada: **Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible**, realizada por la alumna: **Diana Sanzón Gómez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

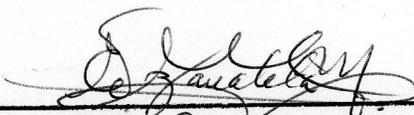
DOCTORA EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

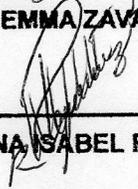
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



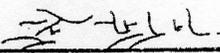
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESORA:



DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESORA:



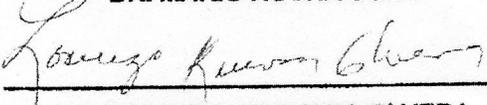
DRA. MARÍA ALEJANDRA MORA AVILÉS

ASESOR:



DR. MARIO ROCHA SOSA

ASESOR:



DR. LORENZO GUEVARA OLVERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2010

COMPARACIÓN DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES EN CÉLULAS DE CHILE CM334 EN UNA INTERACCIÓN COMPATIBLE Y UNA INCOMPATIBLE

Diana Sanzón Gómez, Dra.

Colegio de Posgraduados, 2010

El chile CM334 ha destacado por su alto grado de resistencia a la marchitez inducida por *Phytophthora capsici* la cual se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH), un tipo de muerte celular programada. Sin embargo, este genotipo es susceptible a otros fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Nacobbus aberrans* que también atacan a la raíz de la planta. El objetivo de este trabajo fue comparar los cambios morfológicos a nivel celular de las plantas de chile CM334 en la RH inducida por *P. capsici* (interacción incompatible) y la necrosis inducida por *F. oxysporum* (interacción compatible). Los tratamientos evaluados fueron CM334-*P. capsici*, CM334-*F. oxysporum*, CM334-Testigo, Yolo Wonder-*P. capsici* (control susceptible) y Yolo Wonder-Testigo. El avance de la necrosis y la colonización por el oomiceto en la interacción CM334-*P. capsici* fue limitado a las zonas por arriba y por abajo del sitio de inoculación en el tallo; mientras que, en las interacciones compatibles CM334-*F. oxysporum* y Yolo Wonder-*P. capsici* la necrosis se extendió por toda la planta en el primer caso y en ambas interacciones compatibles la colonización por el patógeno correspondiente se presentó a lo largo del tallo. Entre los cambios morfológicos celulares más evidentes estuvo la degradación de las paredes celulares en las interacciones compatibles, en cambio en la interacción CM334-*P. capsici*, solamente se observó el colapso de las células. El aspecto característico que mostraron los núcleos en cada interacción fue diferente, así el 30.9 % y el 14.9% de los núcleos de las células de la corteza fueron rojos en CM334-*P. capsici* y en Yolo Wonder-*P. capsici*, respectivamente; mientras que en la interacción compatible CM334-*F. oxysporum* el 70.8% fueron globosos y de color gris claro. Las diferencias en la estructura celular, a nivel de microscopía de luz, observadas entre las interacciones compatibles y la incompatible, sugieren que en las primeras la muerte celular fue producto a nivel de pared celular, de la actividad de los metabolitos secretados por el patógeno; en cambio la muerte celular en la interacción CM334-*P. capsici* se debió muy probablemente a una muerte celular programada que inhibió el avance del oomiceto a lo largo del tallo de la planta.

Palabras clave: *Capsicum annum* CM334, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, reacción de hipersensibilidad, necrosis.

COMPARISON OF STRUCTURAL CHANGES IN CELLS OF CHILLI CM334 IN COMPATIBLE AND INCOMPATIBLE INTERACTION

Diana Sanzón Gómez, Dra.

Colegio de Posgraduados, 2010

The chilli CM334 stands out for its high degree of resistance to wilt caused by *Phytophthora capsici*, such resistance is expressed as a hypersensitivity reaction (HR), a type of programmed cell death. However, this genotype is susceptible to other plant pathogens which attack the plant root, such as *Fusarium oxysporum* and *Nacobbus aberrans*. The objective of this study was to compare the morphological changes at cellular level of CM334 plants in the HR induced by *P. capsici* (incompatible interaction) and the necrosis induced by *F. oxysporum* (compatible interaction). The treatments were CM334-*P. capsici*, CM334-*F. oxysporum*, CM334-control, Yolo Wonder-*P. capsici* (susceptible control) and Yolo Wonder-control. The progress of necrosis and colonization by the oomycete in CM334-*P. capsici* interaction was limited to areas above and below the site of inoculation in the stem, while in both compatible interactions the colonization by the pathogen embody the whole stem. Among the most obvious cellular morphological changes was the degradation of cell walls in the compatible interactions, but in the CM334-*P. capsici* compatible interaction only the collapse of the cells was observed. The characteristic feature shown by nuclei in each interaction was different, 30.9% and 14.9% of the nuclei of cells in the cortex were red in CM334-*P. capsici* and Yolo Wonder-*P. capsici*, respectively, while in the compatible interaction CM334-*F. oxysporum* 70.8% of the nuclei were globose and light gray. Differences in cellular structure at the level of light microscopy, observed between compatible and incompatible interactions, suggest that in the compatible interactions cellular death was produced by the activity of metabolites secreted by the pathogen, which acted on the cell wall; instead cell death in the interaction CM334-*P. capsici* was probably due to a programmed cell death that inhibited the spread of oomycete along the stem of the plant.

Keywords: *Capsicum annuum* CM334, *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, hypersensitive reaction, necrosis.

DEDICATORIA

A mis amados padres, Digna y Rubén.

A mi hermano Hugo, mi cuñada Irais y mi queridísimo sobrino Sebastián.

A mis abuelos Ignacia, Senorina, Eloy y Enrique.

A Tomas Troncoso Faz.

A Juanjo, mi mejor amigo, por cada momento que hemos compartido. Con todo mi cariño.

No era el más honesto ni el más piadoso, pero era un hombre valiente.

A mi maravilloso grupo de amigos: Celia, Liliana, Ernesto, Jorge, Benigno, Hugo.

A todos mis amigos guanajuatenses.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía por ser mi guía, brindarme todo su apoyo y ser un ejemplo de vida.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez por su apoyo en todo momento.

A la Dra. María Alejandra Mora Avilés y a los Dr. Lorenzo Guevara Olvera y Mario Rocha Sosa por todos sus comentarios y sugerencias.

Al Maestro Jorge Valdez Carrasco por toda su ayuda en la toma y edición de las fotografías.

A mis maestros del Colegio de Postgraduados.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio 209: Yolanda, Damaris, Lupita, Alba, Alicia, Ernesto, Edgar, José María, Antonio, Abimael, Moisés, Noe y Edy.

Al señor Eduardo Paredes García.

A la familia Martínez López, en especial a las señoras Loreto y Lucha. A ti Carlos por todo tu apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
<u>CONTENIDO DE CUADROS</u>	i
<u>CONTENIDO DE FIGURAS</u>	ii
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>2. REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
2.1. Resistencia en Chile a <i>Phytophthora capsici</i>	3
2.2. Reacción de hipersensibilidad y muerte celular programada en plantas	4
2.2.1. Muerte celular programada en plantas	5
2.2.2. Respuesta de hipersensibilidad (RH)	9
2.3. Conclusiones	14
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	17
3.1. Establecimiento de ensayos	17
3.2. Avance de la necrosis y colonización sistémica por el patógeno	18
3.3. Microscopia de luz	19
<u>4. RESULTADOS</u>	21
4.1. Avance de la necrosis y colonización por el patógeno	21
4.2. Microscopia de luz	22
<u>5. DISCUSIÓN</u>	33
<u>6. LITERATURA CITADA</u>	37

CONTENIDO DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Número total de células, núcleos y tipos de núcleos en diferentes tejidos de tallo de plantas de chile CM334 y Yolo Wonder.	25
Cuadro 2. Número total de células y total de células con polifenoles, cristales e hifas en diferentes tejidos de tallo de plantas de chile CM334 y Yolo Wonder	26

CONTENIDO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tipos de degeneración celular que ocurren en células sujetas a estrés o daño	15
Figura 2. Secuencia de eventos que ocurren en la muerte celular hipersensitiva en algunas interacciones planta-patógeno	16
Figura 3. Sitio de punción e inoculación en el nudo de las hojas cotiledonarias indicado por la flecha discontinua. Localización de los tres fragmentos de tallo (A, B y C) en las plántas de chile CM334 en los que se determinó el avance de la colonización por <i>P. capsici</i> (a) y <i>F. oxysporum</i> (b)	20
Figura 4. Tipos principales de núcleos: normales (A), rojos (B) y globosos (C). También se observaron pero con poca frecuencia núcleos globosos y rojos (D). Barra= 50 μ m	27
Figura 5. Corte transversal de tallo de plantas testigo de chile CM334 en corte transversal. A las 12 horas posteriores a la punción (hpp) no se observan cambios estructurales evidentes (A). A las 120 hpp se observa acumulación de polifenoles (en rojo) en la zona de la punción (B). Barra= 100 μ m	28
Figura 6. Corte transversal de tallo de plantas de chile CM334 inoculada con <i>P. capsici</i> (A-C) o <i>F. oxysporum</i> (D-F)	29
Figura 7. Corte transversal de tallo de plantas de chile Yolo Wonder en planta testigo (A) o inoculada con <i>P. capsici</i> (B-D).	30
Figura 8. Cortes histológicos de tallos de chile CM334 inoculados con <i>P. capsici</i> o <i>F. oxysporum</i>	31
Figura 9. Cortes histológicos de tallos de chile Yolo Wonder inoculados con <i>P. capsici</i>	32

1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es un cultivo de gran importancia económica en México. Durante el año agrícola 2009 se sembraron 144 109.63 ha con una producción de 1 981 564.45 ton (SAGARPA, 2010). Una de las enfermedades que llega a causar pérdidas de hasta un 80% en las zonas productoras del país es la marchitez del chile inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian (Mendoza, 1996 y 1999). Entre las estrategias para el manejo de esta enfermedad se encuentra el control genético, y el chile criollo tipo serrano CM334 ha destacado por su alto grado de resistencia al oomiceto la cual se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH) (Fernández-Pavia y Liddell, 1997; Sy *et al.*, 2005; Bonnet *et al.*, 2007). En trabajos previos se encontró que a pesar del alto grado de resistencia de CM334 a *P. capsici*, las plantas mostraron susceptibilidad al oomiceto cuando fueron previamente inoculadas con el nematodo agallador *Nacobbus aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005).

Durante algunos experimentos realizados en el “Proyecto Rompimiento de Resistencia del chile CM334 a *P. capsici* por *N. aberrans*” realizado en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se ha observado que algunas plantas de CM334 mueren después de haber sido inoculadas solamente con *P. capsici*. La muerte de estas plantas sugiere que tal susceptibilidad puede deberse a que las plantas han perdido su resistencia, o bien que la susceptibilidad a *P. capsici* podría ser el resultado de una RH tan violenta y extensiva a nivel del cuello de la planta que ésta termina por sucumbir. Dada la naturaleza del proyecto sobre rompimiento de resistencia, es de fundamental importancia determinar si la muerte de estas plantas se debe a una pérdida de resistencia o es producto de la RH.

La RH ha sido considerada como un tipo especial de muerte celular programada (MCP), y su inducción por algunos patógenos y elicitores presenta características morfológicas similares a las observadas en la MCP en animales, como son la globulación de la membrana plasmática, condensación del citoplasma y núcleo, y fragmentación del ADN nuclear (Greenberg, 1996). Estas características, entre otras, pueden ayudar a diferenciar entre una MCP como es el caso de una RH, en la cual algunas células de la planta se “suicidan” para evitar el avance del patógeno, y la muerte celular producto de la susceptibilidad del hospedante al patógeno, en la cual las células del hospedante mueren a consecuencia de la actividad de

los metabolitos producidos por el patógeno como enzimas que degradan paredes celulares y toxinas (Levine *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue comparar los cambios morfológicos a nivel celular de las plantas de Chile CM334 en la respuesta de hipersensibilidad inducida por *P. capsici* (interacción incompatible) y la necrosis inducida por *Fusarium oxysporum* en CM334 (interacción compatible).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Entre los cultivos de mayor importancia económica en México se encuentra el chile (*Capsicum annuum*). Durante el año agrícola 2009 se sembraron 144,109.63 ha con una producción de 1,981,564.45 ton y un valor de producción de \$ 11,039,083,360.00 (SAGARPA, 2010). Aparte del consumo en fresco, cocido o como un condimento en comidas típicas, el chile es procesado en una gran variedad de productos industriales como: congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, pastas y salsas, se utiliza como materia prima para la obtención de colorantes y de oleoresinas para fines industriales, e incluso para fines medicinales (Nuez *et al.*, 2003).

La marchitez del chile, inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici*, es una de las enfermedades más importantes que afectan la producción del chile en México (Mendoza, 1996; 1999), y una alternativa para su control es el uso de variedades resistentes. El chile criollo tipo serrano CM334 se ha destacado por su alta resistencia a *P. capsici*, y se ha utilizado en un gran número de investigaciones, desde aquellas para identificar los genes que le confieren la resistencia y tipo de resistencia, los mecanismos de defensa involucrados, y patógenos que pueden romper su resistencia, entre otras (Vargas *et al.*, 1996; Fernández-Pavia y Liddell, 1997; Sy *et al.*, 2005; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Bonnet *et al.*, 2007).

2.1. Resistencia en chile a *Phytophthora capsici*

La resistencia a *P. capsici* en algunas variedades de chile está relacionada con un incremento en la cantidad de ácidos fenólicos después de la inoculación con el oomiceto, y la liberación de isoenzimas peroxidadas en el espacio intercelular como una reacción de defensa en tallos resistentes (Alcázar *et al.*, 1995; Candela *et al.*, 1995). La acumulación de la fitoalexina capsidiol en el área necrótica, resultado de la reacción de hipersensibilidad, parece ser otro mecanismo de resistencia (Egea *et al.*, 1996; García-Pérez *et al.*, 1998). La síntesis y acumulación de β -1,3-glucanasas y quitinasas durante la interacción chile-*P. capsici* posiblemente también estén implicadas en la expresión de resistencia (Kim y Hwang, 1994; García-Pérez *et al.*, 1998). Egea *et al.* (2001), observaron la acumulación de peroxidadas y

lignina en paredes celulares de células en suspensión de la variedad resistente Smith-5 después de ponerlas en contacto con elicitores como micelio de *P. capsici*. En el genotipo de Chile CM334, la resistencia se asocia con la respuesta hipersensitiva (RH), con una expresión más rápida de genes *PAL* (que codifican la síntesis de la enzima Fenil Alanina amonio Liasa), con una mayor expresión de genes que codifican peroxidasa acídica y con la presencia de fenoles tóxicos al oomiceto (Fernández-Pavía y Liddell, 1997).

2.2. Reacción de hipersensibilidad y muerte celular programada en plantas

La reacción de hipersensibilidad (RH) forma parte de los mecanismos de defensa de la planta (Klement y Goodman, 1967; Greenberg, 1997) y es considerada como la máxima expresión de resistencia de las plantas al ataque por patógenos. Durante la RH, las células localizadas alrededor del sitio de penetración se suicidan con la intención de detener la infección y el avance del patógeno. La muerte de células durante la reacción de hipersensibilidad se considera como una muerte celular programada (MCP). Normalmente, muchas de las células de los organismos eucariontes mueren y son removidas de manera programada a través de una serie de cambios bioquímicos y morfológicos muy sofisticados. Esta MCP se presenta en animales, plantas y en organismos unicelulares, y es fundamental en procesos que tienen que ver tanto con el crecimiento y desarrollo normal del organismo como con respuestas a estreses por factores bióticos y abióticos (Guimarães y Linden, 2004). La MCP es una muerte genéticamente controlada que requiere de la participación activa del organismo (Greenberg, 1997) e involucra una secuencia de eventos metabólicos celulares que conducen a la destrucción de la célula (Guimarães y Linden, 2004). Se sugiere que a través de la evolución los animales y las plantas han conservado parte de las características morfológicas y de las rutas implicadas en la muerte celular (Arnoult *et al.*, 2001; Ameisen, 2002; Jiménez *et al.*, 2009).

Aunque la mayoría de los trabajos de investigación sobre los mecanismos de la MCP se han llevado a cabo en animales y relativamente poco se ha investigado en plantas, por ahora se ha documentado que la muerte celular en plantas presenta similitudes con la muerte celular en animales. El conocimiento actual sobre MCP en plantas es muy incipiente y se requiere de mayor información que permita conocer con más detalle y profundidad los cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que

sufren las células que mueren en los procesos de desarrollo normal de la planta y de aquella que es consecuencia de una respuesta de defensa al ataque por patógenos. En la medida en que se avance en este conocimiento, se estará en posibilidad de diferenciar la muerte celular hipersensitiva de otros tipos de MCP y se podrá dilucidar el papel de la RH en los mecanismos de defensa de la planta. En esta revisión se presenta información actualizada acerca de la MCP en plantas y particularmente de aquella que involucra la muerte celular hipersensitiva en la interacción planta-patógeno.

2.2.1. Muerte Celular Programada en Plantas

Las células de los organismos pueden fallecer por autodestrucción (“suicidio”) o por necrosis (“asesinato”) (Figura 1). La MCP es una autodestrucción celular que se presenta como un proceso normal en los seres vivos, tiene lugar de una manera perfectamente organizada y regulada, es fundamental para su desarrollo y supervivencia y se dispara en respuestas a estrés por factores bióticos o abióticos (Greenberg, 1996; Gilchrist, 1998; Iakinova *et al.*, 2005). En contraste, la necrosis en un sentido figurado es un “asesinato” en el que la muerte celular resulta de la exposición a compuestos tóxicos, estrés severo por frío o calor, o daño severo que causa un deterioro inmediato e irreversible a la membrana u organelos celulares (Gilchrist, 1998).

En plantas, el suicidio celular o MCP se presenta en varias etapas de su desarrollo como un proceso normal de diferenciación de tejidos y órganos, y de adaptación a condiciones ambientales; las evidencias obtenidas en varios sistemas modelo, tanto *in vitro* como *in vivo*, soportan la hipótesis que una variedad de MCPs pueden ser disparadas en circunstancias distintas (Guimarães y Linden, 2004) y por consiguiente existen diferencias en los cambios morfológicos que sufren las células que mueren. Entre otros ejemplos de MCP que comúnmente se presentan en plantas podemos mencionar: 1) la degeneración de células específicas que ocurre durante el crecimiento del embrión y germinación (las células suspensoras del embrión y las del escutelum y endospermo mueren), la muerte de los cotiledones, pétalos, carpelos y otras partes florales, y de células parenquimatosas en la formación del aerénquima; 2) la diferenciación de flores masculinas y femeninas; usualmente las flores son originalmente bisexuales y el desarrollo de flores masculinas involucra la MCP del gineceo y la formación de la flor femenina resulta de la muerte del androceo; 3) la prevención de autofecundación por MCP de las células del estigma y/o del tubo polínico; y 4) la formación de xilema por muerte de elementos de los vasos, y de las células que se constituyen en traqueidas, fibras y esclereidas.

La información que se ha generado en estudios concernientes a la MCP en metazoarios ha proporcionado las bases para agruparla en tres categorías considerando tanto las características morfológicas que presentan las células que fallecen, como el tipo de organelo celular involucrado en el fallecimiento: 1) **apoptosis**; 2) **muerte lisosomal (autofagia)** y 3) **muerte no lisosomal** (Schweichel y Merkel, 1973; Baehrecke, 2003). En la **apoptosis**, la célula destinada a fallecer es devorada por una célula viva (es una especie de “canibalismo”) que la degrada en su lisosoma (organelo celular en el que se almacenan enzimas hidrolíticas que llevan a cabo la digestión intracelular o extracelular de macromoléculas); en la **autofagia o muerte celular lisosomal** la célula que muere se autodestruye utilizando su propio sistema lisosomal; y en la muerte **no lisosomal** no está involucrada la degradación lisosomal y es un tipo de MCP menos frecuente (van Doorn y Woltering, 2005). van Doorn y Woltering (2005) indican que la mayoría de los ejemplos documentados de MCP durante el desarrollo de la planta caen en la categoría de muerte autofágica, no teniendo a la fecha ejemplos de muerte del tipo apoptótico y algunos casos no corresponden ni a apoptosis ni a autofagia.

Apoptosis. Las características típicas de la apoptosis incluyen la fragmentación del ADN en piezas de aproximadamente 50 kb y/o fragmentos pequeños cuyos tamaños son múltiplos de 180 pb; globulación de la membrana plasmática; condensación del núcleo y del citoplasma; desintegración de elementos del citoesqueleto; y el núcleo se divide en cuerpos apoptóticos, pequeñas estructuras de membrana que contienen el ADN fragmentado y que migran a los márgenes de la célula y son captados por células adyacentes (Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998; Ameisen, 2002). Una característica distintiva de la apoptosis en animales es que los fragmentos de las células muertas son envueltos y digeridos por los lisosomas de células vecinas, lo cual no se ha observado en plantas, por lo que algunos investigadores han comentado que este tipo de MCP no existe en las plantas (Iakinova *et al.*, 2005).

Las caspasas son las moléculas ejecutoras de la MCP en animales (Whyte, 1996; Khurana *et al.*, 2005). Estas proteínas poseen un sitio activo a base de cisteína y separan a los residuos de ácido aspártico rompiendo el enlace que lo mantiene unidos al substrato polipeptídico (Hengartner, 2000; Sanmartín *et al.*, 2005). Las caspasas pueden dividirse en dos grupos, aquellas con prodominios grandes que funcionan como los iniciadores de la cascada de la muerte celular y aquellas con prodominios pequeños que actúan como efectores (Fesik, 2000). Estas enzimas son altamente conservadas a través de la

evolución y pueden ser encontradas en el hombre, insectos, nematodos e hidras (Hengartner, 2000).

Aunque homólogos funcionales de las caspasas no han sido identificados en plantas, una gran cantidad de evidencias indirectas sugieren la existencia en plantas de enzimas con actividad como las caspasas (Woltering *et al.*, 2002; del Pozo y Lam, 2003; Iakinova *et al.*, 2005). Diferentes tipos de enzimas proteolíticas de plantas son asociadas con la MCP durante la senescencia de órganos y la diferenciación de elementos traqueales, y recientemente son ligadas a la muerte celular inducida por estrés ambiental y por patógenos (Groover y Jones, 1999; Beers *et al.*, 2000; Woltering *et al.*, 2002, Belenghi *et al.*, 2004). del Pozo y Lam (1998) examinaron los efectos de dos inhibidores péptidos específicos de caspasas para determinar si la actividad como caspasa está involucrada en la muerte celular en tabaco inducida por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Los dos inhibidores suprimieron la muerte celular, ya que a las 42 horas después de la infiltración del patógeno y los inhibidores, no fueron evidentes síntomas de muerte celular. Por el contrario, la muerte celular fue observada en las plantas control solo con el patógeno a las 16-18 horas. En otro trabajo de investigación, se probaron tres inductores de apoptosis de mamíferos en células de jitomate para inducir MCP (de Jong *et al.*, 2000). La presencia de la muerte celular fue acompañada por algunas características típicas de la apoptosis en animales, como fueron cambios en la morfología del núcleo (contracción del núcleo y condensación de la cromatina), fragmentación del mismo y del ADN. Estos resultados sugieren la presencia en plantas de proteasas con actividad como caspasas que participan en la MCP.

La información sobre la MCP en plantas indica que algunas de las características morfológicas a nivel celular son semejantes a las que se presentan en la apoptosis de animales y se sugiere que al menos las etapas finales de la apoptosis, como es caracterizado en animales, se conservan en las plantas (Dangl *et al.*, 1996). Pero esto no confirma que la ruta de señales este igualmente conservada. Sin embargo, factores que desencadenan la muerte celular en plantas (como la esfinganina análoga a las micotoxinas y al ácido araquidónico que inducen apoptosis en células animales) permiten la expresión de los mismos marcadores de apoptosis en las células vegetales sensibles, lo cual sugiere que al menos en estos casos las rutas de señalización y los genes reguladores se conservan tanto en animales como en plantas (Gilchrist, 1998). Wang *et al.* (1996), concluyen que las propiedades funcionales de la apoptosis en animales se presentan en las plantas, y el papel de la MCP en plantas es parecido a lo propuesto en los animales, tanto en la salud como en la enfermedad.

También en organismos unicelulares se ha observado que se presenta la muerte celular con características apoptóticas. Arnoult *et al.* (2001), reportaron que en la muerte celular de *Dictyostelium discoideum* se presenta una desorganización del potencial de membrana de la mitocondria que precede a la inducción de varias características como las presentes en la apoptosis, incluyendo exposición de los residuos fosfatidil en la superficie externa de la membrana celular, una intensa vacuolación, fragmentación de ADN y liberación de residuos de desechos apoptóticos que son engullidos por células vecinas. En la microalga *Dunaliella viridis*, expuesta a varios estreses ambientales, se presentan diferentes tipos morfológicos de muerte celular, los cuales dependen del estímulo recibido (Jiménez *et al.*, 2009).

Una de las mayores dificultades para detectar marcadores morfológicos de la apoptosis en células, o en las células que son preparadas para someterse a una MCP, es que el proceso está localizado por lo regular en pocas células y no es sincronizado. La observación de las etapas del proceso es limitado por la habilidad para predecir cuáles células están destinadas a someterse a la MCP y cuándo ésta comenzará (Gilchrist, 1998).

Autofagia. La autofagia es un proceso dinámico que involucra el reordenamiento de las membranas subcelulares para engullir citoplasma y organelos, y entregarlos al lisosoma o vacuola donde son degradados y reciclados (Guimarães y Linden, 2004, Greenberg, 2005). Se presenta en organismos tan diversos como plantas, animales y levaduras, y tiene un papel importante en los procesos de reciclaje de proteínas y organelos, aunque también ha sido ligado a condiciones de desarrollo y patológicas (Klionsky y Emr, 2000). La autofagia está dividida en cuatro etapas: 1) inducción del autofagosoma, 2) su formación, 3) su acoplamiento y fusión con el lisosoma o vacuola, y 4) ruptura del cuerpo autofágico, y es regulada por la acción de varias kinasas, fosfatasas y guanosa trifosfatasas (Klionsky y Emr, 2000; Danial y Korsmeyer, 2004).

En etapas tempranas de la autofagia, las células contienen varias vacuolas autofágicas, el nucleoplasma y el citoplasma aparecen ligeramente oscuros y la estructura nuclear aparece normal. La mitocondria y el retículo endoplásmico están algunas veces dilatados, y el aparato de Golgi esta frecuentemente engrandecido. La membrana plasmática pierde especialización y puede ocurrir su globulación. Una

intensa endocitosis puede ser observada. En las últimas etapas el tamaño y número de las vacuolas puede incrementarse y contener figuras de mielina o lípidos que aparecen como inclusiones grises de tono pálido en el citoplasma (Guimarães y Linden, 2004). En el núcleo se puede condensar la cromatina y tomar una coloración oscura que puede ser observada bajo el microscopio de luz. En las últimas etapas de la autofagia, los residuos que quedan de la célula son frecuentemente removidos por heterofagia (Guimarães y Linden, 2004).

Liu *et al.* (2005), mencionan que la autofagia en plantas participa en los procesos antivirales como una respuesta de defensa. En plantas de *Nicotiana benthamiana* donde silenciaron al gen *BECLIN 1*, requerido para la inducción de autofagia durante la respuesta de defensa, observaron incrementos en la acumulación de partículas del virus del mosaico del tabaco (VMT) en los sitios de infección y la muerte celular no fue restringida a las hojas inoculadas, por el contrario, en las plantas control la muerte celular fue restringida a los sitios de inoculación y la autofagia se presentó en sitios cercanos y lejanos de la MCP.

Muerte celular no-lisosomal. En la muerte celular no-lisosomal no participan los lisosomas, y está asociada con el abultamiento de los organelos y la formación de los espacios vacíos en el citoplasma además de tener similitudes con la necrosis (Iakinova *et al.*, 2005; van Doorn y Woltering, 2005). Aparentemente, las células se matan ellas mismas por inhibición de alguna ruta biosintética mayor, desestabilizando sus membranas, o en otras rutas desconocidas (van Doorn y Woltering, 2005).

2.2.2. Respuesta de Hipersensibilidad (RH)

La RH se define como una muerte rápida de las células vegetales asociada con la restricción del crecimiento del patógeno (Goodman y Novacky, 1994) y generalmente se reconoce por la presencia de una o varias células muertas con coloración café en el sitio de infección. La lesión café puede visualizarse a nivel macroscópico cuando involucra a un número suficiente de células; no obstante, en algunos casos la necrosis solamente es visible a nivel microscópico cuando son pocas las células involucradas. Se ha consignado que las plantas en las que se dispara la RH muestran cierto grado de resistencia a patógenos en tejidos distantes al sitio donde ocurrió la reacción; este tipo de protección se le conoce como resistencia sistémica adquirida (RSA) y el ácido salicílico (AS) es al parecer esencial

para su inducción (Gaffney *et al.*, 1993).

Inicialmente, se consideró que la RH era una respuesta característica de plantas resistentes y que se disparaba solamente en aquellas situaciones en la que existía una relación gen a gen. Por otro lado, se asumía que el producto del gen de avirulencia (*avr*), que actúa como elicitador específico, interactuaba con el producto del gen de Resistencia (*R*) correspondiente; esto es, que únicamente se presentaba en interacciones de tipo incompatible. Sin embargo, en la actualidad se sabe que la RH se expresa tanto en plantas hospedantes como en no hospedantes y es controversial si el control genético es el mismo en ambos casos (Heath, 2000). Estudios recientes con mutantes han revelado que la RH también depende de genes adicionales que parecen estar presentes tanto en individuos resistentes como susceptibles, y que le confieren a la planta la habilidad de responder hipersensitivamente aún en situaciones donde no existe la relación *R-avr* (Heath, 2000). Asimismo, a la fecha se han aislado pocos elicitores específicos y también algunos hongos y oomicetos producen una variedad de metabolitos que forman parte de sus componentes o secreciones (carbohidratos de la pared celular, proteínas y glicoproteínas), conocidos como elicitores no específicos, que pueden inducir las respuestas de defensa de las plantas, y en algunos casos la muerte celular (Heath, 2000). Bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae* van Hall, *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow y *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*, entre otras, poseen elicitores proteínicos que disparan la RH (He *et al.*, 1994; He, 1996; Grant y Mansfield, 1999). Los oomicetos *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff. y *P. capsici* Leonian producen las proteínas criptogeina y capsiceina, respectivamente, que actúan como elicitores (Ricci *et al.*, 1989).

Aún cuando se considera que la RH en la planta es la máxima expresión de resistencia al ataque por patógenos, no siempre resulta efectiva para protegerla del ataque de éstos. Su eficacia para detener el avance del patógeno va a estar en gran medida determinada por el hábito alimenticio del patógeno, si es biotrófico, hemibiotrófico o necrotrofico y si crece intra o extracelularmente (Morel y Dangl, 1997). La colonización exitosa del tejido hospedante por el patógeno va a depender de si el patógeno tiene la capacidad de echar mano de por lo menos alguna de las siguientes estrategias: 1) tener la capacidad de evadir el sistema de detección (vigilancia) de la planta no produciendo moléculas elicitoras que lo puedan delatar, o si las produce “camuflajearlas” de forma que no sean detectadas por el hospedante; 2) aún cuando produzca las moléculas elicitoras, poder interferir con las respuestas de defensa, por

ejemplo mediante detoxificación de compuestos antimicrobianos; 3) poseer una tasa alta de crecimiento (o de movilización como los fitonematodos) de modo que pueda alejarse rápidamente del sitio en el que se están dando con mayor intensidad las respuesta de defensa; 4) tener un hábito alimenticio que se acerque más al extremo de los necrotróficos (organismos que asesinan a las células para utilizarlo como substrato alimenticio), de manera que al asesinar un área extensiva de células hospedantes, mediante la producción de grandes cantidades de toxinas o enzimas, interfiera con las respuestas de defensa activa (producción de fitoalexinas y otros metabolitos antimicrobianos, engrosamiento de paredes celulares y acumulación de calosa, entre otras) que llevan a cabo las células vivas vecinas.

En la actualidad, las evidencias que se tienen de que la RH resulta de procesos de MCP son: la activación del fallecimiento celular en ausencia de patógenos por mutación de ciertos genes que se considera están involucrados en la ruta de muerte, la activación de la muerte cuando elicitores producidos por el patógeno son reconocidos, y la activación de la RH por transgenes en plantas. El hecho de que una muerte similar a la RH pueda activarse en la ausencia del patógeno, sugiere que este tipo de fallecimiento celular no es directamente causado por el patógeno invasor sino que más bien resulta de la activación de una ruta específica determinada de MCP en el hospedante (Iakimova *et al.*, 2005). Dangl *et al.* (1996), indican que la existencia de mutantes que espontáneamente activan la RH en ausencia de un patógeno constituye la evidencia más contundente de que la RH es un proceso de MCP. Estos mutantes conocidos como “mutantes que imitan lesiones de enfermedad” (“disease lesion mimics”) y las mutaciones que causan la aparición de lesiones de RH en la ausencia de patógenos probablemente ocurren en genes que controlan la MCP; por lo anterior, tales mutantes constituyen una herramienta poderosa para el estudio de la RH en plantas (Iakimova *et al.*, 2005).

Cambios morfológicos y estructurales que ocurren en la RH. Los cambios morfológicos y estructurales que acompañan a la MCP durante las interacciones planta-microorganismo han sido investigados en muy pocas interacciones planta-patógeno. En aquellos modelos que se han estudiado, el detenimiento de la corriente citoplasmática seguido por el desmantelamiento del protoplasto y la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear son eventos tempranos que se presentan consistentemente durante la RH.

Una cepa avirulenta de *P. syringae* pv. *glycinea* (Coerper) inoculada en células de soya (*Glycine max*

L.) en suspensión causó MCP, la cual presentó fragmentación del ADN, globulación de la membrana plasmática, condensación del núcleo y citoplasma, y contracción de la célula (Levine *et al.*, 1996). Cuando la inoculación de la bacteria se hizo en hojas completas estos mismos autores observaron que la estructura interna del cloroplasto se perdió y se acumularon granos de almidón en el estroma, y las células del mesófilo mostraron contracción y fragmentación del protoplasto. Tales cambios no fueron observados en la interacción compatible con la cepa virulenta, la cual no provocó una RH. También, células de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) no hospedante del oomiceto *P. cryptogea* tratadas con criptogea sufrieron cambios morfológicos similares a los observado en células de soya con la cepa avirulenta de *P. syringae* pv. *glycinea*. En un cultivar de calabacita (*Cucurbita maxima* Duchesne) resistente a *P. capsici* las células del parénquima del tallo infectado sufrieron plasmólisis de su membrana plasmática, y el material citoplásmico y el núcleo se agregaron en el sitio de contacto de la hifa del oomiceto. Por otro lado, en el cultivar susceptible las membranas plasmáticas de las células infectadas fueron desorganizadas, las células se plasmolizaron y sus cloroplastos se deformaron y mostraron desorganización en su sistema de membranas (Lee *et al.*, 2001). Cambios morfológicos y estructurales similares han sido reportados también en frutos respondiendo hipersensitivamente; así frutos de chile (*Capsicum baccatum* L.) resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides* [*Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk], mostraron varias características citológicas típicas de la MCP como separación de la membrana plasmática de la pared celular, condensación del citoplasma, dilatación del retículo endoplásmico, presencia de numerosas vacuolas pequeñas, núcleo heterocromático y menos osmofílico, y fragmentación del ADN. En contraste, en frutos susceptibles (*C. annuum* L.) se observó degradación de la pared celular, fragmentación de vacuolas, degradación del núcleo y citoplasma, y condensación del citoplasma (Kim *et al.*, 2004). Algunos investigadores han propuesto que en interacciones compatibles la muerte de células hospedantes podría también finalmente constituir una MCP e involucrar mecanismos similares. Sin embargo, es conveniente comentar que los cambios estructurales que los investigadores observaron en las interacciones compatibles calabacita-*P. capsici* y *C. annuum*-*C. gloeosporioides*, tales como la desorganización de las membrana plasmática, plasmolización del citoplasma, deformación de los cloroplastos y desorganización de su sistema de membranas en el primer caso, y la degradación de paredes celulares en los frutos susceptibles en el segundo, son situaciones que claramente evidencian que los mecanismos que condujeron al fallecimiento de las células fueron totalmente diferentes de aquellos que ocurrieron en la RH, y que las células hospedantes fueron asesinadas por el patógeno por la producción

de toxinas y/o enzimas que degradan paredes celulares y compuestos estructurales de las membranas celulares y cuyos efectos nocivos directos sobre componentes estructurales o rutas metabólicas de las células hospedantes ha sido ampliamente documentados.

La fragmentación del ADN en oligonucleótidos de diferentes tamaños se ha observado durante la RH en varias interacciones planta-patógeno; por ejemplo, en células de hojas de tabaco con el gen *N* e infectadas con virus mosaico del tabaco (VMT) se observaron fragmentos de ADN de aproximadamente 50,000 pares de bases (pb); asimismo, Levine y colaboradores (1996) observaron que en la MCP que se presentó en una interacción incompatible soya-*P. syringae* pv. *glycinea* el ADN se rompió en fragmentos de tamaño similar. Por otro lado, la RH en hojas de frijol caupí [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] inoculadas con *Uromyces vignae* Barclay (Ryerson y Heath, 1996; Heath *et al.*, 1997), y en las interacciones avena (*Avena sativa* L.)-*Puccinia coronata* Corda y *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh-*P. syringae* la división del ADN nuclear generó fragmentos pequeños consistentes en múltiplos de 180 pb (Greenberg y Yao, 2004).

Las caspasas son las moléculas ejecutoras de la MCP en animales (Whyte, 1996; Khurana *et al.*, 2005). Estas proteasas poseen un sitio activo a base de cisteína y separan a los residuos de ácido aspártico rompiendo el enlace que lo mantiene unidos al substrato polipeptídico (Hengartner, 2000; Sanmartín *et al.*, 2005). Los resultados de estudios moleculares y bioquímicos apoyan la hipótesis de que enzimas similares a las caspasas están involucradas en la RH de las plantas, ya que ésta fue suprimida cuando se aplicaron péptidos sintéticos inhibidores de las caspasas (del Pozo y Lam, 1998) y aún cuando, por ahora no se han identificado enzimas caspasas en plantas, existe información que sugiere la existencia de proteasas que poseen un sitio activo a base de cisteína. Lo anterior sustenta la idea de que en plantas existen proteasas con actividad de caspasas que participan en la MCP. Asimismo, se ha sugerido que proteínas pequeñas de la familia Ras pertenecientes a la superfamilia G (proteínas pequeñas que se unen a GTP= trifosfato de guanosina) y que funcionan también como moléculas ejecutoras de MCP en animales, podrían igualmente estar involucradas en la MCP en plantas. Las proteínas Ras son importantes en el ciclo celular de las plantas al unirse a GTP y a proteasas afines a cisteína (Iakimova *et al.*, 2005).

Cascada de eventos bioquímicos que ocurren en la RH. Una vez que ocurre la interacción de la

molécula efectora (E) producida por el patógeno con la molécula receptora (R) en la superficie o interior de la célula vegetal, se desata una cascada de eventos que incluyen la activación de múltiples rutas de transducción de señales hacia el interior de la célula invadida y que involucran la explosión oxidativa a través de la cual se producen especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; O_2^- , anión superóxido; y OH^\cdot , radical hidroxilo); flujo de iones como H^+ , K^+ y Ca^{2+} ; la actividad de cinasas y fosfatasa que transmiten y amplifican la señal cuyo blanco último generalmente son los factores de transcripción que regulan la expresión de genes. Los genes expresados son aquellos que codifican para peroxidasa y enzimas clave de las rutas del metabolismo secundario (como PAL y HMG-CoA= 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa) a través de las cuales se sintetizan compuestos con propiedades antimicrobianas (fenoles y fitoalexinas, por ejemplo); proteínas relacionadas con patogénesis (como β -glucanasas y quitinasas); compuestos (fenoles y lignina) y proteínas que refuerzan y protegen a las paredes celulares contra la actividad de enzimas que degradan paredes celulares o que interfieren con la actividad de estas últimas como las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Lummerzheim *et al.*, 1993; Hammond-Kosack y Jones, 1996; Greenberg, 1997; Xu y Heath, 1998). Entre las señales que se generan y que dan la “voz de alarma”, tanto a nivel local en las células vecinas, como de manera sistémica son el etileno y los ácidos salicílico y jasmónico (Figura 2). Todas estas respuestas de defensa en realidad se presentan tanto en interacciones compatibles como en incompatibles y la diferencia radica en la rapidez y la magnitud con la que se expresan en cada interacción.

2.3. Conclusiones

El énfasis en las investigaciones de la RH se ha puesto en los cambios bioquímicos y moleculares que ocurren en las células involucradas y los cambios morfológicos y ultraestructurales se han estudiado en relativamente pocos modelos planta-patógeno. No obstante, por las características estructurales y morfológicas que muestran las células suicidas, se considera que la RH es una MCP del tipo lisosomal o autofágica. Por otro lado, aún cuando a la fecha no se ha demostrado la existencia de proteínas caspasas en plantas, mismas que en animales se han señalado como las moléculas ejecutoras de la MCP; los estudios moleculares y bioquímicos por ahora disponibles en plantas apoyan la hipótesis de que enzimas con similitud funcional a las caspasas están involucradas en la ejecución de las células hipersensitivas. Futuras investigaciones acerca de la RH deberán considerar un mayor número de modelos de interacción planta-patógeno incluyendo aquellas en las que no existe una clara relación gen a gen; también, además de comparar y contrastar los cambios morfológicos y estructurales que se dan

en las interacciones compatibles (necrosis por patogénesis) e incompatibles (necrosis por RH), habrá que profundizar en el entendimiento de los mecanismos bioquímicos finos que conducen a la muerte celular, para de esta manera contar con la suficiente evidencia experimental que permita determinar si existen o no diferencias importantes a este nivel cuando la célula se suicida (RH) con la “intención” de defenderse del ataque por el patógeno y cuando es asesinada por éste.

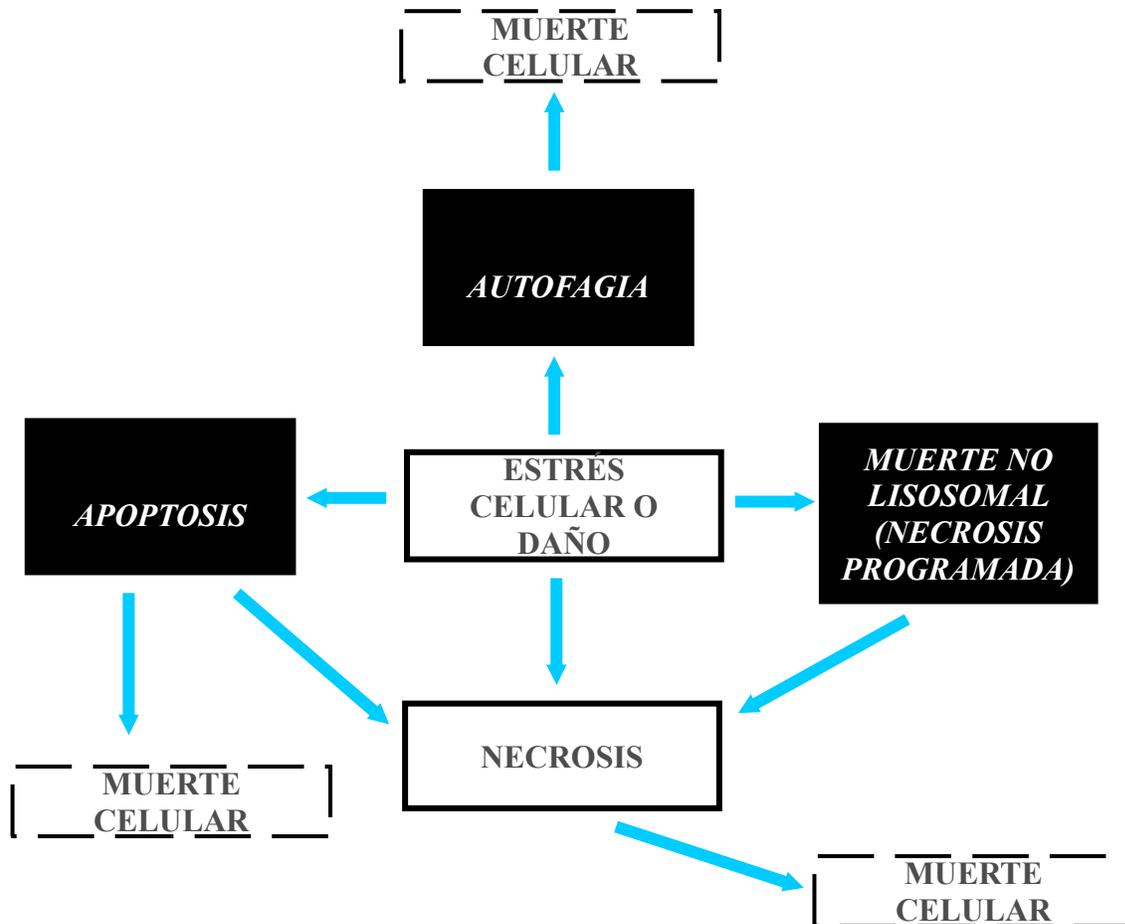


Figura 1. Tipos de degeneración celular que ocurren en células sujetas a estrés o daño. Los tipos de muerte celular programada se indican en los rectángulos negros. El fallecimiento de la célula (muerte celular) puede ocurrir por suicidio (muerte celular programada) o por asesinato (la muerte celular resulta de la exposición a compuestos tóxicos, estrés severo por frío o calor, o daño severo que causa un daño inmediato irreversible a la membrana u organelos celulares).

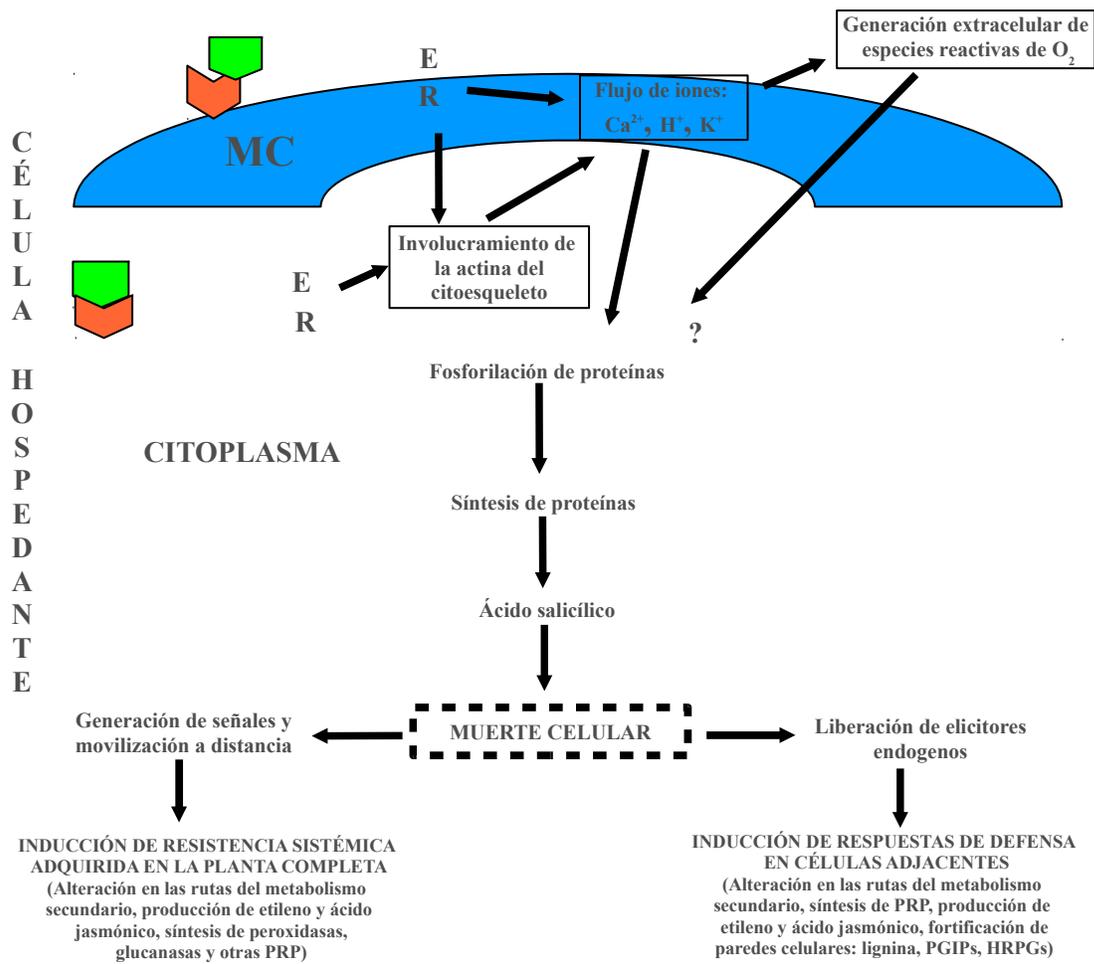


Figura 2. Secuencia de eventos que ocurren en la muerte celular hipersensitiva en algunas interacciones planta-patógeno. E= elicitor producido por el patógeno y que puede ser específico (producto de un gen avr) o no específico. R= receptor producto o no de un gen R del hospedante y que puede estar presente en la membrana celular (MC) o en el citoplasma. PRP= proteínas relacionadas con patogénesis. PGIPs= proteínas inhibidoras de poligalacturonasas. HRGPs= glucoproteínas ricas en hidroxiprolina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Establecimiento de ensayos

Material vegetal e inóculo. Las semillas de chile CM334 y Yolo Wonder (utilizado como control susceptible a *Phytophthora capsici*) se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 min y se enjuagaron con agua destilada estéril. Después se colocaron sobre sanitas estériles humedecidas con agua destilada estéril en cajas germinadoras de plástico (28.0 x 16.5 x 4.5 cm) y se mantuvieron en total oscuridad por 12 días en una cámara de germinación a 27 °C. Las plántulas se transfirieron a pequeños vasos de plástico (25.0 cm³) con arena fina estéril y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25±2 °C con 14 h de luz y 10 h de oscuridad. Los patógenos *P. capsici* (cepa 6143, proporcionada por la Dra. Sylvia Fernández-Pavia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) y *Fusarium oxysporum* (proporcionada por el Dr. Marcelo Acosta-Ramos de la Universidad Autónoma Chapingo) se cultivaron a temperatura ambiente durante 17 días en medio V8 y PDA, respectivamente. Para la inoculación de las plantas se cortaron discos de 0.5 cm de diámetro de medio de cultivo con micelio, verificando que tanto el micelio de *P. capsici* como el de *F. oxysporum* tuvieran zoosporas y conidios, respectivamente.

Inoculación. A los 15 días de permanecer en las cámaras de crecimiento y tener entre 4-6 hojas verdaderas, las plantas se inocularon con los discos de medio de cultivo. Un día antes de la inoculación se colocó un humidificador dentro de la cámara para incrementar la humedad relativa. Se hizo una punción en el nudo de las hojas cotiledonarias con una aguja de disección, sobre esta área se colocó el disco de medio de cultivo y se cubrió con un cuadro de sanita estéril humedecida con agua destilada estéril y papel aluminio estéril. El humidificador se mantuvo en la cámara hasta las 72 h posteriores a la inoculación.

Tratamientos y tiempos. Para las plantas de CM334 se tuvieron tres tratamientos: 1) inoculación con *P. capsici*, 2) inoculación con *F. oxysporum* y 3) testigo (con punción y disco de medio de cultivo sin

micelio). Para las plantas de Yolo Wonder se tuvieron dos tratamientos: 1) inoculación con *P. capsici*, y 2) testigo. Para el caso de las inoculaciones con *P. capsici*, se consideraron 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi); tales tiempos se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en dos ensayos preliminares en los que se determinó que los síntomas visibles de necrosamiento en los tallos y cambios estructurales evidentes en cortes histológicos, se presentaban a partir de las 12 hpi y después de las 48 h la necrosis de los tallos ya era muy severa. Para *F. oxysporum* se consideraron los tiempos 48, 96 y 120 hpi. Para las plantas testigo los tiempos se establecieron tomando como referencia aquellos considerados para observar los cambios inducidos por ambos patógenos, así las plantas testigo de CM334 se evaluaron a las 12, 24, 48, 96 y 120 hpi y las de Yolo Wonder a las 12, 24 y 48 hpi.

Para cada tratamiento y tiempo se tuvieron cinco plantas para realizar observaciones con microscopia de luz. Además en cada tratamiento se mantuvieron cinco plantas adicionales para evaluar el avance de la necrosis a lo largo del tallo y la colonización del tejido por el patógeno.

3.2. Avance de la necrosis y colonización sistémica por el patógeno

Las plantas de CM334 inoculadas con *P. capsici* fueron evaluadas a los 9 días después de la inoculación (dpi). Se midió (cm) el avance de la necrosis por abajo del sitio de la punción e inoculación, ya que toda la parte apical del tallo se necrosó como consecuencia del severo estrangulamiento que se desarrolló en el sitio de la inoculación. Con la finalidad de determinar hasta qué segmento había logrado avanzar sistémicamente el oomiceto, se tomaron tres fragmentos de tallo de 1.0 cm de longitud partir del sitio donde terminaba la necrosis, el primer fragmento abarcó tejido necrosado y tejido aparentemente sano (fragmento A) y el segundo y tercer fragmento (B y C, respectivamente) se tomaron hacia la base del tallo en donde no se observó una necrosis aparente (Figura 3a). Cada fragmento de tallo se colocó en una caja Petri de plástico (60 x 15 mm) con agua destilada estéril, las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz blanca constante por 72 h para observar la presencia o ausencia de esporangios en cada fragmento. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* y el testigo se evaluaron a los 30 dpi como se describió para *P. capsici*, excepto que los fragmentos de tallo fueron de 1.5 cm de longitud. Debido a que en las plantas inoculadas con *F. oxysporum* no se observó daño en la parte apical (por ausencia de un necrosamiento severo que diera lugar al estrangulamiento del tallo), de los tres fragmentos evaluados el A correspondió a la parte

apical, el B al sitio de inoculación y el C a la parte basal (Figura 3b).

3.3. Microscopia de luz

Fijación e inclusión del material vegetal. Se cortaron 0.5 cm de tallo de la porción superior e inferior al sitio de punción e inoculación. Inmediatamente después del corte, los tallos se fijaron por 24 h en una mezcla de formaldehído: ácido acético glacial: alcohol al 96%: agua 10: 50: 5: 35. Posteriormente, los tallos se lavaron con agua corriente por 20 min y se deshidrataron en una serie gradual de alcohol etílico por 3 h en cada cambio (50 - 100%). Los tallos se transfirieron a una mezcla de alcohol absoluto: xilol 1:1 y xilol puro por 3 h. Para la inclusión en parafina (paraplast regular SIGMA®), los tallos se colocaron en mezclas de xilol:parafina 2:1, xilol:parafina 1:1 y xilol:parafina 1:2 por 2 h en cada mezcla a 55-56 °C. Posteriormente, los tallos se colocaron en parafina pura por 48 h (López *et al.* 2005). Las muestras incluidas en parafina se cortaron transversal y longitudinalmente a 8 µm de grosor con micrótopo HYRAX M 25 marca ZEISS.

Tinción doble safranina (metilcelosolve) – verde rápido (metilcelosolve). Los portaobjetos se colocaron en una plancha a 65 °C para fundir la parafina. Posteriormente, se pasaron por tres cambios de xilol puro, un cambio en una mezcla de xilol: etanol al 100% y se hidrataron en alcohol al 100 y 96% por tres min en cada cambio. Los portaobjetos se colocaron por 24 h en safranina (safranina O SIGMA-ALDRICH® 4 g, metilcelosolve 200 mL, alcohol 96% 100 mL, agua destilada 5 mL, acetato de sodio 4 g y formol 8 mL) y se enjuagaron durante 1 h con agua destilada. Para diferenciar y deshidratar, los portaobjetos se colocaron en una solución de etanol al 96% (95 mL) más ácido pícrico (solución saturada 5 mL), se lavaron con etanol al 96% (100 mL) más amoniaco (4-5 gotas) por no más de 10 seg y se deshidrataron con etanol al 100% por 10 seg. Los cortes se contrastaron con verde rápido (Fast Green FCF SIGMA-ALDRICH® 0.5 g, etanol al 100% 33.3 mL, metilcelosolve 33.3 mL y aceite de clavo 33.3 mL) por 20 seg, se lavaron con aceite de clavo para quitar el exceso del colorante y se colocaron en una mezcla de aceite de clavo (50 partes), xilol (25 partes) y etanol absoluto (25 partes). Finalmente, los cortes se aclararon con xilol y se montaron en resina sintética (en xilol al 60%) (López *et al.* 2005). Los cortes se observaron en un microscopio de luz VE-B6 marca Velab.

Observaciones y variables evaluadas. Se contaron y caracterizaron los núcleos de las células

corticales y medulares del tallo, así como el número de células del xilema con polifenoles o hifas y número de células medulares y corticales con cristales. Los tratamientos y tiempos evaluados fueron CM334-*P. capsici* 24 hdi, CM334-*F. oxysporum* 48 hdi, CM334-Testigo 24hdi, Yolo Wonder-*P. capsici* 24 hdi y Yolo Wonder-Testigo 24 hdi. En cada tratamiento se evaluaron los cortes de cinco portaobjetos consecutivos: en un portaobjetos se montaron los cortes en donde se hicieron la punción e inoculación, otros dos contenían los cortes anteriores a la punción y los dos restantes los cortes posteriores a la punción. De cada portaobjetos se observaron 5 cortes histológicos no consecutivos. Se observaron cuatro campos visuales para la corteza, dos para la médula y cuatro para el xilema con el objetivo de 40X.

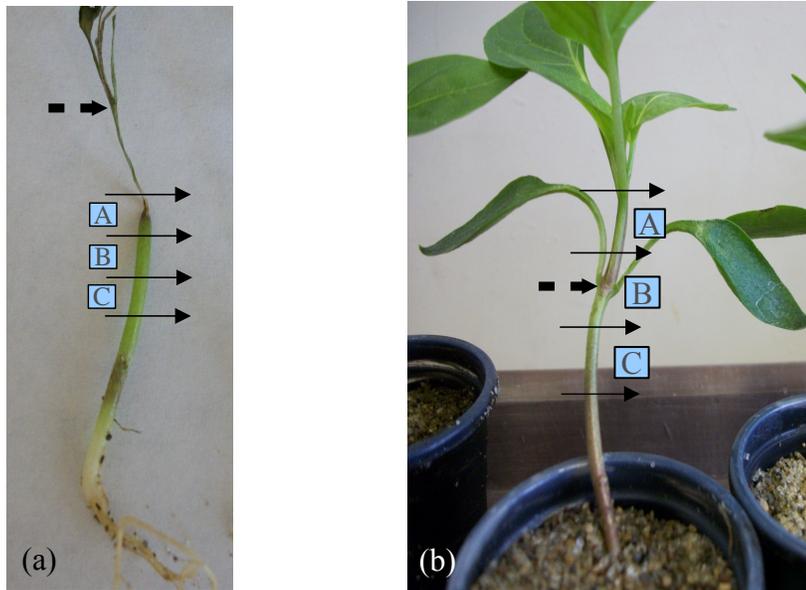


Figura 3. Sitio de punción e inoculación en el nudo de las hojas cotiledonarias indicado por la flecha discontinua. Localización de los tres fragmentos de tallo (A, B y C) en las plántas de chile CM334 en los que se determinó el avance de la colonización por *P. capsici* (a) y *F. oxysporum* (b).

4. RESULTADOS

4.1. Avance de la necrosis y colonización por el patógeno

Interacción incompatible CM334-*P. capsici*. A las 24 h posteriores a la inoculación (hpi) se observaron los primeros síntomas de necrosamiento y a los 9 días posteriores a la inoculación (dpi) el necrosamiento avanzó sólo 2.06 cm de longitud en el tallo por debajo del sitio de punción e inoculación. En los fragmentos A, B y C del tallo se detectó la presencia de micelio y esporangios en el 100, 20 y 0% de los fragmentos, respectivamente; de manera que el oomiceto no avanzó al segmento C. La parte apical del tallo a partir del sitio de estrangulamiento murió; sin embargo, el resto del tallo no mostró ningún daño.

Interacción compatible CM334-*F. oxysporum*. A los 3 dpi la longitud de la necrosis en los tallos tuvo un promedio de 0.33 cm y para los 23 dpi fue de 0.52 cm. A los 30 dpi el hongo había avanzado sistémicamente hasta el segmento del tallo más distante al punto de inoculación (2.25 cm por abajo del sitio de inoculación); la presencia de micelio, microconidios y macroconidios se registró en el 60, 100 y 100% de los fragmentos A, B y C, respectivamente.

Plantas testigo. A los 30 días posteriores al establecimiento del ensayo las plantas testigo de CM334 no inoculadas con ninguno de los patógenos, no presentaron síntomas de necrosamiento o signos de algún patógeno.

Interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici*. Los primeros síntomas de necrosamiento se presentaron a las 24 hpi y a los 5 dpi todas las plantas habían muerto. En un ensayo previo se había observado la presencia de micelio y esporangios a lo largo del tallo de todas las plantas (datos no mostrados), lo que evidenció que no se había detenido el avance del patógeno.

4.2. Microscopia de luz

Cambios estructurales considerados en la evaluación. Se consideraron las diferencias estructurales mostradas por los núcleos de las células en las diferentes interacciones, debido a que en este organelo ocurren cambios que pueden ayudar a diferenciar el tipo de muerte celular que causa el deceso de la célula (Levine *et al.*, 1996; Greenberg y Yao, 2004). Se distinguieron tres tipos principales de núcleos: 1) **Normales.** Con formas variadas (esféricos, ovalados o alargados), de color gris claro y con presencia de gránulos generalmente pequeños y oscuros, y con un nucléolo pequeño de color anaranjado (Figura 4 A). 2) **Rojos.** Generalmente esféricos u ovalados, condensados (contraídos), de apariencia granulosa y color rojo. Los gránulos del núcleo de color rosa oscuro a rojo y con frecuencia con nucléolo distinguible (Figura 4 B). 3) **Globosos.** Núcleos grandes y esféricos, de color gris claro, con pocos gránulos oscuros y con un nucléolo grande y de color anaranjado brillante situado generalmente en el centro del núcleo (Figura 4 C y D).

Plantas control. Solamente en las células dañadas por la punción se observó la acumulación de polifenoles desde las 12 a las 96 h después de la punción (Figura 5 A), en esas células los polifenoles se depositaron formando estructuras esféricas de color rojo y textura lisa. Al tiempo 24 h, las células del tallo mostraron el 98.5% de núcleos con apariencia normal y aún en aquellas zonas dañadas por la punción, los núcleos de las células no mostraron cambios (Cuadro 1). A las 120 h se observó un incremento en la acumulación de polifenoles en la zona de punción (Figura 5 B).

Interacción incompatible CM334-*P. capsici*. A partir de las 12 hpi, se observó el colapso de las células epidérmicas y corticales localizadas alrededor del sitio de la inoculación, pero sin degradación aparente de las paredes celulares (Figura 6 A). En la zona de punción hubo acumulación de polifenoles y en las células del parénquima cortical y en los vasos del xilema se observaron las hifas del oomiceto (Figura 8 A). Algunas células cercanas a la punción presentaron núcleos más oscuros con gránulos rojos-negros pero en la mayoría de las células no se observaron alteraciones en los núcleos. En las células del parénquima se detectó la presencia de cristales (Cuadro 2).

A las 24 hpi, el colapso de tejidos avanzó hasta la mitad del tallo (Figura 6 B) y el 30.9% de los núcleos de las células de la corteza no colapsadas mostraron condensación, color rojizo y textura granulosa (Cuadro 1; Figura 4 B). En las células de los estratos de la corteza localizados arriba y debajo de la zona de la inoculación, el 68.6% de los núcleos mostraron una apariencia normal (Cuadro 1). Las hifas del oomiceto se encontraron entre las paredes celulares del tejido cortical y medular del tallo y en el 10.9% de los elementos del vaso del xilema (Cuadro 2).

A las 48 hpi casi la totalidad del diámetro del tallo estaba colapsado, sólo en xilema no se observó daño aparente, y hubo poca acumulación de polifenoles (Figura 6 C). Algunas de las hifas presentes en el parénquima vascular y en el xilema se observaron menos turgentes y con núcleos poco visibles.

Interacción compatible CM334-*F. oxysporum*. A las 48 hpi las células localizadas en el sitio de la inoculación mostraron mayor acumulación de polifenoles (Figura 6 D), en comparación con la interacción incompatible. Los polifenoles se depositaron intra e intercelularmente en los tejidos del tallo (Figura 8 B). Las células en contacto con los polifenoles se degradaron total o parcialmente y formaron franjas con contenido denso de color negro a rojo entre las células del parénquima cortical y a partir del área de punción e inoculación (Figura 8 C). Del total de núcleos visibles en la corteza, el 70.8% presentaron un incremento en volumen y fueron de forma globosa (Cuadro 1). De 1,696 núcleos visibles, sólo el 0.3% presentó color rojo y se localizaron en sitios con acumulación de polifenoles o cercanos a las hifas (Cuadro 1). La peculiaridad de estos núcleos, a diferencia de los observados en la interacción incompatible, es que mantienen un nucléolo grande (Figura 4 C). De 11,385 células corticales, el 0.3% presentaron cristales amorfos (Cuadro 2). Las hifas de *F. oxysporum* invadieron inter e intracelularmente el parénquima y el 1.7% de los elementos del vaso del xilema (Figura 8 D; Cuadro 2).

A las 96 hpi, las células de la médula fueron degradadas y se formaron depósitos de polifenoles en el límite de este tejido con el tejido vascular (Figura 6 E). A las 120 hpi (Figura 6 F) un mayor número de células epidérmicas y corticales del tallo fueron invadidas por micelio de *F. oxysporum*.

Interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici*. A las 12 hpi, las células de la corteza contiguas al

sitio de la punción e inoculación presentaron paredes celulares en proceso de degradación y acumulación de polifenoles (Figura 7 B). Los núcleos de algunas de estas células mostraron coloración rojiza y apariencia granulosa. Hubo presencia de hifas en el xilema y corteza cercanos al sitio de la inoculación.

A las 24 hpi casi la tercera parte del diámetro del tallo estaba colapsado y el 14.3% del total de núcleos observados en la corteza fueron de color rojo y granuloso (Figura 7 C; Cuadro 1). En las zonas cercanas al tejido colapsado, los núcleos mostraron diferente grado de granulación. En la medida en que las células estuvieron más alejadas del sitio de punción, los gránulos fueron mostrando un menor tamaño y coloración negruzca hasta parecer normales. Las hifas crecieron intercelularmente en las células del parénquima (Figura 9 A y B) y también se observaron dentro del 13.2% de los elementos del xilema (Figura 9 C; Cuadro 2). Dentro de las células colapsadas o cerca de éstas, se observó una acumulación mayor de polifenoles con respecto al tiempo anterior, y se observó la presencia de cristales amorfos en el 0.1 y 1.1% de las células de la corteza y médula respectivamente (Cuadro 2).

A las 48 hpi, prácticamente todos los tejidos se encontraban colapsados y las paredes celulares degradadas a excepción del xilema (Figura 7 D). Tanto en el xilema como en algunas células del parénquima no colapsadas se observaron hifas de *P. capsici* y cristales amorfos (Figura 9 D).

Cuadro 1. Número total de células, núcleos y tipos de núcleos en diferentes tejidos de tallo de plantas de chile CM334 y Yolo Wonder. Los conteos en los tratamientos CM334-Testigo, CM334-*P. capsici*, Yolo Wonder-Testigo y Yolo Wonder-*P. capsici* se hicieron a las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) y para el tratamiento CM334-*F. oxysporum* a las 48 hpi.

Tratamiento	Tejido	Total células	Total núcleos	Tipo núcleo		
				Normal	Rojo	Globoso
CM334-Testigo	Corteza	11502	1286	1267 (98.5) ^z	3 (0.2)	16 (1.2)
	Medula	2750	546	546 (100)	0	0
CM334- <i>P. capsici</i>	Corteza	8913	800	549 (68.6)	247 (30.9)	4 (0.5)
	Medula	2355	298	270 (90.6)	28 (9.4)	0
CM334- <i>F. oxysporum</i>	Corteza	11385	1696	491 (29.0)	5 (0.3)	1200 (70.8)
	Medula	- ^y	-	-	-	-
Yolo Wonder-Testigo	Corteza	12768	1792	1762 (98.3)	10 (0.6)	18 (1.0)
	Medula	3665	704	701 (99.6)	0	3 (0.4)
Yolo Wonder- <i>P. capsici</i>	Corteza	7935	1169	1002 (85.2)	167 (14.3)	0
	Medula	4178	846	661 (78.1)	185 (21.9)	0

^z Entre paréntesis porcentaje del total de núcleos. ^y No se evaluó.

Cuadro 2. Número total de células y total de células con polifenoles, cristales e hifas en diferentes tejidos de tallo de plantas de chile CM334 y Yolo Wonder. Los conteos en los tratamientos CM334-Testigo, CM334-*P. capsici*, Yolo Wonder-Testigo y Yolo Wonder-*P. capsici* se hicieron a las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) y para el tratamiento CM334-*F. oxysporum* a las 48 hpi.

Tratamiento	Tejido	Total células	Polifenoles	Cristales	Hifas
CM334-Testigo	Corteza	11502	- ^y	2 (0.02) ^z	0
	Medula	2750	-	5 (0.18)	0
	Xilema	1964	0	-	0
CM334- <i>P. capsici</i>	Corteza	8913	-	0	2 (0.02)
	Medula	2355	-	0	0
	Xilema	1655	8 (0.5)	-	180 (10.9)
CM334- <i>F. oxysporum</i>	Corteza	11385	-	32 (0.3)	2 (0.02)
	Medula	-	-	-	-
	Xilema	3502	62 (1.8)	-	58 (1.7)
Yolo Wonder-Testigo	Corteza	12768	-	23 (0.2)	0
	Medula	3665	-	20 (0.6)	0
	Xilema	2779	0	-	0
Yolo Wonder- <i>P. capsici</i>	Corteza	7935	-	10 (0.1)	25 (0.3)
	Medula	4178	-	45 (1.1)	73 (1.7)
	Xilema	2691	41 (1.5)	-	356 (13.2)

^z Entre paréntesis porcentaje del total de núcleos. ^y No se evaluó.

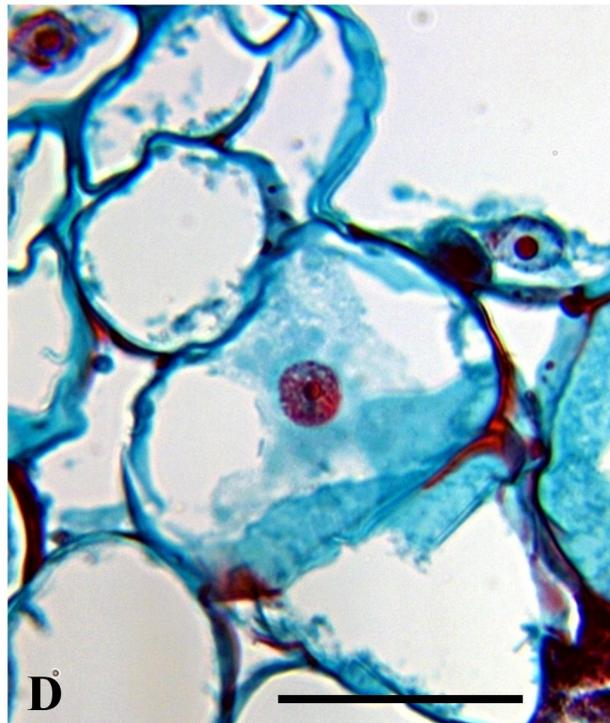
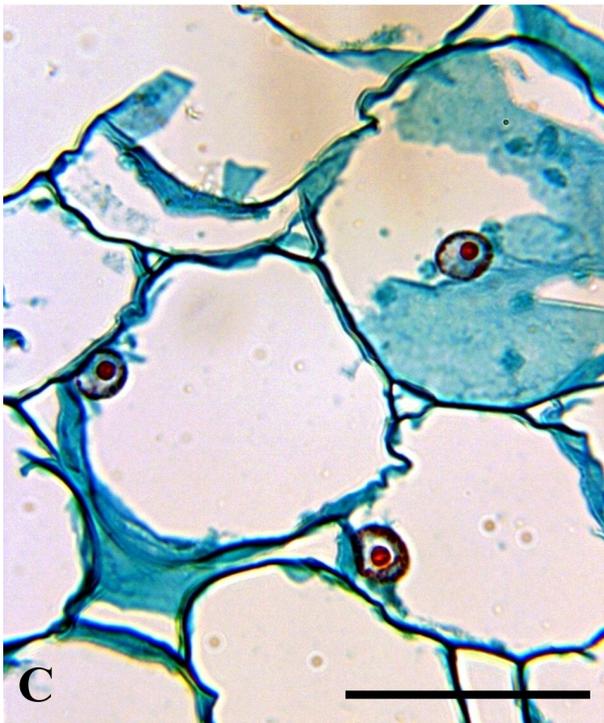
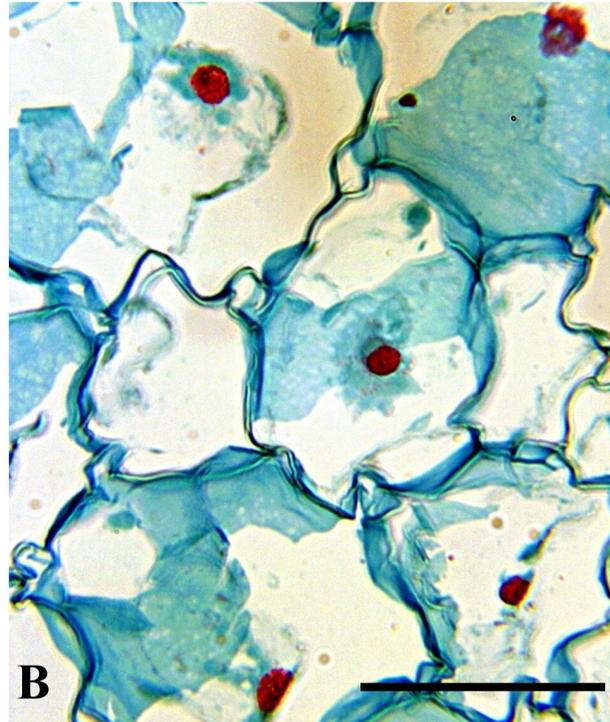
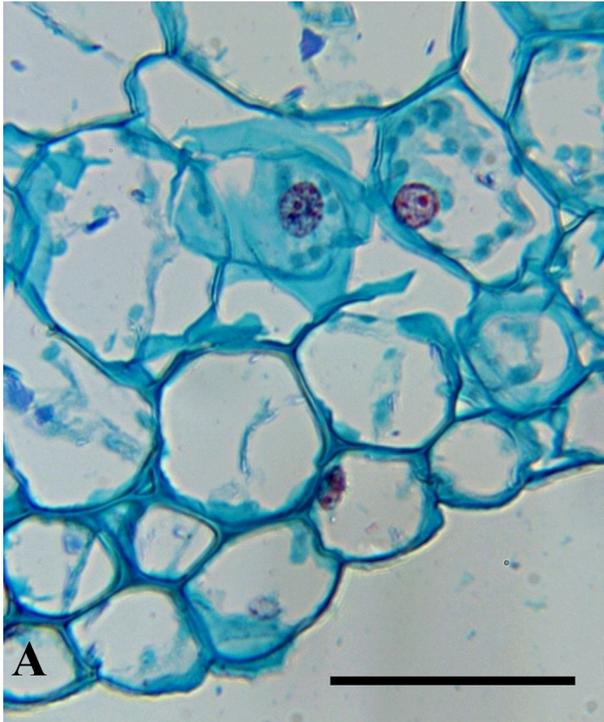


Figura 4. Tipos principales de núcleos: normales (A), rojos (B) y globosos (C). También se observaron pero con poca frecuencia núcleos globosos y rojos (D). Barra= 50 μ m.

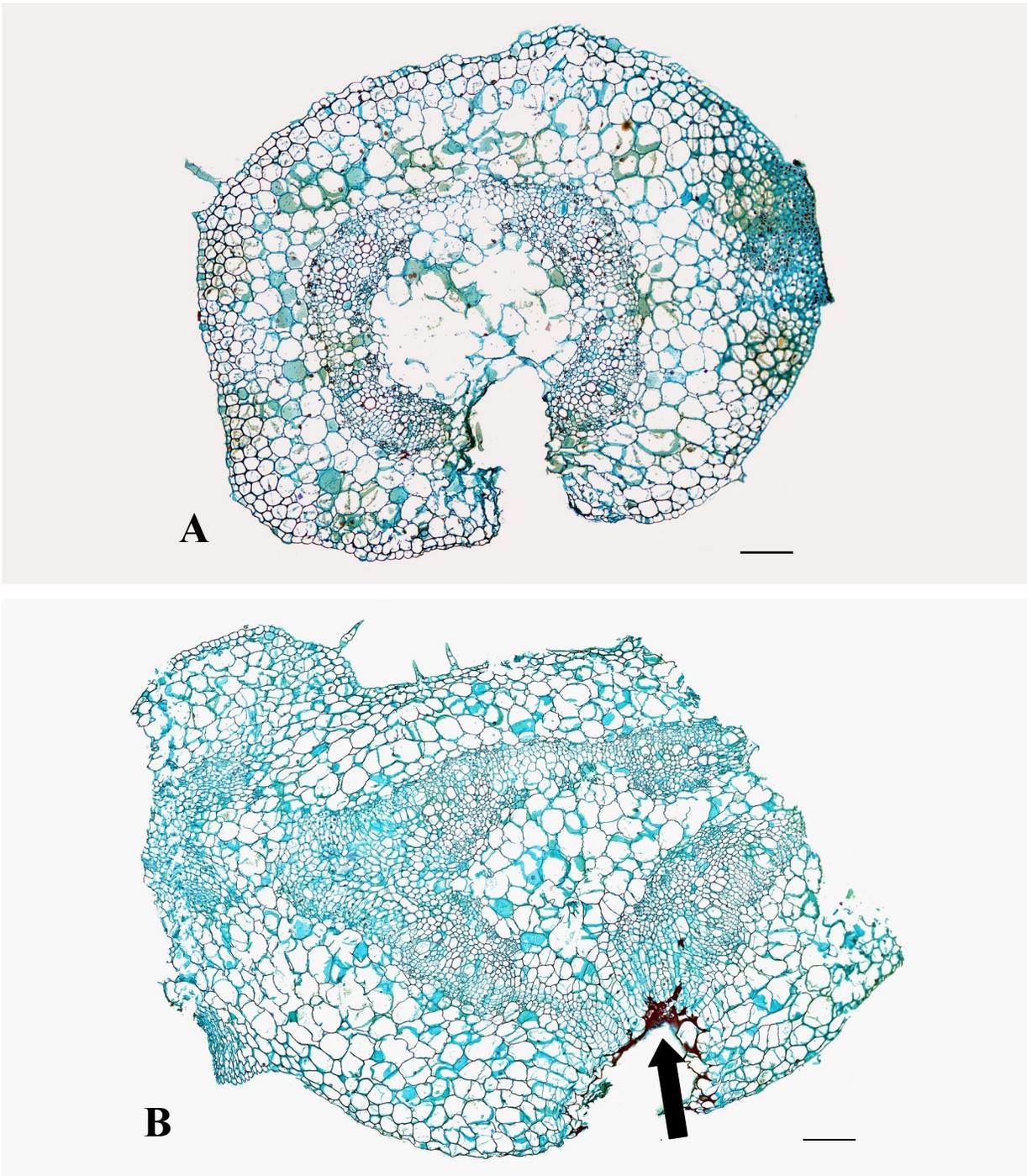


Figura 5. Corte transversal de tallo de plantas testigo de Chile CM334 en corte transversal. A las 12 horas posteriores a la punción (hpp) no se observan cambios estructurales evidentes (A). A las 120 hpp se observa acumulación de polifenoles (en rojo) en la zona de la punción (B). Barra= 100 μ m.

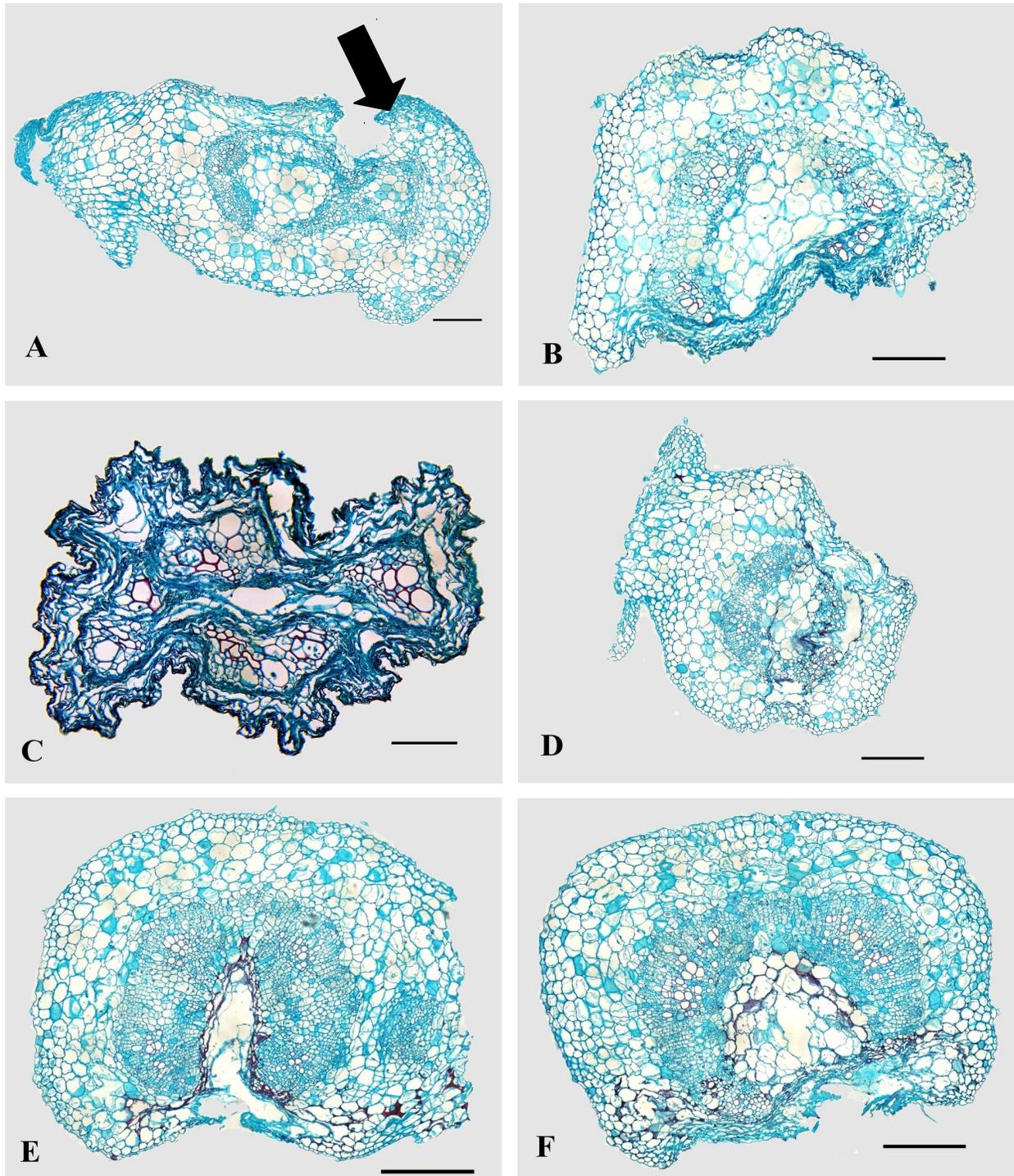


Figura 6. Corte transversal de tallo de plantas de chile CM334 inoculada con *P. capsici* (A-C) o *F. oxysporum* (D-F). A las 12 horas posteriores a la inoculación (hpi) se observan pocas células colapsadas en la zona de la punción (A). La mitad del tallo esta colapsado a las 24 hpi (B). A las 48 hpi todo el tallo colapsado, excepto el xilema (C). Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentan pocas diferencia a las 48, 96 y 120 hpi (D, E y F, respectivamente), pero en todas se observa el colapso y degradación de las células en la zona de la punción y la acumulación de polifenoles (en rojo). Barra= 100 μ m.

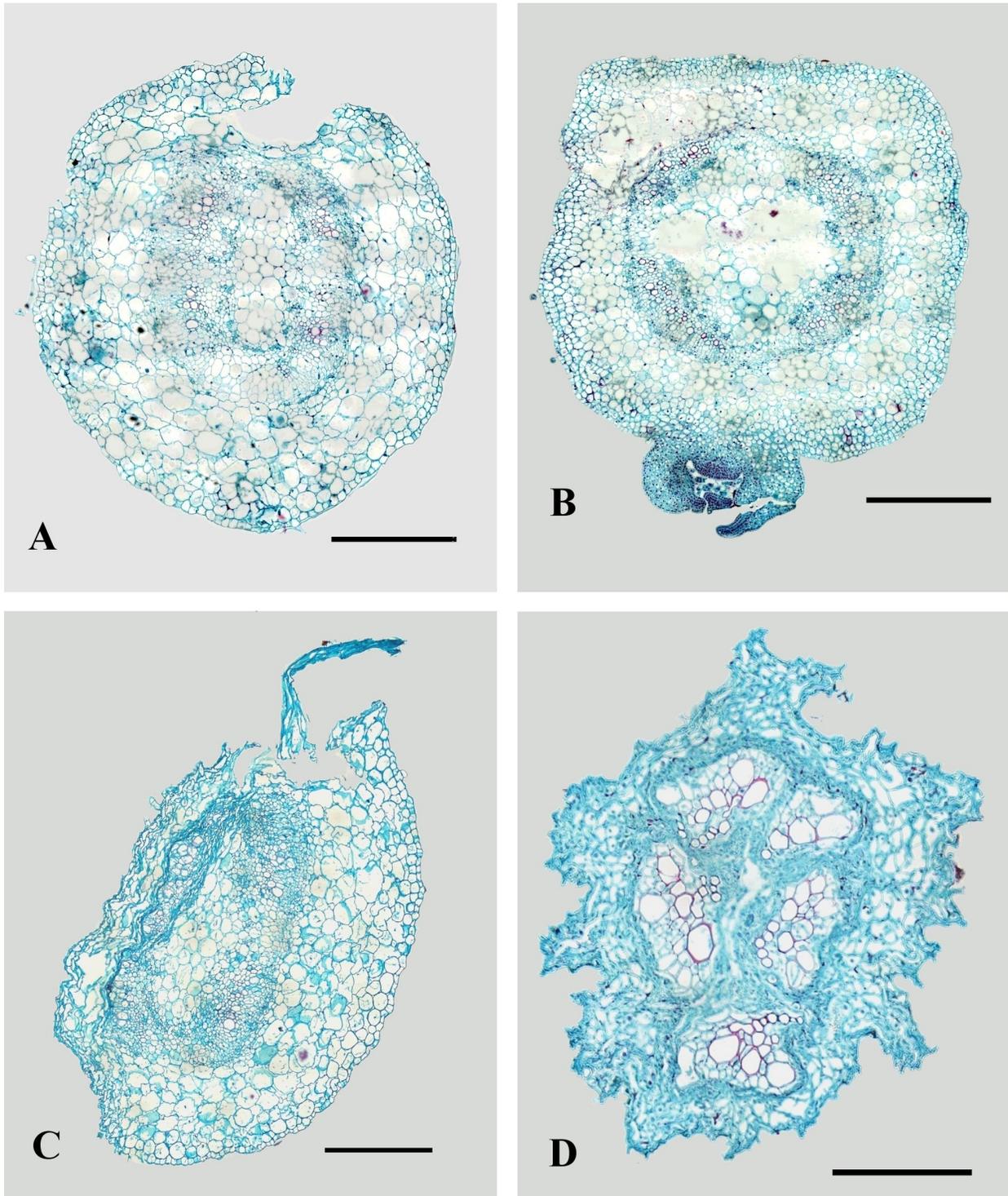


Figura 7. Corte transversal de tallo de plantas de Chile Yolo Wonder en planta testigo (A) o inoculada con *P. capsici* (B-D). Plantas testigo solo con punción sin daño aparente (A). A las 12 horas posteriores a la inoculación (hpi) comienza la degradación de células de la corteza cercanas al sitio de la inoculación (B). La tercera parte del diámetro del tallo está colapsado a las 24 hpi (C). Para las 48 hpi todo el tallo está colapsado a excepción del xilema (D). Barra= 100 μ m.

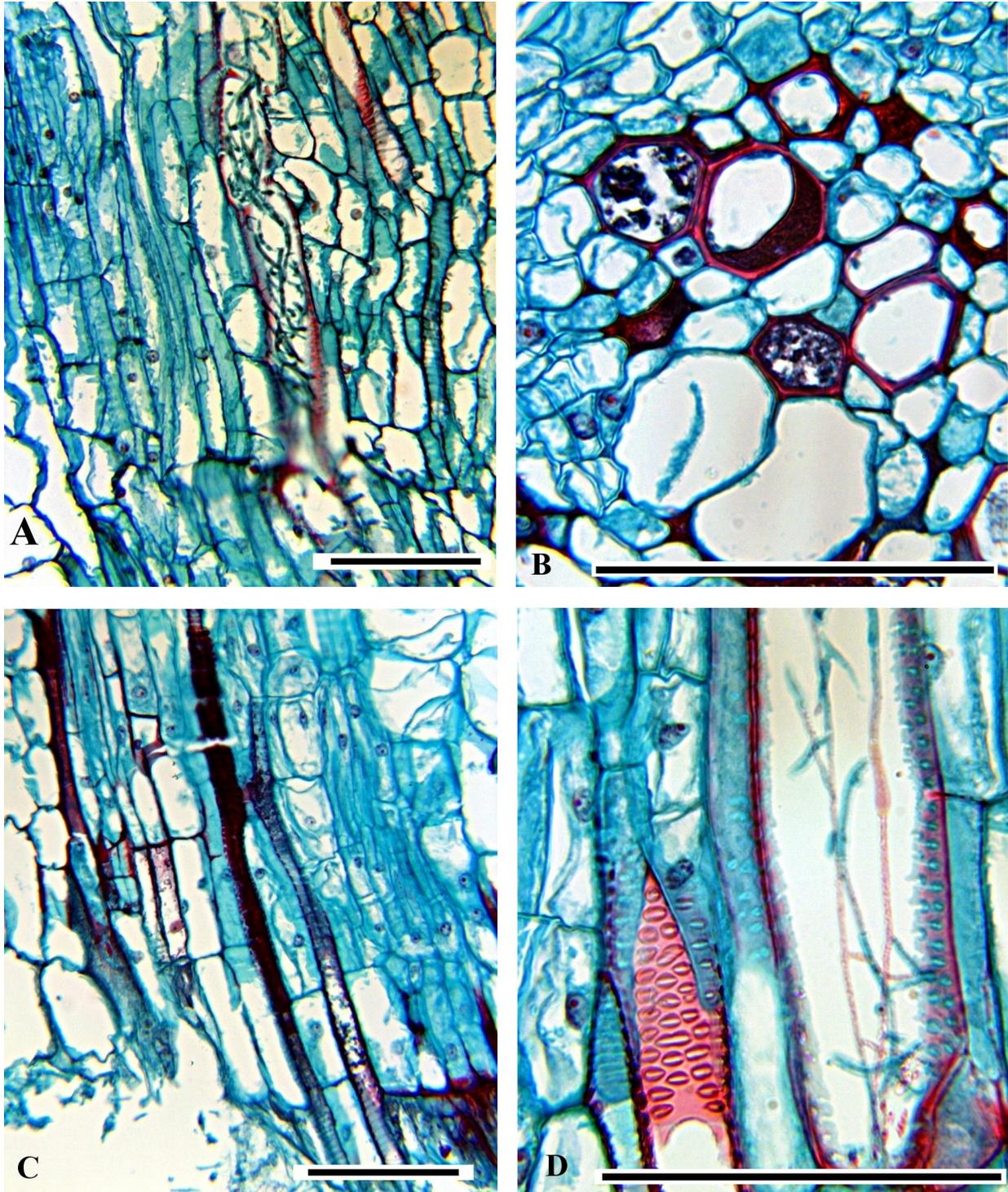


Figura 8. Cortes histológicos de tallos de chile CM334 inoculados con *P. capsici* o *F. oxysporum*. Hifas de *P. capsici* en el xilema a las 12 horas posteriores a las inoculación (hpi) (A). Acumulación de polifenoles en el xilema a las 120 y 96 hpi (B y C, respectivamente). Hifas de *F. oxysporum* en el xilema (D). Barra= 100 μ m.

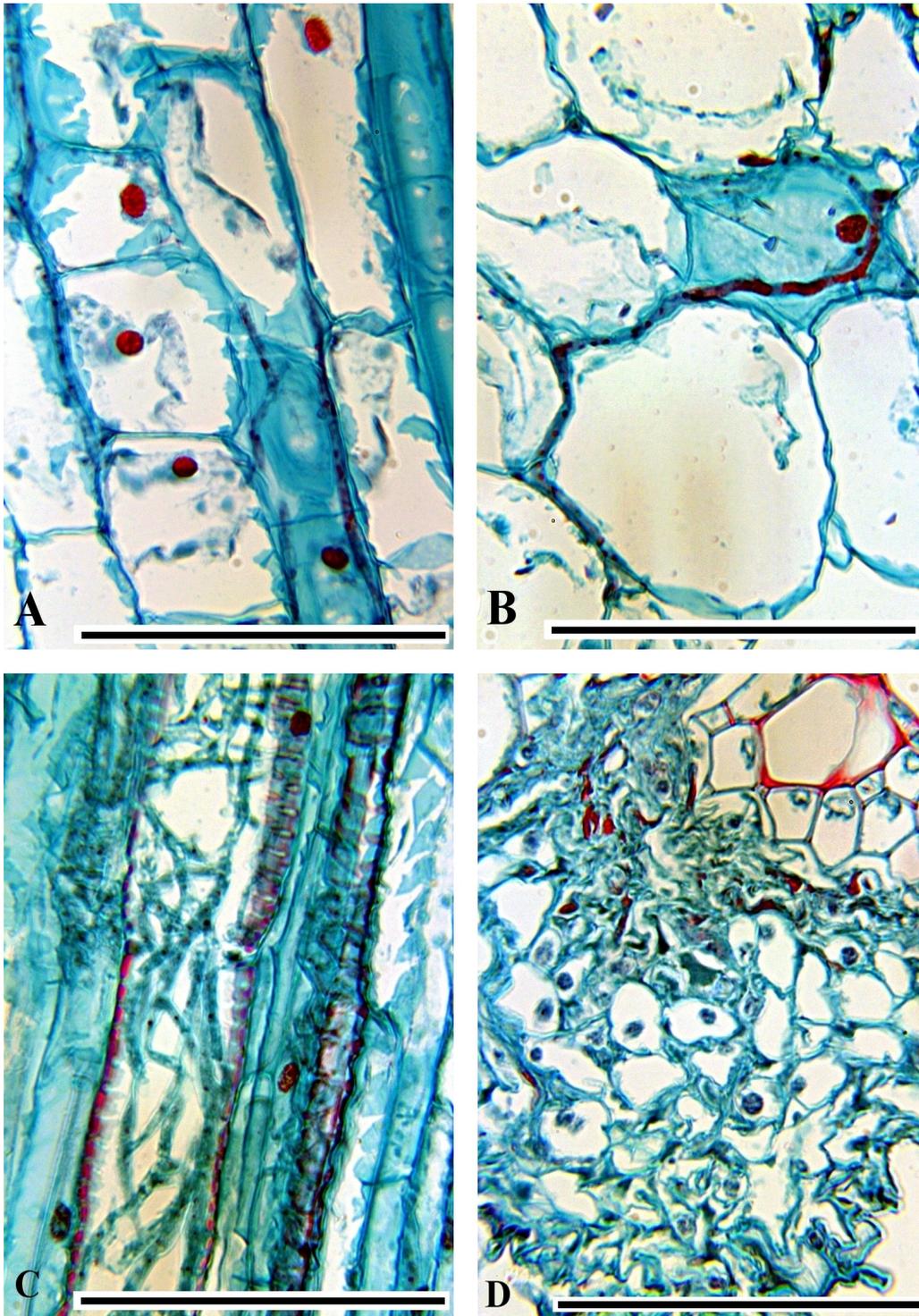


Figura 9. Cortes histológicos de tallos de chile Yolo Wonder inoculados con *P. capsici*. Hifas con crecimiento intercelular y núcleos rojos en células de la corteza a las 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) (A y B). Hifas en el xilema a las 24 hpi (C). Colapso de células de la corteza a las 48 hpi, las estructuras esféricas y verdes en el centro de las células (con menor grado de colapso) son las hifas del oomiceto. Barra= 100 μ m.

5. DISCUSIÓN

En la interacción incompatible CM334-*P. capsici* solamente se presentó la muerte de la parte apical del tallo de las plantas a los 5 días posteriores a la inoculación (dpi) y como consecuencia del estrangulamiento del tallo que ocurrió debido a la severa necrosis en el sitio de inoculación; la cual se presentó tan tempranamente como a las 24 h posteriores a la inoculación (hpi). En contraste, en la interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici* el necrosamiento se extendió a ambos lados del sitio de inoculación abarcando a todo el tallo en un lapso de 96 hpi y la muerte de la totalidad de la planta ocurrió a los 5 dpi. La menor severidad de la necrosis del tallo por el oomiceto en las plantas de CM334, se asoció con la detención del avance sistémico de *P. capsici*, como lo sugiere el hecho de que el oomiceto ya no se detectó después de los 2 cm de distancia del sitio de inoculación. En las plantas de Yolo Wonder en cambio todo el tallo fue colonizado. El confinamiento del micelio de *P. capsici* solamente en el área vecina al sitio de inoculación en las plantas CM334, confirma la resistencia de este genotipo al patógeno y evidencia que la necrosis observada pudo haber sido producto de una fuerte reacción de hipersensibilidad (RH). En la interacción compatible CM334-*F. oxysporum*, el patógeno se distribuyó sistémicamente a lo largo del tallo pues en todos los segmentos de tallo analizados se detectó la presencia del patógeno, confirmando la susceptibilidad de las plantas CM334 a este hongo.

Aunque en las tres interacciones evaluadas se presentaron síntomas de necrosamiento, hubo claras diferencias estructurales a nivel de tejidos. En las interacciones compatibles Yolo Wonder-*P. capsici* y CM334-*F. oxysporum* fue evidente la degradación de las paredes celulares desde el inicio de la infección, inicialmente se observó un adelgazamiento de las mismas y posteriormente su completa degradación. Se ha documentado que *P. capsici* produce enzimas que maceran a las paredes celulares de las células vegetales (Yoshikawa *et al.*, 1977), lo que pudo haber ocurrido en las plantas del cv Yolo Wonder, en las que sus mecanismos de defensa no se dispararon tan rápido y con la magnitud necesaria para defenderse del ataque del patógeno. En las células de los tallos de CM334, las paredes celulares no mostraron mayor degradación aunque si sufrieron colapso. También se tiene consignado que *F. oxysporum* produce celulasas y pectinasas (Mehta y Mehta, 1985).

La acumulación de polifenoles intra o intercelularmente se observó en todas las interacciones, incluso en los testigos, pero esta acumulación se presentó con diferente intensidad dependiendo de la interacción planta-patógeno. En los testigos los polifenoles fueron poco frecuentes y solamente se presentaron a las 120 h posteriores a la punción (hpp) en el sitio donde se llevó a cabo el daño mecánico. La acumulación de compuestos fenólicos comúnmente se dispara en respuesta al daño mecánico (Dixon y Paiva, 1995; Solecka, 1997). En las interacciones con *P. capsici* la acumulación de polifenoles se presentó intracelularmente en las células colapsadas y se depositaron formando estructuras esféricas de color rojo y textura lisa, en cambio en la interacción con *F. oxysporum* los polifenoles se depositaron intra e intercelularmente, en mayor cantidad y abarcando áreas más grandes en comparación con las otras interacciones. A pesar de la gran acumulación de compuestos fenólicos en la interacción CM334-*F. oxysporum* la colonización no se pudo evitar, debido quizás a que estos compuestos no fueron nocivos para este hongo. Por otro lado, en la interacción incompatible CM334-*P. capsici* la acumulación de estos compuestos fenólicos pudo haber contribuido a evitar la colonización por parte del oomiceto, ya que se ha reportado que los ácidos fenólicos solubles contenidos en tallos de variedades resistentes de chile están asociados con su resistencia a *P. capsici*; se ha demostrado en pruebas *in vitro* que inhiben el crecimiento del oomiceto (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavia y Liddell, 1997). En el cv. Smith-5 resistente a *P. capsici* el efecto inhibitor más pronunciado fue causado por el ácido t-cinnámico, seguido por los ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico y salicílico (Candela *et al.*, 1995). En otras solanáceas como la papa se ha reportado que en hojas de plantas resistentes y susceptibles inoculadas con *P. infestans* se acumularon dos clases de compuestos fenólicos, una correspondiente a los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y la otra clase a amidas hidroxicinámicas (Vidhyasekaran, 2008).

Varios investigadores han consignado que las hifas de *P. capsici* en raíces y tallos de chile y calabacita crecen principalmente de manera intercelular (Hwang *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Kim y Kim, 2009); lo cual coincide con lo que se observó bajo el microscopio de luz en la corteza y médula del tallo donde las hifas se encontraban con más frecuencia pegadas o paralelas a las paredes celulares, tal observación sugiere que el micelio invade intercelularmente; sin embargo, habrá que verificar estas observaciones con microscopía electrónica de transmisión en trabajos posteriores. Se ha

reportado que en plantas de Chile resistentes al oomiceto, las hifas llegan a colonizar principalmente a las células epidermales y esporádicamente a las corticales. Por ejemplo, Kim y Kim (2009) encontraron que 3 días después de haber inoculado los tallos de Chile CM334 las hifas sólo habían invadido a las células epidermales y algunas veces las corticales externas. También, Lee y colaboradores (2000) mencionan que a las 24 hpi en la interacción incompatible Chile cv Hanbyul-*P. capsici*, el patógeno colonizó principalmente los tejidos epidermal y cortical, pero raramente el vascular.

Hasta las 24 hdi de CM334 las hifas del oomiceto tuvieron una apariencia normal, se observaron turgentes y sus pequeños núcleos rojos fueron visibles, pero a las 48 hdi mostraron una apariencia de flacidez e incluso en algunas zonas se observaron degeneradas y para ese momento los núcleos fueron poco visibles. La evidente degeneración de las hifas puede haber sido ocasionada por el efecto negativo de las diversas respuestas de defensa de la planta (compuestos fenólicos y fitoalexinas como el capsidiol, entre otras) que inhibieron el desarrollo del oomiceto (Candela *et al.*, 1995; Egea *et al.*, 1996). Kim y Kim (2009) reportaron que las hifas de *P. capsici* en contacto con aposiciones de la pared celular de células de CM334 parecían estar degeneradas y con un citoplasma necrótico condensado; sugiriendo que tales alteraciones pudieron haber resultado por su exposición a condiciones desfavorables. Por otro lado, en Yolo Wonder donde se estableció una relación compatible con el oomiceto, hasta el último tiempo considerado para las observaciones microscópicas en el presente estudio (48 hdi), las hifas parecían estar sanas (turgentes y con núcleos visibles) y estuvieron presentes en mayor cantidad tanto en las células del parénquima como del xilema.

Las hifas de *F. oxysporum* en la interacción compatible con CM334 mostraron una apariencia sana desde el inicio de la infección hasta la última evaluación. Su crecimiento inter e intracelular fue similar al reportado durante la colonización de raíces por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en un cultivar susceptible de jitomate (Brammall y Higgins, 1988).

Los núcleos de las células en las plantas testigo de CM334 y Yolo Wonder mostraron una apariencia normal: con formas variadas, color gris claro y con presencia de gránulos generalmente pequeños y oscuros, y con un nucléolo pequeño de color anaranjado. En contraste, a las 24 hpi las células de la corteza de la interacción incompatible CM334-*P. capsici* presentaron un 30.9% de núcleos rojos:

esféricos u ovalados, condensados (contraídos), de apariencia granulosa y color rojo. Diversos investigadores han reportado que los núcleos de células bajo diferentes tipos de muerte celular programada (MCP) sufren una condensación o contracción y se tornan de coloración oscura (Levine *et al.*, 1996; Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998; de Jong *et al.*, 2000; Ameisen, 2002; Guimarães y Linden, 2004). En la interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici* también se observó la presencia de este tipo de núcleos en las células corticales, aunque en mucha menor proporción (14.3%); es posible que en esta interacción algunas células también hayan sucumbido por un proceso de MCP, sólo que al presentarse con menor frecuencia en comparación con el genotipo resistente CM334, no se evitó la colonización por el oomiceto. Sin embargo, la posibilidad de que se trate de dos tipos de núcleos rojos con características ultraestructurales diferentes no puede descartarse; de ahí que es necesario verificar con la técnica de microscopía electrónica de transmisión, si la ultraestructura de los núcleos rojos de la interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici* es similar o no a la de la incompatible CM334-*P. capsici*.

En la otra interacción compatible CM334-*F. oxysporum* el 70.8% de los núcleos fueron del tipo globoso: grandes y esféricos, de color gris claro, con pocos gránulos oscuros y con un nucléolo grande y de color anaranjado brillante. Algunas de estas características coinciden con aquellas reportadas en dos investigaciones de interacciones planta-patógeno compatibles. En la interacción compatible soya-*P. sojae* los núcleos de las células necróticas no fueron deformados y contenían cromatina menos densa que los núcleos de células con muerte celular tipo apoptótico (Kosslak, 1997). En una interacción compatible *P. capsici* con frutos de chile dulce (*Capsicum frutescens*) a partir de las 4 hpi se empezó a observar que los núcleos de células cercanas a las invadidas por *P. capsici*, mostraron contornos invaginados, profundos e irregulares y un nucléolo grande y prominente (Jones *et al.*, 1974). Además, estos autores comentan que el núcleo parece ser el primer organelo que reacciona a los estímulos y que los cambios sufridos pueden presumiblemente indicar una actividad metabólica nuclear alta.

Las diferencias en la estructura celular, a nivel de microscopía de luz, observadas entre las interacciones compatibles y la incompatible, sugieren que en las primeras la muerte celular fue producto de la actividad, a nivel de pared celular, de los metabolitos secretados por el patógeno; en cambio la muerte celular en la interacción CM334-*P. capsici* se debió muy probablemente a una muerte celular programada que inhibió el avance del oomiceto a lo largo del tallo de la planta.

6. LITERATURA CITADA

- Alcázar, M. D., Egea, C., Espín, A. and Candela, M. E. 1995. Peroxidase isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 94: 736-742.
- Ameisen, J. C. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death and Differentiation* 9: 367-393.
- Arnoult, D., Tatischeff, I., Estaquier, J., Girard, M., Sureau, F., Tissier, J. P., Grodet, A., Dellinger, M., Traincard, F., Kahn, A., Ameisen, J. and Petit, P. X. 2001. On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death. *Molecular Biology of the Cell* 12: 3016-3030.
- Baehrecke, E.H. 2003. Autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 10: 940-945.
- Beers, E. P., Woffenden, B. J. and Zhao, C. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology* 44: 399-415.
- Belenghi, B., Salomon, M. and Levine, A. 2004. Caspase-like activity in the seedlings of *Pisum sativum* eliminates weaker shoots during early vegetative development by induction of cell death. *Journal of Experimental Botany* 55: 889-897.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A., Caromel, B., Palloix, A. and Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 115: 253-264.
- Brammall, R. A and Higgins, V. J. 1988. A histological comparison of fungal colonization in tomato seedlings susceptible or resistant to *Fusarium* crown and root rot disease. *Canadian Journal of Botany* 66: 915-925.
- Candela, M. E., Alcázar, M. D., Espín, A., Egea, C. and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. and Richberg M. H. 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8: 1793-1807.
- de Jong, A. J., Hoeberichts, F. A., Yakimova, E. T., Maximova, E. and Woltering, E. J. 2000. Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211:

656-662.

- del Pozo, O. and Lam, E. 1998. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Current Biology* 8: 1129-1132.
- del Pozo, O. and Lam, E. 2003. Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises *N* gene-mediated disease resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 485-494.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Egea, C., Alcázar, M. D. and Candela, M. E. 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98: 737-742.
- Egea, C., Ahmend, A. S., Candela, M. and Candela, M. E. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 158: 151-158.
- Fernández-Pavia, S. and Liddell, C. M. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87: 529.
- Fesik, S. W. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103: 273-282.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Ukness, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- García-Pérez, M. D., Egea, C. and Candela, M. E. 1998. Defence response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 103: 527-533.
- Gilchrist, D. G. 1998. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology* 36: 393-414.
- Goodman, R.N., and Novacky, A.J. 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: a Resistance Phenomenon*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN., USA. 224 p.
- Grant, M. and Mansfield, J. 1999. Early events in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 312-319.
- Greenberg, J. T. 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings National Academic Science USA* 93: 12094-12097.
- Greenberg, J. T. 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545.

- Greenberg, J. T. 2005. Degrade or die: a dual function for autophagy in the plant immune response. *Developmental Cell* 8: 799-801.
- Greenberg, J. T. and Yao, N. 2004. The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* 6: 201-211.
- Groover, A. and Jones, A. M. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119: 375-384.
- Guimarães, C. A. and Linden, R. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* 271: 1638-1650.
- Hammond-Kosack, K. E. and Jones, J. D. G. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- He, S. Y. 1996. Elicitation of hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiology* 112: 865- 869.
- He, S. Y., Bauer, D. W., Collmer, A. and Beer, S. V. 1994. Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 289-292.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.
- Heath, M. C., Nimchuk, Z. L. and Xu, H. 1997. Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus. *New Phytologist* 135: 689-700.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Hwang, B. K., Kim, W. B. and Kim, W. K. 1989. Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora capsici* in roots and stems of *Capsicum annuum*. *Journal of Phytopathology* 127: 305-315.
- Iakinova, E. T., Michalczuk, L. and Woltering, E. J. 2005. Hypersensitive cell death in plants – its mechanisms and role in plant defense against pathogens. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 13: 135-158.
- Jiménez, C., Capasso, J. M., Edelstein, C. L., Rivard, C. J., Lucia, S., Breusegem, S., Berl, T. and Segovia, M. 2009. Different ways to die: cell death modes of the unicellular chlorophyte *Dunaliella viridis* exposed to various environmental stresses are mediated by the caspase-like activity DEVDase. *Journal of Experimental Botany* 60: 815-828.
- Jones, D. R., Graham, W. G. and Ward, E. W. B. 1974. Ultrastructural changes in pepper cells in a compatible interaction with *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 64: 1084-1090.

- Khurana, S.M.P., Pandey, S.K., Sarkar, D.A., and Chanemougasoundharam, A. 2005. Apoptosis in plant disease response: a close encounter of the pathogen kind. *Current Science* 88: 740-752.
- Kim, Y. J. and Hwang, B. K. 1994. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 195-209.
- Kim, K. H., Yoon, J. B., Park, H. G., Park, E. W. and Kim, Y. H. 2004. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathology* 94: 1295-1304.
- Kim, S. G. and Kim, Y. H. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *The Plant Pathology Journal* 25: 113-120.
- Klement, Z. and Goodman, R. N. 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 5: 17-44.
- Klionsky, D. J. and Emr, S. D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721.
- Lee, Y. K., Hong, J. K., Hippe-Sanwald, S. and Hwang B. K. 2000. Histological and ultrastructural comparisons of compatible, incompatible and DL- β -amino-*n*-butyric acid-induced resistance responses of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 269-280.
- Lee, B. K., Hong, J. K. and Hwang, B. K. 2001. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of pumpkin stems infected with *Phytophthora capsici*. *The Plant Pathology Journal* 17: 29-35.
- Levine, A., Pennell, R. I., Alvarez, M. E., Palmer, R. and Lamb, C. 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology* 6: 427-437.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B. and Dinesh-Kumar, S. P. 2005. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* 121: 567-577.
- López, C. M. L., Márquez, G. J. y Murguía, S. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas. 2a Edición. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Lummerzheim, M., de Oliveira, D., Castresana, C., Miguens, F. C., Louzada, E., Roby, D., van Montagu, M. and Timmerman, B. 1993. Identification of compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and characterization of the hypersensitive response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 532-544.
- Mendoza, Z. C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo.

México. 85 p.

Mendoza, Z. C. 1999. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. p. 25-63. En: Anaya, R. S. y Romero, N. J. (eds). Hortalizas, plagas y enfermedades. Editorial Trillas. México.

Mehta, A. and Mehta, P. 1985. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* under different cultivations conditions. *Folia Microbiologica* 30: 42-50.

Morel, J. and Dangl, J. L. 1997. The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* 4: 671-683.

Nuez, F., Gil-Ortega, R. y Costa, J. 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajies. Mundi Prensa. Madrid, España. 603 p.

Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J. 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* 183: 555-563.

Ryerson, D. E., and Heath, M. C. 1996. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell* 8: 393-402.

SAGARPA. 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) www.siap.sagarpa.gob.mx consultada el 14 de septiembre 2010.

Sanmartín, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N.V., and Rojo, E. 2005. Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiology* 137: 841-847.

Schweichel, J.U., and Merkel, H.J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissue. *Teratology* 7: 253-266.

Solecka, D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 257-268.

Sy, O., Bosland, P. W. and Steiner, R. 2005. Inheritance of *Phytophthora* stem blight resistance as compared to *Phytophthora* root rot and *Phytophthora* foliar blight resistance in *Capsicum annuum* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130: 75-78.

Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas, R. y Lara, J. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* 35: 37-44.

van Doorn, W. G. and Woltering, E. J. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *TRENDS in Plant Science* 10: 117-122.

- Vargas, E. M., Zavaleta-Mejía, E. y Hernández, A. A. M. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26: 159-166.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Second Edition. CRC Press. Florida, USA. 509 p.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. and Gilchrist, D. G. 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* 8: 375-391.
- Woltering, E. J., van der Bent, A. and Hoeberichts, F. A. 2002. Do plant caspases exist? *Plant Physiology* 130: 1764-1769.
- Whyte, M. 1996. ICE/CED-3 proteases in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 6: 245-248.
- Xu, H. and Heath, M. C. 1998. Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *The Plant Cell* 10: 585- 597.
- Yoshikawa, M., Tsukadaira, T., Masago, H. and Minoura, S. 1977. A non-pectolytic protein from *Phytophthora capsici* that macerates plant tissue. *Physiological Plant Pathology* 11:61-70.