



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**Estudio de la expresión de genes
metilasas/desmetilasas de histonas y efectores de
Phytophthora capsici durante el proceso infectivo**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A:

MÓNICA BERENICE RODRÍGUEZ RENDÓN

TUTORES:

Dr. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUÍN

Dr. FERNANDO URIEL ROJAS ROJAS





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi familia, por siempre apoyarme

Agradecimientos

Es importante para mí mencionar a las personas que me acompañaron en este camino y a la institución que me abrió las puertas, la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León.

Quiero agradecer al Dr. Julio Vega, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de seguir aprendiendo. Al Dr. Fernando Rojas, que durante este año me brindó sus conocimientos, y sobre todo paciencia, convirtiéndose en un mentor para mí, y en una persona a la cual admiro.

A todos los profesores de la licenciatura en Ciencias Agrogenómicas, en especial a la Dra. Harumi, por siempre buscar nuestro bienestar.

A mis amigos del laboratorio, su apoyo y ánimos nunca permitieron que me sintiera sola.

Quiero agradecer a mis padres, no tengo las palabras suficientes para reconocer todo lo que me han brindado. Ustedes son una inspiración para mí, y no podría estar más orgullosa de ser su hija. Me han inculcado que la educación es la herencia más importante que puedo tener, y el que hayan estado todos estos años acompañándome, es un regalo invaluable.

A Dani, mi hermana, que me ha mostrado una manera diferente de ver el mundo, y que no debo rendirme ante ninguna dificultad.

A mis compañeras canelitas, que fueron un pilar emocional.

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo financiero de PAPIIT-UNAM: IG200921 y CONACYT-Ciencia Básica: A1-S-34759.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	20
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. HIPÓTESIS	23
5. JUSTIFICACIÓN	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1. Material vegetal	24
6.2. Experimentos de infección de plantas con <i>P. capsici</i> D3	24
6.3. Cuantificación de área de infección	24
6.4. Reaislamiento de <i>P. capsici</i> D3	25
6.5. Infección con zoosporas de <i>P. capsici</i> D3	25
6.6. Ensayo de muerte celular	25
6.7. Ensayo de acumulación de especies reactivas de oxígeno	26
6.8. Extracción de DNA genómico (gDNA)	26
6.9. Análisis de muestras de DNA	27
6.10. Estandarización de las condiciones para la amplificación de genes metilasa/desmetilasa de <i>P. capsici</i> D3	27
6.11. Extracción de RNA	29
6.12. Análisis de muestras de RNA	32
6.13. PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) de genes lisina metilasa y lisina desmetilasa y efectores de <i>P. capsici</i> D3	32
7. RESULTADOS	34
7.1. Infección de <i>P. capsici</i> D3 en <i>C. pepo</i> y <i>N. benthamiana</i>	34
7.2. Diferencias en la acumulación de ROS en <i>N. benthamiana</i> y <i>C. pepo</i>	36
7.3. Efecto de la interacción con <i>C. pepo</i> y <i>N. benthamiana</i> sobre la morfología de <i>P. capsici</i> D3	38
7.4. Ensayos de PCR y estandarización de genes codificantes de metilasas / desmetilasas de histonas de <i>P. capsici</i> D3	39
7.5. Extracción de RNA	40

7.6. Perfil de expresión de genes codificantes de metilasa / desmetilasa durante la infección de <i>P. capsici</i> D3	43
7.7. Perfil de expresión de genes codificantes de efectores <i>Avr</i> de <i>P. capsici</i> D3 durante la infección en diferentes plantas hospederas	45
8. DISCUSIÓN	48
9. CONCLUSIONES	53
10. ANEXOS	54
11. REFERENCIAS	56

RESUMEN

Phytophthora capsici es un patógeno oomiceto que afecta a una gran variedad de cultivos de interés agrícola. A pesar de ser uno de los patógenos vegetales más estudiados, se desconoce a fondo los mecanismos moleculares de su virulencia. Recientemente, se ha sugerido que las marcas epigenéticas, como la metilación de histonas, regulan la expresión de genes que facilitan la diseminación de los patógenos vegetales. Este mecanismo permite una respuesta de regulación reversible debido a la acción de enzimas metilasas (HMT) y desmetilasas (HDM), por lo que cambios en la expresión en estas proteínas pueden alterar varios procesos celulares, como la virulencia de patógenos. En este trabajo, analizamos la interacción planta-patógeno de la infección de *P. capsici* en *Nicotiana benthamiana* y *Cucurbita pepo*. Seleccionamos los genes metilasa (SET SMYD3) y desmetilasa (JmjC 6021) relacionados con la marca de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y analizamos cambios en su expresión relativa mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR). El gen metilasa (SET SMYD3) mostro un aumento en la expresión relativa durante la fase final de necrotrofia (72 h después de la inoculación [hpi]) en *N. benthamiana*. Por otro lado, el gen JmjC 6021 mostró una represión génica a las 24 hpi, un aumento en el inicio de la etapa de necrotrofia (48 hpi), y de nuevo una represión a las 72 hpi en *N. benthamiana* y *C. pepo*. También analizamos la expresión relativa de los genes efectores *Avr1a*, *Avr1b* y *Av3a1*, relacionados con la virulencia de *P. capsici*, durante la etapa de transición de la fase de biotrofia a necrotrofia durante la infección en *Nicotiana benthamiana* y *Cucurbita pepo*. Este trabajo es una introducción al estudio de la regulación de genes efectores de *P. capsici* mediante la metilación de histonas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interacción planta – patógeno

Las plantas son el nicho de nutrientes de una gran diversidad de microorganismos incluyendo, bacterias, hongos, oomicetos, nematodos y virus. Los miembros de estas comunidades microbianas pueden tener un efecto neutral, formar una interacción benéfica y/o patógena con las plantas. Entre los microorganismos benéficos más estudiados se encuentran las bacterias y los hongos, que contribuyen en la promoción del crecimiento de la planta al aumentar la disponibilidad de nutrientes del suelo y resistencia a los patógenos vegetales o plagas; y conferir mayor tolerancia al estrés ambiental (Peiffer *et al.*, 2013; Trivedi *et al.*, 2021). Los microorganismos patógenos de plantas, como los hongos, oomicetos, bacterias y nematodos, pueden establecer una infección al ser transmitidos por el suelo y afectar el crecimiento de la planta. Estos microorganismos entran al interior de la planta de forma directa, traspasando la hoja y/o la raíz mediante estructuras de virulencia; o de manera indirecta mediante aberturas naturales como los estomas o heridas generadas por procesos mecánicos. Cuando los patógenos vegetales pasan la capa cuticular cerosa de la pared celular de la planta hospedera, se despliega una serie de respuestas que inhiben el crecimiento de estos microorganismos (Chisholm *et al.*, 2006; Jones & Dangl., 2006; Raaijmakers *et al.*, 2009; Dodds & Rathjen., 2010).

1.1.1. Sistema inmune de las plantas

La respuesta de defensa de las plantas contra los microorganismos patógenos se conoce como inmunidad innata de las plantas, la cual se compone de dos mecanismos, la defensa activada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), conocida como inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI) y la inmunidad activada por efectores (ETI) (**Figura 1**). La primera línea de defensa en las plantas es activada por el reconocimiento de los PAMPs mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que suelen ser quinasas similares a receptores (RLK) y proteínas similares a receptores (RLP). En bacterias los principales PAMPs son la flagelina flg22, el factor de elongación EF-Tu, lipopolisacáridos y oligosacáridos; en hongos son la quitina y glucanos de la pared celular, y en oomicetos, la aminotransferasa y el β -glucano (Jones & Dangl., 2006; Zhang & Zhou., 2010; Jwa & Hwang., 2017). La respuesta PTI limita el crecimiento de patógenos al desencadenar una resistencia basal que incluye la producción de especies reactivas de

oxígeno (ROS), aumento de Ca^{2+} en la membrana plasmática, cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), regulación de las proteínas quinasas dependientes de calcio (CPKs) y expresión de genes de defensa y regulación de fitohormonas como el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Lee *et al.*, 2020; Naveed *et al.*, 2020).

Los patógenos vegetales pueden evadir la respuesta de PTI al secretar proteínas efectoras que promueven la susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS). Los efectores son proteínas y moléculas que alteran la estructura y función celular de la planta hospedera promoviendo la colonización del patógeno (Hogenhout *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2022). Durante la segunda respuesta de defensa de la planta conocida como inmunidad desencadenada por efectores (ETI), las plantas pueden detectar de manera directa o indirecta a los efectores (denominados factores de avirulencia, *Avr*) mediante genes de resistencia (*R*). Los genes *R* más conocidos son los que codifican para receptores intracelulares denominados proteínas de repeticiones ricas en leucina del sitio de unión a nucleótidos (NBS-LRR). La ETI produce una respuesta de defensa más robusta y rápida, que induce una muerte celular (respuesta hipersensible, HR) (Jones & Dangl., 2006; Dodds & Rathjen., 2010; Jwa & Hwang., 2017).

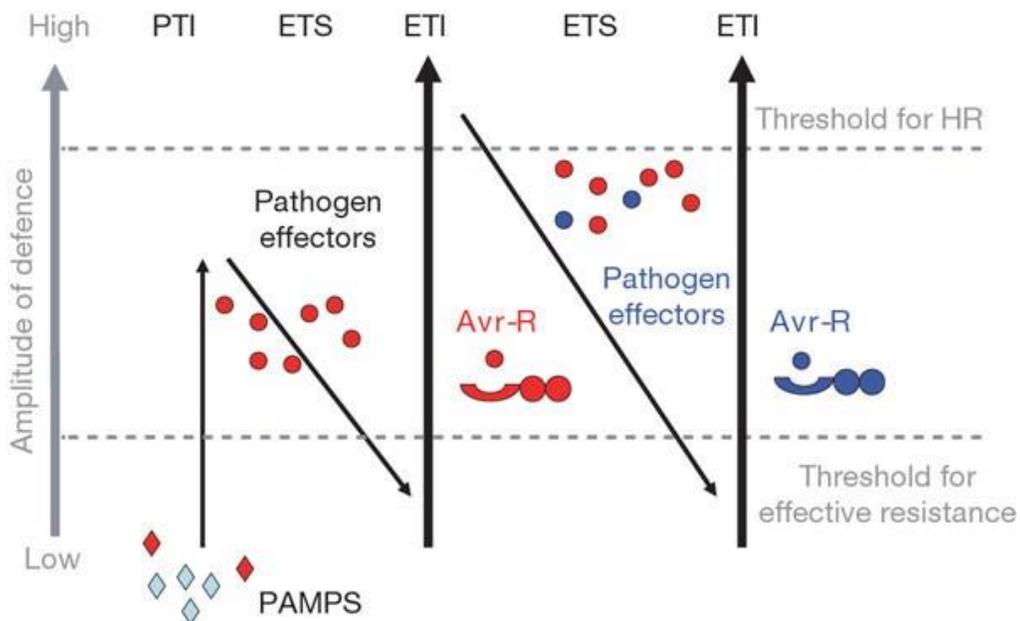


Figura 1. Modelo de interacción planta – patógeno. Los patógenos secretan proteínas efectoras que evaden la inmunidad PTI, sin embargo, la planta puede detectar los efectores *Avr* mediante la inmunidad ETI (Jones & Dangl., 2006).

1.2. *Phytophthora*

El género *Phytophthora* pertenece a la clase de los oomicetos y contiene diferentes especies patógenas de plantas (Jiang & Tyler., 2012). Los oomicetos son microorganismos eucariotas que muestran características morfológicas y fisiológicas similares a los hongos filamentosos, como el crecimiento de hifas y la presencia de apresorios y haustorios, nutrición por ósmosis y dispersión de esporas por medio de viento o lluvia (Birch *et al.*, 2006; Thines & Kamoun., 2010). Sin embargo, los oomicetos se encuentran dentro del reino Stramenopila, en conjunto con las algas diatomeas y pardas, siendo separados filogenéticamente de los hongos (Birch *et al.*, 2006; Cavalier-Smith & Chao, 2006; Beakes *et al.*, 2012). Otras características que distinguen a los oomicetos de los hongos incluyen (1) la formación de oosporas biflageladas e hifas cenocíticas (no septadas); (2) pared celular conformada en mayor parte por β -1,3-glucano, β 1,6-glucano y β -1,4-glucano (celulosa), a diferencia de los hongos cuyo componente principal es la quitina; (3) una síntesis de lisina a través de la vía del ácido α , 1-diaminopimérico y (4) membranas que contienen lípidos al no sintetizar esteroides como los hongos (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Birch *et al.*, 2006; Thines., 2018).

Los oomicetos se encuentran en ambientes terrestres; en tundras, selvas tropicales y desiertos, y marinos o en agua dulce, mostrando una distribución mundial. Esto representa una amenaza para la economía y la conservación ambiental, ya que una gran parte de las especies conocidas de oomicetos, como las que pertenecen al género de *Phytophthora*, son patógenos vegetales (Birch *et al.*, 2006; Thines & Kamoun, 2010; Jiang & Tyler, 2012; Thines., 2018). En los últimos años se han identificado más de 100 especies de *Phytophthora* que afectan cultivos agrícolas, ecosistemas ornamentales, forestales y naturales (Jiang & Tyler, 2012; Scott *et al.*, 2019). Entre las especies más estudiadas se encuentra *Phytophthora infestans*, agente causante del tizón tardío de la papa, que provocó La Gran Hambruna irlandesa en 1845; *Phytophthora sojae* que causa la pudrición de raíz y tallo de la soya, *Phytophthora ramorum* que ha causado la muerte del roble y otras especies forestales, y *Phytophthora capsici*, una de las especies más devastadoras que afecta a más a un gran número de plantas hospederas (Tyler., 2007; Haas *et al.*, 2009; Grünwald *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012a; Yoshida *et al.* 2013).

1.3. *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici fue reportado por primera vez en 1922, cuando causó daños considerables en cultivos de Chile (*Capsicum annuum*) en Nuevo México, Estados Unidos (Leonian., 1922). Desde entonces se han reportado aislados en distintos lugares del mundo, incluido América del Norte y del Sur, Asia, África y Europa. Actualmente, se ha reportado que *P. capsici* muestra un amplio rango de plantas hospederas, afectando diversos cultivos de interés agrícola, principalmente a los de las familias *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae* y *Asteraceae*. Al ser una especie hemibiotrófica, inician la infección como organismos biotróficos causando poco daño a los tejidos del huésped, para luego cambiar a la etapa necrotrófica donde se observa una muerte celular. Debido a estas características *P. capsici* es considerado como uno de los 10 oomicetos patógenos vegetales que tienen mayor importancia científica y económica (Hausbeck & Lamour, 2004; Lamour *et al.*, 2012; Kamoun *et al.*, 2015).

1.3.1. Taxonomía de *Phytophthora capsici*:

Reino *Chromista*

Phylum *Oomycota*

Clase *Oomicetos*

Orden *Peronosporales*

Familia *Peronosporaceae*

Género *Phytophthora*

Especie *capsici*

1.3.2. Síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici*

Los síntomas que causa la infección de *P. capsici* incluyen el tizón del tallo, hoja y fruto, y pudrición de la raíz (**Figura 2**). La gravedad de la infección depende de la parte infectada en la planta hospedera, edad de la planta y condiciones ambientales en que se desarrolle la enfermedad. En plantas menos susceptibles puede producir solo un retraso del crecimiento, anillamiento o canchales, mientras que en otros cultivos como los de la familia *Cucurbitaceae* y *Solanaceae*, causa pudrición y marchitamiento en la raíz lo que puede provocar la muerte en plántulas en un periodo de 3-5 días (**Figura 2A**). Cuando la infección llega al fruto y causa pudrición, se forma una capa blanca de esporas de *P. capsici* en su superficie que

luego puede expandir la enfermedad (**Figura 2B**). Mientras que, en presencia de tizón foliar, las hojas muestran manchas oscuras y empapadas de agua, que se vuelven necróticas y cuando la infección avanza al tallo, las hojas pueden defoliarse (**Figura 2C**) (Hausbeck & Lamour., 2004; Lamour *et al.*, 2012a; Barchenger *et al.*, 2018).



Figura 2. Síntomas de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en varias plantas hospederas. (A) Calabaza con pudrición de raíz y corona. (B) Pepino con podredumbre de la fruta. (C) Hoja de planta de judías verdes con tizón foliar (Granke *et al.*, 2012).

1.3.3. Mecanismos de infección de *Phytophthora capsici*

Phytophthora capsici es una especie heterolítica, requiere dos tipos de apareamiento (A1 y A2) para formar oosporas (esporas sexuales). A partir de las oosporas se forman esporangios (zoosporangios), que germinan directamente (forman un tubo germinativo que permite la entrada del patógeno a las células de la planta), o liberan de 20 a 40 zoosporas nadadoras (células biflageladas que tienen una pared con β -glucano y celulosa) (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Lamour *et al.*, 2012a; Moreira-Morrillo *et al.*, 2022). *P. capsici* también muestra una fase asexual, en la cual las estructuras denominadas esporangióforos forman esporangios (ovoides y papilados) que posteriormente liberaran zoosporas (**Figura 3**). Las zoosporas se dirigen a la planta hospedera mediante geotropismo negativo y señales electroquimiotácticas, y al entrar en contacto con cualquier parte de la planta (hoja, raíz, y corona) se enquistan e inician un nuevo ciclo de infección. La supervivencia a largo plazo de las zoosporas en el suelo, permiten la su diseminación a las partes aéreas como la corona, follaje y fruto de la planta mediante salpicaduras de agua ocasionadas por lluvia o riego (Hausbeck & Lamour, 2004; Granke *et al.*, 2012).

Cuando *P. capsici* penetra las células epidérmicas o vasculares (floema, xilema) libera proteínas efectoras dentro de la planta hospedera lo que permite la expansión del patógeno, que cambia a un crecimiento necrotrófico, donde se alimentan de células vegetales muertas y provoca el colapso del tejido (Lamour *et al.*, 2012a; Jupe *et al.*, 2013; Moreira-Morrillo *et al.*, 2022). Los efectores de *Phytophthora* se clasifican en RxLR, con motivo N-terminal RxLR (Arg, cualquier aminoácido, Leu, Arg) y crinklers (CRN) con motivos LxFLAK (Kamoun., 2003; Bozkurt *et al.*, 2012; Naveed *et al.*, 2020).

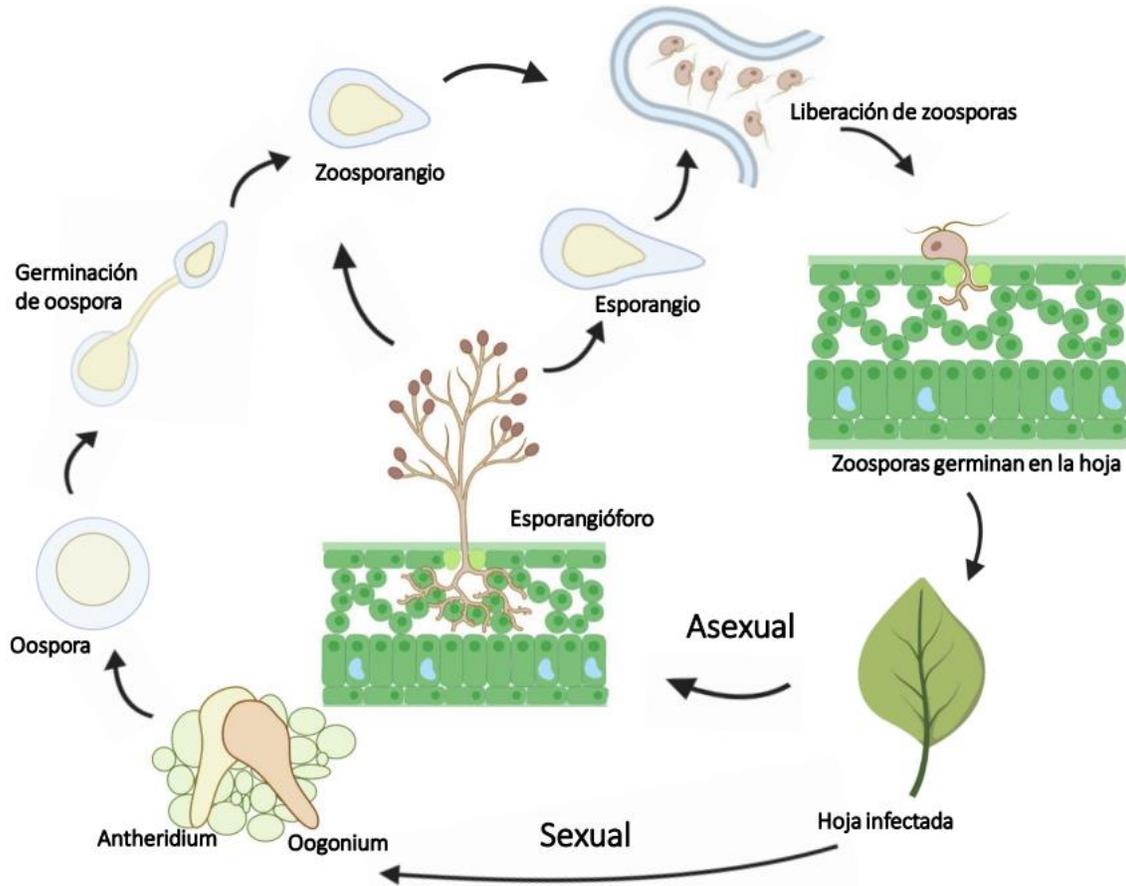


Figura 3. Ciclo de la enfermedad de *Phytophthora capsici*. A partir de las esporas se producen zoosporangios, que pueden germinar directamente o liberar zoosporas nadadoras. Una vez colonizada la planta hospedera *P. capsici* puede iniciar un nuevo ciclo de infección por reproducción sexual o asexual (Creado con Bio.Render.com).

1.3.4. Desafíos en el manejo de *Phytophthora capsici*

El patógeno *P. capsici* tiene un crecimiento y una esporulación rápida, siendo imposible de erradicar una vez que infecta a un cultivo. La estrategia de control más común para la infección de *P. capsici* es el uso de fungicidas. Sin embargo, la mayoría de los fungicidas

se dirigen a la biosíntesis de quitina y esteroides en las paredes celulares presente en los hongos por lo que no son eficaces contra este patógeno oomiceto, y el uso prolongado de otros fungicidas de fenilamida, como el metalaxil, han generado resistencia en *P. capsici* (Lamour & Hausbeck, 2000; Gobena *et al.*, 2012; Barchenger *et al.*, 2018). Otra de las alternativas para disminuir la presencia de *P. capsici* han mantener un control de riego adecuado y sembrar sobre suelos bien drenados, con el fin de evitar una acumulación de agua que favorezca la propagación del patógeno. A pesar de que se ha implementado la rotación de cultivos y, el uso del control biológico con agentes como *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp., o genes de resistencia en cultivos que tienen un alto valor comercial, la evolución relativamente rápida del patógeno puede volver ineficaz estos métodos (Anderson *et al.*, 2010; Dangl *et al.*, 2013; Moreira-Morrillo *et al.*, 2022).

Una de las principales áreas de estudio de patógenos vegetales como las especies de *Phytophthora*, es la coevolución de los efectores y genes R. Los estudios poblacionales muestran una alta variación genética en diversos aislados de *P. capsici* que se atribuyen como resultado de mutaciones y pérdida de heterocigosidad en áreas ricas en genes, lo que sugiere contribuye a un mecanismo relativamente rápido para fijar alelos (Jones & Dangl, 2006; Birch *et al.*, 2008; Lamour *et al.*, 2012b; Barchenger *et al.*, 2018). Sin embargo, la expresión génica en eucariotas también puede regularse mediante marcas epigenéticas, por lo que se han propuesto como posibles mecanismos que regulan los cambios en la expresión de proteínas relacionados con la virulencia de patógenos vegetales, permitiendo una mayor capacidad de adaptación a diferentes ambientes y plantas hospedadoras (Kasuga & Gijzen., 2013; Gijzen *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2015; Hattori & Ushijima, 2016).

1.4. Mecanismos epigenéticos

A pesar de que todas las células de un organismo comparten la misma información genética no todos los genes están activos en todo momento. En 1957, Conrad Waddington acuñó el término “paisaje epigenético” para describir los mecanismos moleculares que convertían la información genética en fenotipos observables durante el desarrollo embrionario. Aunque los mecanismos epigenéticos tienen un papel importante durante el desarrollo y la diferenciación celular, estas marcas ocurren en respuestas a diversos estímulos (Delcuve *et al.*, 2009; Portela & Esteller., 2010; Waddington., 2014). Actualmente, la definición de epigenética se refiere al estudio de mecanismos, que pueden ser potencialmente heredables, que controlan la expresión génica sin generar cambios en la secuencia de DNA.

Las modificaciones epigenéticas son agrupadas en: modificaciones covalentes de la cromatina (CCM), que incluye a la metilación del DNA y a las modificaciones postraduccionales de histonas (PTM); y el silenciamiento mediado por RNA (Delcuve *et al.*, 2009; Portela & Esteller., 2010; Ferrell., 2012; Gómez-Díaz *et al.*, 2012; Rojas-Rojas & Vega-Arreguín., 2021).

1.4.1. Modificaciones covalentes de la cromatina (CCM)

1.4.1.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA tiene un papel importante en los procesos biológicos de eucariotas y procariotas. La metilación más común en eucariotas es en la posición C5 de la citosina para formar 5-metilcitosina (5mC). En estos organismos la marca epigenética se puede heredar mitóticamente y está involucrada en la represión transcripcional. Mientras que en los organismos procariotas la metilación del DNA ocurre en la posición C6 de la adenina, formando N6-metiladenina (6mA) y en la posición N4 de la citosina, formando N4-metilcitosina (4mC) (**Figura 4**). La metilación del DNA es catalizada por DNA metilasas (DNMT) que añaden un grupo metilo de la S-adenil metionina (SAM) del DNA. La adición del grupo metilo en estas posiciones no interfiere con el apareamiento de bases, pero si pueden ser detectadas por proteínas que interactúan con el DNA (Portela & Esteller., 2010; Jones *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2013; Jurkowska & Jeltsch., 2016).

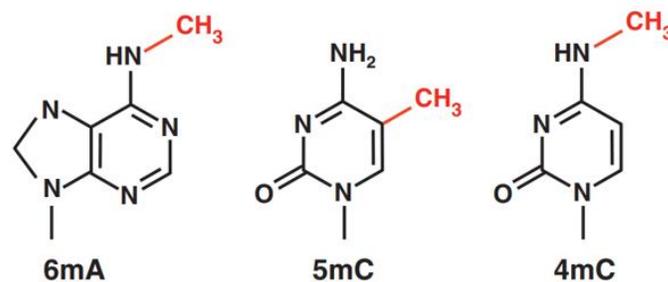


Figura 4. Estructuras químicas de bases modificadas por DNA metilasas (DNMT). La DNMT cataliza la transferencia de un grupo metilo (CH₃) desde la S-adenil metionina (SAM) a la posición de 6 carbonos de la adenina (6mA), 5 y 4 carbonos de la citosina (Davis *et al.*, 2013).

Se han reportado en el genoma de *P. infestans*, *P. parasitica*, *P. ramorum* y *P. sojae* diversos genes que codifican para DNA metilasas de 6mA (DAMT) funcionales, pero no para 5 mC que son las que predominan en los organismos eucariotas. En el mismo trabajo se encontró que los genes efectores RxLR tenían niveles significativos de 6mA, y muchas

de las metilaciones se localizaban en las regiones escasas en genes y ricas en repeticiones (GSR). Las marcas 6mA en *P. infestans* mostraron asociación a un tipo de apareamiento lo que sugiere tiene un papel durante el proceso de reproducción. Además, se demostró que 6mA es la principal metilación del DNA en estas especies de *Phytophthora* (Chen *et al.*, 2018; Tzelepis *et al.*, 2020).

1.4.1.2. Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM)

La unidad básica de la cromatina (estado en el que el DNA se encuentra empaquetado) son los nucleosomas que están formados por un octámero de cuatro histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) envuelto por 147 pb de DNA. Las histonas centrales contienen un dominio globular y un dominio de las colas N(C)-terminales, que sobresalen del nucleosoma y que no está estructurado (Martin & Zhang., 2005; Kouzarides., 2007; Portela & Esteller., 2010). Los residuos de las histonas pueden sufrir diversas modificaciones postraduccionales (PTM) como acetilación, fosforilación, metilación y sumoilación (**Figura 5**). Las modificaciones PTM tienen como resultado un reclutamiento de proteínas y complejos enzimáticos específicos, que van a alterar la estructura de la cromatina, y procesos nucleares como la transcripción y replicación. Por lo que la investigación de las PTM se enfoca en la identificación de proteínas que añaden y elimina las modificaciones, así como las que son específicas y se unen a las histonas (Liu *et al.*, 2005; Kouzarides, 2007; Bannister & Kouzarides., 2011; Rothbart & Strahl., 2014).

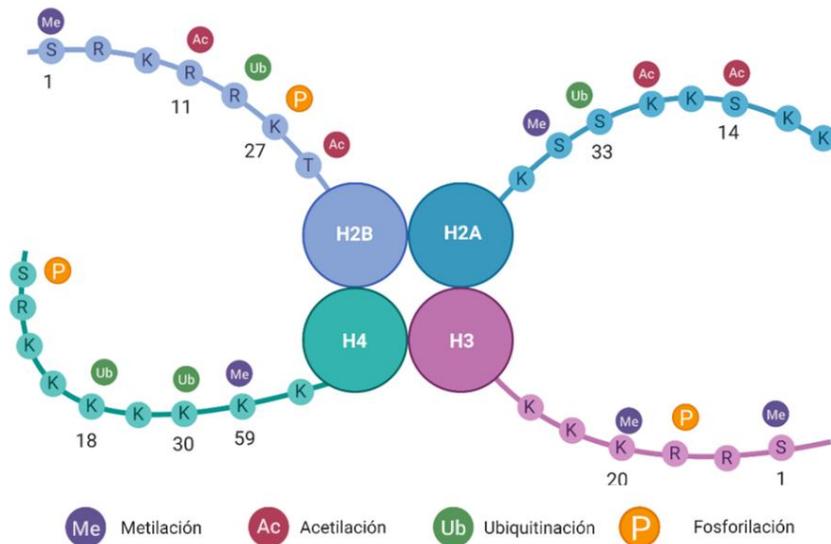


Figura 5. Modificaciones postraduccionales de las histonas (PTM). Se destacan las PTM (metilación [Me], acetilación [Ac], ubiquitinación [Ub] y fosforilación [P]) de las cuatro histonas (H3, H4, H2A y H2B) (Creado con BioRender.com).

1.4.1.3. Acetilación de histonas

Una de los mecanismos PTM más conocidos es la acetilación de histonas (HA) en residuos de lisina (K). La HA es regulada por las enzimas histonas acetiltransferasas (HATs) que catalizan la transferencia del grupo acetilo del acetil coenzima A (acetil CoA) al grupo ϵ -amino de residuos de K específicos en las colas N-terminales de las histonas, y la eliminación del grupo acetilo por enzimas histonas desacetilasas (HDAC) (**Figura 6**). La acetilación neutraliza la carga positiva de la K, lo que altera la estabilidad de la histona con carga positiva. Los residuos de K acetilados se unen al dominio proteico bromodominio (BRD) que reconocen las regiones acetiladas y que están presentes en reguladores transcripcionales. De manera general la acetilación de residuos de K está asociada con una transcripción activa al promover la unión de la RNA polimerasa. Mientras que la desacetilación conduce a la represión y el silenciamiento génico (Liu *et al.*, 2005; Kouzarides., 2007; Kim *et al.*, 2009; Bannister & Kouzarides., 2011; Janevska *et al.*, 2018).

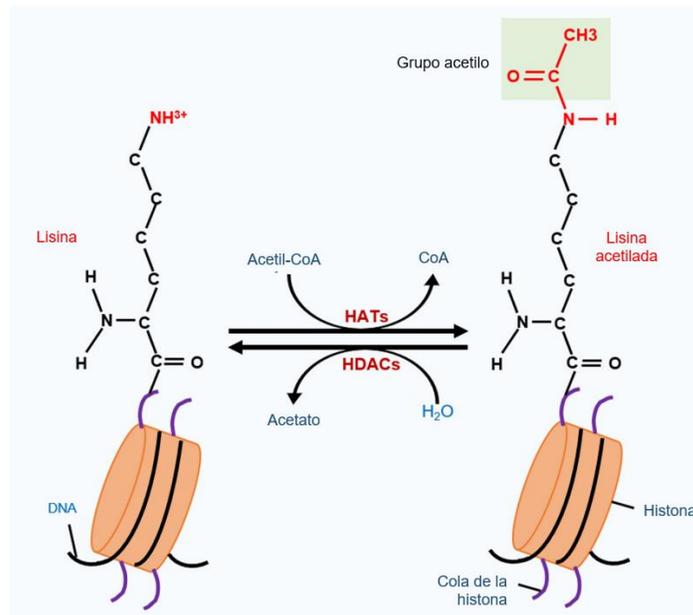


Figura 6. Regulación de la acetilación de histonas. Las HAT añaden el grupo acetilo al residuo de lisina de las proteínas histonas. Mientras las HDAC eliminan los grupos acetilo de la lisina acetilada formando acetato en el proceso (Kumar *et al.*, 2021).

Mediante el análisis de proteomas de especies del género *Phytophthora* se identificaron HATs en *P. infestans*, *P. capsici*, *P. ramorum*, *P. sojae*, *P. parasitica* y *P. cinnamomi*. La enzima HAT Gcn5 en *P. sojae* mostró diferentes niveles de expresión durante su ciclo de vida, así como en la reproducción sexual, y la respuesta al estrés oxidativo. Esto sugiere

que la acetilación en este patógeno interviene en la respuesta al estrés ambiental, así como en la virulencia del patógeno, al eliminar las respuestas de ROS de la respuesta inmune de la planta hospedera. En el mismo estudio se encontraron ortólogos de Gcn5 codificados en los genomas de *P. capsici*, *P. infestans* y *P. parasitica*, pero su papel aún no queda claro (Zhao *et al.*, 2015; Rojas-Rojas & Vega-Arreguin., 2020). En *P. infestans* las HATs putativas mostraron diferentes patrones de expresión en respuesta al medio ambiente, a diferentes plantas hospederas y en la reproducción sexual del patógeno, lo que indica su importancia en infección y en las etapas del ciclo de vida de *Phytophthora* (Wang *et al.*, 2016; Tzelepis *et al.*, 2020). Adicionalmente se ha reportado que el silenciamiento por la actividad de las enzimas desacetilasas de histonas (HDACs) afecta varios procesos biológicos, como la reproducción sexual al intervenir en los procesos de síntesis de hormonas que regulan los tipos de apareamiento A1 y A2 (Vetukuri *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020a).

1.4.1.4. Metilación de histonas

Los niveles de metilación de histonas son regulados por las histonas metilasas (HMTs) e histonas desmetilasas (HDMs), que agregan y eliminan grupos metilo de la S-adenil metionina (SAM), respectivamente, a los residuos de lisina (K) y arginina (R) en las colas N-terminales de las histonas (Guccione & Richard, 2019). La metilación de histonas no altera la carga positiva de los residuos, pero si afecta los procesos celulares al activar o reprimir la transcripción, al dirigir el reclutamiento de diferentes proteínas de unión a metilo (Liu *et al.*, 2005; Qian & Zhou, 2006). Los principales sitios de metilación de K ocurren en las histonas H3 y H4, donde se activa o reprime la expresión génica dependiendo de su posición: las marcas H3K4, H3K36 y H3K79 están asociadas con la expresión génica, mientras que la metilación en H3K9, H3K27 y H4K20 con el silenciamiento de genes (Martin & Zhang., 2005; Klose *et al.*, 2006). La adición del grupo metilo al residuo de K es catalizada por la lisina metilasa (KMT) que añade el grupo metilo al grupo N-amina de su cadena lateral y dependiendo del número de grupos metilo que se unan al residuo de lisina las cadenas laterales de lisina pueden estar mono (Kme1), di (Kme2) o trimetiladas (Kme3) (Bannister & Kouzarides., 2005; Nwasike *et al.*, 2016). Las KMT identificadas contienen dominios Su(var)3–9, Enhancer-of-zeste, Trithorax (SET), aunque también se ha reportado otra clase de KMT con la presencia del dominio Dot1. A diferencia de las acetiltransferasas, las KMT tienen mayor especificidad y modifican una sola K en una sola histona. La eliminación del grupo metilo en la K es catalizada por lisina desmetilasas (KMD) que se dividen en: PADI4 (Petidilarginina desiminasa 4), LSD1 (desmetilasa 1 específica de lisina) y proteínas que

contienen el dominio Jumonji C (JmjC) que difieren de LSD1 al poder eliminar los tres estados de metilación de la lisina mediante una reacción oxidativa que requiere Fe (II) y α -cetoglutarato (α KG) como cofactores (Bannister & Kouzarides, 2005; Klose *et al.*, 2006; Qian & Zhou, 2006; Freitag *et al.*, 2017).

Se ha reportado la presencia de marcas de metilación de K de histonas en diversos patógenos filamentosos; como el Ascomycete *Leptosphaeria maculans*, donde se encontró que la marca H3K9 reprime la expresión de varios efectores, en *Neurospora crassa* y otras especies de *Neurospora*, en las cuales se identificó una relación entre la pérdida de la marca H3K27me3 y la regulación positiva de más de 100 genes (Jamieson *et al.*, 2013; (Soyer *et al.*, 2014). En el genoma de *P. infestans* se identificaron KMT con dominios SET: Pihme1, Pihme2, Pihme3 y Pihme8, y se observaron diferentes niveles de la expresión durante su reproducción asexual (Iyer *et al.*, 2008; Vetukuri *et al.*, 2011). También se han caracterizado genes HDMs con dominios Tudor durante el tipo de apareamiento A en aislados de *P. infestans* en distintas zonas de Europa (Tzelepis *et al.*, 2020). La primera evidencia de que las marcas de metilación de histonas están relacionadas con la adaptación a las plantas hospederas y la virulencia en *Phytophthora* fue en *P. sojae*, donde se observaron niveles elevados de la marca de trimetilación de histona H3 lisina 27 (H3K27me3) en el locus del gen efector *Avr1b* en una cepa virulenta. La metilación en dicho locus en la cepa virulenta mostró el silenciamiento de *Avr1b*. Sin embargo, al desarrollar una mutante en un gen que codificaba para una subunidad de una enzima KMT, se observó que no se presentaba la marca H3K27me3 en el locus de *Avr1b* lo que promovió la expresión del gen y dicha mutante era avirulenta (**Figura 7**). Esto correlacionó la marca H3K27me3 como mecanismo que regula la expresión del gen efector *Avr1b* (Wang *et al.*, 2020b).

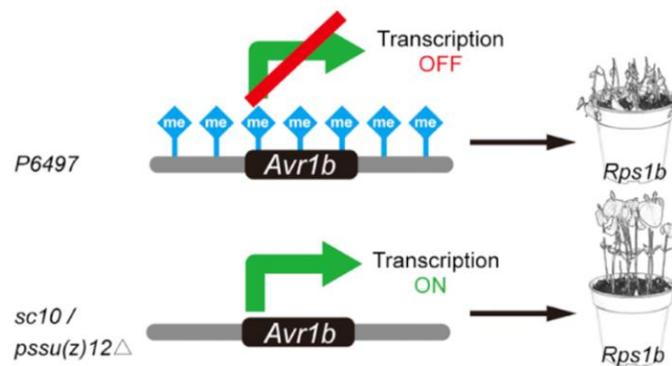


Figura 7. Modelo de silenciamiento de *Avr1b* por la metilación elevada de H3K27me3 en *P. sojae*. La interrupción de H3K27me3 permite la infección de las plantas resistentes *Rps1b* (Wang *et al.*, 2020b).

1.4.1.5. Metilación de H3K4 en patógenos vegetales

La marca de metilación en la histona H3 lisina 4 (H3K4) se encuentra enriquecida en distintas regiones de genes activos; H3K4me1 se muestra en regiones potenciadoras, H3K4me2 en el extremo 5' de los genes, y H3K4me3 en regiones promotoras, lo que ha relacionado a esta marca con una transcripción activa. La adición del grupo metilo es catalizada por KMT Set1, en conjunto con las subunidades que forman COMPASS (complejo de proteínas asociadas a Set1). Esta marca epigenética tiene un papel como sitio de unión para enzimas remodeladoras de la cromatina, como Chd1 y WDR5. Chd1, un componente de SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase), es un complejo de histona acetiltransferasa (HAT) que es un remodelador de cromatina dependiente de ATP. Mientras que WDR5, es un componente de un complejo de leucemia de linaje mixto (MLL) que se une preferentemente a H3K4me2, y es necesario para mantener los niveles globales de H3K4me3 (Bannister & Kouzarides, 2005; Liu *et al.*, 2005; Martin & Zhang., 2005; Schmidt *et al.*, 2011; Hyun *et al.*, 2017;).

La presencia de H3K4 se ha reportado en hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, donde KdmB, una desmetilasa de H3K4me3, es necesaria para la inducción normal del metabolismo secundario, en *Magnaporthe oryzae* aproximadamente el 5% de los genes mostraron cambios de acuerdo con la abundancia de H3K4me2 o -me3 durante infección, y la pérdida de una histona desmetilasa afectó su crecimiento invasivo, reproducción asexual y formación de apresorios (Pham *et al.*, 2015; Gacek-Matthews *et al.*, 2016). En cambio, en *Fusarium graminearum*, la metilasa H3K4 Set1 regula el crecimiento de las hifas, el metabolismo secundario, la virulencia y múltiples respuestas al estrés (Liu *et al.*, 2015). Estos datos indican que la marca H3K4 está involucrada en la regulación de varios procesos que contribuye a la patogenicidad en plantas de microorganismos eucariotas.

2. ANTECEDENTES

La población de aislados de *Phytophthora capsici* en el estado de Guanajuato muestra una gran variabilidad morfológica y fisiológica. La cepa *P. capsici* D3 fue aislada de plantas de chile poblano (*Capsicum annuum* var. *Annuum*) en el municipio de Dolores Hidalgo por el Centro de Investigación Regional del Centro-INIFAP. Esta cepa se describió como una de las más virulentas en Guanajuato, al presentar un grado de virulencia 4 con una muerte total de las plantas infectadas. Otra de las características de *P. capsici* D3 fue un crecimiento de micelio de tipo estrellado, compatibilidad de tipo A1, y una sensibilidad intermedia al fungicida mefenoxam. A pesar de que no se ha reportado resistencia a los fungicidas metalaxil y mefenoxam en los distintos aislados de *P. capsici* en Guanajuato, la presencia de los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) podría generar diversidad genética que dificultaría el control del patógeno y pondría en riesgo la producción de las diferentes variedades e híbridos de chiles en la región (Pons-Hernández *et al.*, 2020).

El mecanismo de evasión al reconocimiento del patógeno vegetal por la respuesta ETI, ocurre por una ganancia de virulencia debido a cambios de secuencia o pérdida de genes *Avr*. Algunas modificaciones en los genes *Avr* ocurren por mutaciones convencionales en elementos cis o trans, así como por la interrupción del marco de lectura abierto por pseudogenización. Los genomas de especies de *Phytophthora* han reportado sitios asociados a una evolución acelerada al tener una arquitectura bipartita con regiones escasas en genes y ricas en repeticiones (GSR). En estos compartimentos se ha reportado que se codifican los genes efectores de virulencia lo que sugiere un aumento en la diversidad genética. Los genes *Avr* de oomicetos al estar presentes en regiones genómicas dinámicas, como los telómeros, en ubicaciones heterocromáticas o en elementos transponibles (TE), facilitan modificaciones como la duplicación y recombinación que conduzcan a la variación genética. La eliminación de genes *Avr* en el genoma de los patógenos, y la retención de genes *Avr* en un solo individuo de la población justificaría la oportunidad de recuperarlo, sin embargo, se ha sugerido que la variación epialélica puede producir cambios reversibles dinámicos y regular la expresión de genes *Avr*, lo que explicaría la rápida adaptación a los diferentes ambientes y plantas hospederas (Kasuga & Gijzen., 2013; Ali *et al.*, 2014; Gijzen *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020). Previamente, en nuestro grupo de trabajo se analizaron los genes efectores *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* de *P. capsici* D3, y se observaron cambios en la expresión relativa de estos genes

efectores en la infección plantas de la familia *Cucurbitaceae* y *Solanaceae*. Por lo que decidimos analizar la expresión relativa de genes efectores *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* de *P. capsici* D3 durante la infección con *N. benthamiana* y *C. pepo*, ya que estas plantas hospederas han sido identificados como susceptibles a este patógeno oomiceto.

Recientemente, también en nuestro grupo de trabajo se identificó en el genoma de *P. capsici* genes que codifican para metilasas de histonas (HMTs) y desmetilasas (HDMs). Dentro de estos resultados destaca la presencia de solo 4 genes para HDMs en comparación el número de genes para HMTs (más de 60). Así mismo, las HMTs codificadas posiblemente son capaces de modificar distintos residuos tales como K4, K9, K27, K36 y K79 en la histona 3 y K 20 en la histona 4, mientras que solo se encontraron HDMs que pudieran tener efecto en los residuos K4 y K de la histona 3. En análisis transcriptómicos realizados previamente, los genes metilasa (SET SMYD3) y desmetilasa (JmjC 6021) de *P. capsici* D3 mostraron expresión diferencial durante la infección de chile (*Capsicum annuum*) y brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*). Por lo tanto, es de nuestro interés identificar si estas enzimas están relacionadas con la regulación de la virulencia de *P. capsici* y su capacidad de adaptarse e infectar a un amplio rango de hospederos. Así mismo, hemos estudiado la capacidad de la cepa *P. capsici* D3 de infectar diferentes plantas modelo y cultivos de importancia agrícola. Dentro de estos se encuentran *Cucurbita pepo* y *Nicotiana benthamiana*. La importancia de trabajar con *N. benthamiana* recae en que es una especie modelo, por lo que se tiene bien caracterizado su genoma y se ha reportado previamente como un hospedero de *P. capsici*. Mientras que *C. pepo* es considerado un cultivo de importancia agrícola que también es susceptible a este patógeno (Vega-Arreguín., *et al* 2014; Krasnow *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar la interacción de *P. capsici* con *N. benthamiana* y *C. pepo*, y los patrones de expresión de genes metilasa y desmetilasa relacionados con la marca H3K4me3 y, genes efectores.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el fenotipo de la infección de *P. capsici* D3 en *N. benthamiana* y *C. pepo*.
- Determinar los niveles de expresión relativa de genes que codifican para metilasas (SET SMYD3) y desmetilasas de histonas (JmjC 6021) relacionadas a la marca H3K4me3 durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*.
- Determinar los niveles de expresión relativa de los genes efectores (*Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a*) durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*.

4. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión relativa de genes que codifican metilasas y desmetilasas de histonas de H3K4me3, y genes efectores cambian durante las diferentes etapas del proceso de infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*.

5. JUSTIFICACIÓN

Phytophthora capsici es un patógeno vegetal que causa la pudrición de raíces y frutos, así como necrosis de tallo y tizón foliar (Haas *et al.*, 2009; Lamour *et al.*, 2012; Barchenger *et al.*, 2018). Se ha reportado que este patógeno puede afectar a un amplio rango de plantas hospederas como las pertenecientes a familias *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* y *Fabaceae*, entre otros cultivos de importancia agrícola, lo que representa una amenaza para la seguridad alimentaria (Hausbeck & Lamour, 200; Kamoun *et al.*, 2015). A pesar de la importancia agrícola de *P. capsici*, los estudios sobre la adaptabilidad a distintos cultivos, así como a diferentes condiciones ambientales, se ha centrado solo en especies como *P. infestans* y *P. sojae* (Wu *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020; Rojas-Rojas & Vega-Arreguín., 2021). Identificar los mecanismos de virulencia de *P. capsici*, en conjunto con la expresión de genes efectores, puede emplearse como base para posibles acciones de mitigación de este patógeno. Las marcas epigenéticas son consideradas como posibles mecanismos que regulan los cambios en la expresión de genes que codifican proteínas efectoras de patógenos de plantas (Gijzen & Shrestha, 2014), por lo que el presente trabajo pretende abordar la influencia de la expresión de genes relacionados con la marca H3K4me3 en la infección de *P. capsici* en los mecanismos de regulación en hospederos de distintas especies.

6. METODOLOGÍA

6.1. Material vegetal

Para el crecimiento de plántulas, se germinaron semillas de *C. pepo* y *N. benthamiana* en peat moss: vermiculita (3:1). Después de emerger se transfirieron a macetas en donde se mantuvieron en condiciones de invernadero hasta la edad adecuada para su uso. Los experimentos de infección se realizaron con hojas sanitizadas (rociadas con etanol al 70% y lavadas con agua desionizada estéril en tres repeticiones) de *C. pepo* y *N. benthamiana* de aproximadamente 1 y 2 meses de edad, respectivamente.

6.2. Experimentos de infección de plantas con *P. capsici* D3

El patógeno utilizado para la infección fue la cepa de *P. capsici* D3, donada por el INIFAP sede Celaya, Guanajuato (Pons-Hernández *et al.*, 2020). Para la obtención del micelio se creció de forma rutinaria *P. capsici* D3 en placas de agar V8 al 20% (v/v), en condiciones de oscuridad a 28 °C por 7 días. Las hojas de *C. pepo* y *N. benthamiana* previamente sanitizadas, se colocaron en cámaras de humedad estériles y se inocularon con un disco de 2 mm x 4 mm del agar V8 que contenía micelio de *P. capsici* D3.

Las cámaras de humedad se incubaron a 28 °C durante 72 h monitoreando los síntomas de infección cada 24 h después de la inoculación (hpi). Todos los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas independientes de cada tiempo incluyendo al menos 10 hojas en cada uno. Las hojas infectadas se colectaron en microtubos después de 72 h, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para análisis posteriores.

6.3. Cuantificación de área de infección

Para realizar la medición del área infectada en las hojas de *C. pepo* y *N. benthamiana* y caracterizar los síntomas de la infección, se observaron las lesiones en las hojas y se fotografiaron con luz natural y luz UV (365 nm) a las 24, 48 y 72 hpi. Mediante el software ImageJ se calculó el área de infección y se analizó por One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey con GraphPad Prism. Todos los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas independientes de cada tiempo incluyendo al menos 15 hojas en cada uno.

6.4. Reaislamiento de *P. capsici* D3

Para visualizar el efecto de la infección en *N. benthamiana* y *C. pepo* en la morfología de *P. capsici*, las hojas infectadas fueron sanitizadas (rociadas con etanol al 70% y lavadas con agua desionizada estéril en tres repeticiones) a las 72 hpi. Posteriormente, se cortó un pedazo del área de la lesión en la hoja, se inoculó en el centro de una caja de petri con agar V8 al 20% (v/v) que contenía ampicilina (100 mg/ml), rifampicina (50 mg/ml), kanamicina (100 mg/ml), espectinomicina (100 mg/ml) y benomilo (100 mg/ml) y se incubó a 28 °C por 7 días. Se realizaron mediciones del crecimiento radial de la colonia del patógeno cada 24 h y se tomaron fotografías de los aislados el día 7. Los resultados se analizaron con One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey con GraphPad Prism.

6.5. Infección con zoosporas de *P. capsici* D3

Para identificar la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular provocada por *P. capsici* D3 en hojas de ambos hospederos, se realizaron infecciones inoculando zoosporas. Para la obtención de las zoosporas del patógeno, cultivos de 7 días de crecimiento en agar V8 al 20% (v/v) se expusieron a fotoestrés con luz artificial durante 5 días para inducir formación de esporangios. Posteriormente, para la liberación de las zoosporas se agregaron 10 ml de agua fría estéril a los cultivos y se mantuvieron a 4°C durante 90 min. Después, las placas se colocaron por 30 min bajo flujo laminar y se recolectó el agua en tubos de 50 ml. La liberación de zoosporas se confirmó mediante análisis microscópico y el conteo se realizó con cámaras de Neubauer. Para los experimentos de infección, hojas de *C. pepo* y *N. benthamiana* se inocularon con un total de 100 zoosporas de *P. capsici* D3 en hojas sanitizadas (rociadas con etanol al 70% y lavadas tres veces con agua desionizada estéril) utilizando puntas de micropipeta estériles. Las hojas se colocaron en cámaras de humedad en condiciones de esterilidad y se incubaron en obscuridad a 28 °C durante 24 y 48 hpi, monitoreando los síntomas de infección cada 24 h.

6.6. Ensayo de muerte celular

La observación de las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* infectadas con zoosporas de *P. capsici* D3 se realizó mediante una tinción con azul de lactofenol. Se sumergieron hojas inoculadas con *P. capsici* D3 a las 24 y 48 hpi en una solución de azul de lactofenol (1 ml de alcohol etílico absoluto, 20 ml de azul de lactofenol) por 30 min. Posteriormente, las

muestras se sumergieron en una solución decolorante (100 ml de ácido acético y 300 ml de etanol) manteniéndose a 28 °C en agitación por 12 h. Después se transfirieron a una solución blanqueadora (80 ml de ácido acético, 80 ml de glicerol y 240 ml de etanol) donde permanecieron toda la noche, y al día siguiente se tomaron imágenes de las hojas. Todos los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas independientes de cada tiempo incluyendo al menos 4 hojas en cada uno.

6.7. Ensayo de acumulación de especies reactivas de oxígeno

La acumulación de especies de oxígeno reactivo (ROS) en hojas infectadas de *N. benthamiana* y *C. pepo* se detectó mediante un ensayo de tinción con 3,3'diaminobencidina (DAB). Las hojas inoculadas con *P. capsici* a las 24 y 48 hpi se sumergieron en una solución DAB (50 mg DAB, 45 ml de ddH₂O, 0.05 % Tween 20 y 2.5 ml de Na₂HPO₄ 20 mM, pH = 3) y se tiñeron a 27 °C por 8 h en oscuridad. Luego, las hojas se colocaron en una solución decolorante (100 ml de ácido acético y 300 ml de etanol) por 12 h con agitación a 27°C. Después, las hojas se transfirieron a una solución blanqueadora (80 ml de ácido acético, 80 ml de glicerol y 240 ml de etanol) y se tomaron fotografías de las hojas teñidas con DAB. El área de acumulación de ROS se calculó mediante el software ImageJ y se analizó por One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey con GraphPad Prism. Todos los experimentos se realizaron en 3 réplicas biológicas independientes de cada tiempo incluyendo al menos 4 hojas en cada uno.

6.8. Extracción de DNA genómico (gDNA)

Para estandarizar las condiciones de amplificación de los genes de interés, se realizaron ensayos de PCR punto final. Para esto se extrajo gDNA de micelio del *P. capsici* D3 empleando el kit Quick-DNA™ Plant/Seed DNA Kit (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones:

1. Trituramos el micelio con nitrógeno líquido y se colocó en un tubo ZR Bashing Bead Lysis.
2. Agitamos en vortex por 10 minutos.
3. Centrifugamos las muestras a 12,500 x g por 1 min a 4°C.
4. Transferimos 400 µL del sobrenadante a un tubo Zymo-Spin IV Filter colocado en un tubo colector y centrifugamos a 7000 x g por 1 minuto.

5. Añadimos 1200 μL de Buffer Plant/Seed DNA Binding al filtrado en el tubo colector y mezclamos.
6. Transferimos 800 μL de la mezcla del paso 5 a un tubo Zymo-Spin II C, colocado en un tubo colector y centrifugamos a 10,000 x g por 1 min.
7. Descartamos el sobrenadante del tubo colector y repetimos el paso 6
8. Añadimos 200 μL de DNA Prep-Wash Buffer a un tubo Zymo-Spin II C Column (en un tubo colector) y centrifugamos a 10,000 x g por 1 minuto
9. Agregamos 500 μL de Plant/Seed DNA Wash Buffer al tubo Zymo-Spin II C Column y centrifugamos a 10,000 x g por 1 minuto.
10. Transferimos el Zymo-Spin II C Column a un microtubo de 1.5ml y agregamos 50 μL de DNA Elution Buffer directamente a la columna y centrifugamos a 10,000 x g por 30 seg.
11. Transferimos el DNA eluido del paso 10 a un tubo Zymo-Spin IV-HRC (centrifugado a 8000 x g por 3 minutos previamente) en un tubo (1.5 ml) y centrifugamos por 1 min a 8000 x g.

6.9. Análisis de muestras de DNA

La concentración y pureza de las muestras de gDNA fueron estimadas mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop® ND-2000 (ThermoScientific) y la integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (1X) con de SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific). Se cargaron 3 μl de cada muestra de DNA y 3 de μl buffer de carga (2X) en cada pozo. Se utilizó un marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Las muestras se corrieron a 120 V por 35 min y se visualizaron en un fotodocumentador.

6.10. Estandarización de las condiciones para la amplificación de genes metilasa/desmetilasa de *P. capsici* D3.

Para la cuantificación de la expresión relativa de genes metilasa (HMT) y desmetilasa (HDM) de *P. capsici* D3 relacionados con la marca H3K4me3 se utilizaron oligos previamente diseñados en nuestro grupo de trabajo (**Tabla 1**). Las condiciones experimentales para dicha amplificación no se habían determinado, por lo que se realizó su estandarización utilizando PCR con gradiente de T_m para obtener la amplificación específica de fragmentos de los genes HMT y HDM, y el gen que codifica para factor de

elongación (EF), que sería utilizado posteriormente como control endógeno en los experimentos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR). La mezcla de reacción se preparó con las siguientes concentraciones para un volumen final de 20 µl: 2 µl de Buffer (10X), 0.4 µl de dNTPs (10 mM), 1.2 µl de MgCl₂ (25 mM), 0.1 de Taq Polimerasa, 0.6 µl de oligo directo (2 mM), 0.6 µl de oligo reverso (2 mM) y 14.1 µl de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento con un gradiente de 58°C a 63°C por 1 min, extensión a 72°C por 30 s, y una extensión final de 72°C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y por espectrofotometría siguiendo el paso 5.9 Análisis de muestras de DNA.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de metilasa (HMT) y desmetilasas (HDM) relacionadas con la marca H3K4me3

Gen	No. de pares de bases	Oligo	Secuencia 5´-3´	C-G %
EF1	193	PcEFFwd	CTA AGG GCA CCC AGG ACT TC	60
		PcERev	TCA CCC GAC TTC ACG AAC TT	55
DOT1	108	PcDot1F	CAA CGT GCT TTG GAG AAC GG	55
		PcDot1R	GCG TGT CTG GCA ATT TGT GT	50
SETD1	114	PcSETD1F	CCG AGT GGA CGA GAA AAC GA	55
		PcSETD1R	CCT CCT TCG ACA GCC ACA AT	55
SETMAR	101	PcSETMARF	CCA GGA GAT CGA GAA ACG GG	60
		PcSETMARR	CCT TTG GGT CGT AGC GTT CT	55
SET SMYD	100	PcSMYDF	ACA ACT CCA ACC ACC CGA TG	55
		PcSMYDR	GCG TTG CTA TTT CCT GCT CC	55
SET SMYD3	123	PcSMYD3F	ACC TCA ACA GCT AAA CGC CA	50
		PcSMYD3R	CAC GTC GCT CTG GAG ACT TT	55
JmjC2	181	PcJmjC2F	ACA TCA TCC TGA CGT TCC CG	55
		PcJmjC2R	CCG AAG TGA AAC ACG AAG CG	55
JmjC 6021	231	PcJmjC6021F	AGA GGA ACT ACT GGA GCG GT	55
		PcJmjC6021R	CAA GGG ATG CCG TAC CAA GT	55

6.11. Extracción de RNA

A partir de las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* inoculadas a las 24, 48 y 72 hpi y almacenadas a -80°C aislamos el RNA total utilizando diferentes protocolos:

6.11.1. Método de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific)

1. Trituramos el tejido vegetal con nitrógeno líquido y se colocó en un microtubo de 1.5 ml.
2. Adicionamos 1 ml de TRIzol a la muestra y se agitó vigorosamente utilizando vortex.
3. Mantuvimos las muestras a temperatura ambiente (TA) por 5 minutos y se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min a TA.
4. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se agregaron 250 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente utilizando vortex.
5. Centrifugamos las muestras a 13,000 rpm por 15 min a 4°C.
6. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó incubando por 10 min en hielo.
7. Centrifugamos las muestras a 13,000 rpm por 10 min a 4°C.
8. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol frío al 75%, se agitó vigorosamente utilizando vortex.
9. Centrifugamos las muestras a 7, 500 rpm por 5 min a 4°C.
10. Repetimos los pasos 8 y 9, y se dejó secar el pellet en hielo por 15 min.
11. Finalmente, resuspendimos la pastilla en 50 µl de H₂O libre de RNAsas y se calentó en baño maría por 10 min a 55°C.
12. El RNA obtenido lo almacenamos inmediatamente a -80°C.

Posteriormente, y previo a su uso para sintetizar cDNA, el RNA fue tratado con DNasa I (Thermo Fisher Scientific) como se indica a continuación:

1. Se colocó en un tubo microtubo de 1.5 ml, 5 µl de Buffer de reacción con MgCl₂ (10X), 5 µl de DNasa I (1 U/µl), 5 µg de RNA y se completó con H₂O libre de RNAsas a 50 µl.

2. Incubamos las muestras a 37°C por 30 min, posteriormente se agregó 1 µl de EDTA (50 mM) e incubamos a 65°C por 10 min.

6.11.2. Quick-RNA Plant Miniprep Kit (Zymo Research)

1. Trituramos el tejido vegetal con nitrógeno líquido y se colocó en un tubo Z12 Bashing Bead™ de lisis y añadimos 800 µl de Buffer RNA Lysis.
2. Agitamos en vortex 30-60 seg y centrifugamos por a 13,000 g por 1 min a 4°C.
3. Transferimos 400 µl del sobrenadante en una columna Zymo-Spin III CG Column ajustada a un tubo colector y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C.
4. Añadimos 400 µl de etanol (95-100%) al filtrado en el tubo colector y mezclamos.
5. Transferimos la mezcla a una columna Zymo-Spin™ II C columna ajustada a un tubo colector y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a a 4°C y descartamos el filtrado.
6. Añadimos 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna Zymo-Spin™ II C y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a a 4°C.
7. Realizamos un tratamiento con DNasa en la columna. Para lo cual colocamos en un microtubo de 1.5 ml, 8 µl de Buffer de reacción con MgCl₂ (10X), 8 µl de DNasa I (1 U/µl) y 64 µl de H₂O free RNase y agregamos la preparación a la columna Zymo-Spin™ II C.
8. Incubamos las muestras a 37°C por 60 min.
9. Añadimos 400 µl de RNA Prep buffer a la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C. Descartamos el filtrado.
10. Añadimos 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar a 13,000 x g por 30 seg a 4°C. Descartamos el filtrado.
11. Añadimos 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 2 min a 4°C. Transferimos la columna a un tubo libre de RNasa.
12. Añadimos 50 ml DNase/RNase Free Water directo en la matriz de la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C.
13. Colocamos un Zymo Spin™ III-H12C Filter en un nuevo tubo colector y añadimos 600 ul de Prep Solution. Centrifugar a 8000 x g por 3 min a 4°C.
14. Finalmente, transferimos el RNA eluido en el paso 10 en el filtro preparado en el paso 11 (colocado a un tubo de 1.5 ml) y centrifugar a 16,000 x g por 3 min a 4°C.
15. El RNA obtenido lo almacenamos inmediatamente a -80°C.

6.11.3. Mezcla de protocolos

Las muestras de RNA obtenidas a partir del método de TRIzol® mostraron una concentración adecuada, pero el uso de este agente pudo no eliminar metabolitos generados por las hojas necrosadas, por lo que no tenían una pureza adecuada. Las muestras con el kit Quick-RNA Plant Miniprep Kit (Zymo Research) si mostraron una pureza adecuada pero la concentración de RNA era muy baja, por lo que se decidió estandarizar un protocolo usando ambos métodos.

1. Colectamos muestra de hojas infectadas triturada finamente en nitrógeno líquido en un microtubo de 1.5 ml.
2. Transferimos la muestra a un tubo de centrifuga de 2 ml y agregamos 1 ml de TRIzol al tubo que contiene el polvo fino.
3. Agitamos en vortex por 30 seg y posteriormente incubamos la muestra homogeneizada por 5 min a TA.
4. Centrifugamos a 12,000 x g durante 10 min a TA y transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Agregamos 200 µl de cloroformo por 1 ml de TRIzol y agitamos en vortex vigorosamente por 15 s.
6. Centrifugamos las muestras a 12,000 x g por 15 min a 4°C.
7. Transferimos 600 µl de la fase acuosa en un tubo nuevo y agregamos 500 µl de alcohol isopropílico al tubo con la fase acuosa.
8. Incubamos la muestra a TA durante 10 min.
9. Transferimos la mezcla a una columna Zymo-Spin™ II C ajustada a un tubo colector y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C.
10. Descartamos el filtrado y realizamos tratamiento in-column con DNase 1 que fue descrito en el Método de Quick-RNA Plant Miniprep Kit (Zymo Research).
11. Añadimos 400 µl de RNA Prep buffer a la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C. Descartamos el filtrado.
12. Añadimos 700 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar a 13,000 x g por 30 seg a 4°C. Descartamos el filtrado.
13. Añadimos 400 µl de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 2 min a 4°C. Transferimos la columna a un tubo libre de RNasa.
14. Añadimos 50 ml DNase/RNase Free Water directo en la matriz de la columna y centrifugamos a 13,000 x g por 30 seg a 4°C.

15. Colocamos un Zymo Spin™ III-H12C Filter en un nuevo tubo colector y añadimos 600 µl de Prep Solution. Centrifugar a 8000 x g por 3 min a 4°C.
16. Finalmente, transferimos el RNA eluido en el paso 10 en el filtro preparado en el paso 11 (colocado a un tubo de 1.5 ml) y centrifugar a 16,000 x g por 3 min a 4°C.
17. El RNA obtenido lo almacenamos inmediatamente a -80°C.

6.12. Análisis de muestras de RNA

La concentración y pureza de las muestras de RNA fueron estimadas mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop® ND-2000 (ThermoScientific). La pureza del RNA se estimó por la relación de absorbancia (A260/280) y (A260/230). La integridad se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (1X) con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific). Se cargaron 3 µl de cada muestra de RNA y 3 de µl buffer de carga (2X) en cada pozo. Se utilizó un marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Las muestras se corrieron a 120 V por 35 min y se visualizaron en un fotodocumentador.

6.13. PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) de genes lisina metilasa y lisina desmetilasa y efectores de *P. capsici* D3

En el presente trabajo se decidió explorar los niveles de expresión relativa de los genes metilasa (SET SMYD3) y desmetilasa (JmjC 6021) relacionados con la marca H3K4me3 durante la interacción con *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24, 48 y 72 hpi. También se analizó la expresión relativa de genes los efectores *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* (**Tabla 2**). La síntesis de cDNA se llevó a cabo por transcripción reversa (RT) con el Kit SCRIPT cDNA Synthesis (Jena Bioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó un total de 1 µg de RNA libre de DNA, 0.5 µl de Transcriptasa Reversa (200 U), 0.5 µL de oligo-(dT)20 (100 µM), 4 µL de Reaction Buffer (5X), 1 µl de dNTPs (10 mM), 0.5 µl de RNase Inhibitor (40 U), y agua libre de RNasa para obtener una reacción de 20 µl (RNA 50 ng/ µL). Cada reacción de RT se realizó en las siguientes condiciones: RNA y oligo-(dT)20 a 65 °C por 5 min, agua libre de RNase, Reaction Buffer, dNTPs, RNase Inhibitor y Reversa Transcriptasa a 42 °C por 10 min, 50 °C por 60 min, 70 °C por 10 min y 20 °C por 1 min.

Los niveles de cDNA de de los transcritos de los genes SET SMYD3, JmjC 6021, *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (qPCR). La mezcla de reacción

se preparó con las siguientes concentraciones para un volumen final de 10 μ l: 5 μ l de qPCR SYBRMaster HighROX (Jena Bioscience), 0.5 μ l de oligo forward (2 mM), 0.5 μ l de oligo reverse (2 mM), 2 μ l de H₂O y 1 μ l de cDNA (50 μ g). Cada reacción de qPCR se realizó con el sistema StepOne™ Real-Time PCR en las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, la T_m por 1 min usada para cada gen varía según la Tabla 3, y 72 °C por 1 min, seguido de un paso de disociación de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min y 95 °C por 15 s. Se analizaron dos réplicas biológicas independientes para cada condición con tres replicas técnicas. Los datos se normalizaron a niveles del gen endógeno EF1 y se analizaron mediante el método $\Delta\Delta$ CT (Livak & Schmittgen 2001). A partir de $\Delta\Delta$ CT obtuvimos el “Fold Change” y se analizaron los resultados de la expresión relativa por One-way ANOVA seguido de la prueba de Tukey con GraphPad Prism.

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos de genes efectores *Avr* utilizados en qPCR

Gen	No. de pares de bases	Oligo	Secuencia 5´-3´	CG%	T _m (°C)
<i>Avr1a</i>	170	Pcap <i>Avr1</i> -F	CGA CGA GAG GGG AGG ATT TC	60	59
		Pcap <i>Avr1</i> -R	AGT ATT TGG GGG CCT TCA CC	55	
<i>Avr1b</i>	183	Pc <i>Avr1b</i> -F	GTG GAT TCT CCA ATG CTG CG	55	59
		Pc <i>Avr1b</i> -R	GTC CCA GTT TGG CTA GAA CG	55	
<i>Avr3a1</i>	151	Pcap <i>Avr3a1</i> -F	CAT CAT GGC AGA CCC AAG CA	55	59
		Pcap <i>Avr3a1</i> -R	ATA ATC CAG GTG GAT CGC GT	50	

7. RESULTADOS

7.1. Infección de *P. capsici* D3 en *C. pepo* y *N. benthamiana*

Para analizar la infección de *P. capsici* D3 realizamos experimentos de evolución temporal de la interacción planta-patógeno a las 24, 48 y 72 horas post infección (hpi) (**Figura 8**). Después de inocular las hojas de las plantas hospederas con un disco de agar que contenía micelio, identificamos la fase biotrófica dentro de las primeras 24 hpi al no haber signos de infección en las hojas de *C. pepo* y *N. benthamiana*. Después de 24 hpi, las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* mostraron una coloración oscura solo en el sitio de inoculación, y el área de infección que se observó bajo luz UV (365 nm) no mostró diferencias significativas entre *N. benthamiana* (0.3724 cm²) y *C. pepo* (0.3245 cm²). Sin embargo, a las 48 hpi, las hojas de *N. benthamiana* mostraron el doble del área de infección (14.97 cm²) en comparación con las hojas de *C. pepo* (7.266 cm²). La misma tendencia se mantuvo a las 72 hpi, donde *N. benthamiana* (28.96 cm²) mostró una diferencia significativa mayor del área foliar necrótica con respecto a *C. pepo* (24.76 cm²) (**Figura 9**). Los análisis bajo luz UV indicaron que *N. benthamiana* y *C. pepo* son susceptibles a *P. capsici* y que *N. benthamiana* muestra mayor área de muerte celular.

Para estudiar más a fondo el proceso de infección de *P. capsici*, analizamos la infección con zoosporas de *P. capsici* en las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24 y 48 hpi, mediante una tinción con azul de lactofenol (**Figura 10**), que es indicativa de la muerte de células vegetales (Bi *et al.*, 2009). A las 24 hpi, se observaron manchas azul claro solo en el sitio de inoculación del patógeno en ambos hospederos coincidiendo con lo caracterizado anteriormente bajo luz UV e indicando poca colonización del patógeno. Sin embargo, a las 48 hpi se observó una colonización extendida y evidente en *N. benthamiana* y *C. pepo*, mostrando manchas color azul oscuro y la presencia de necrosis al exponer las hojas a luz UV (365 nm).

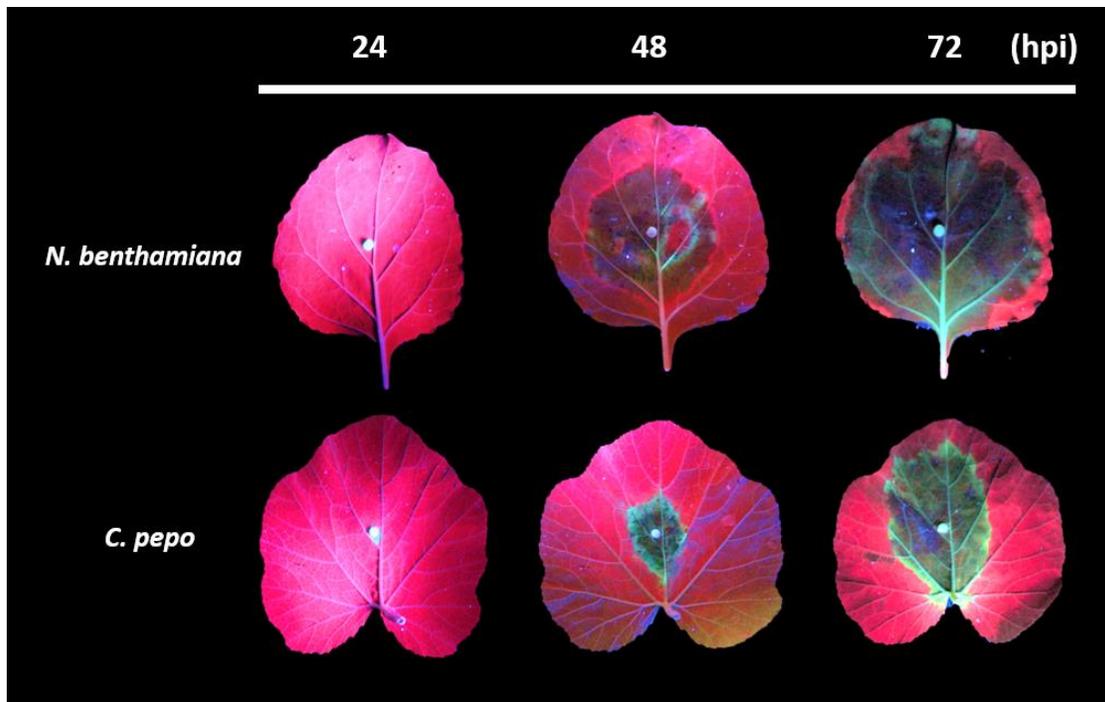


Figura 8. Fenotipo de la infección en hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* por *P. capsici* D3 a las 24, 48 y 72 hpi. Imágenes tomadas de hojas infectadas expuestas a luz UV (365 nm) más representativas de tres réplicas biológicas de los experimentos. El área de color rojo muestra tejido sano de la hoja y el área verde representa el tejido necrosado.

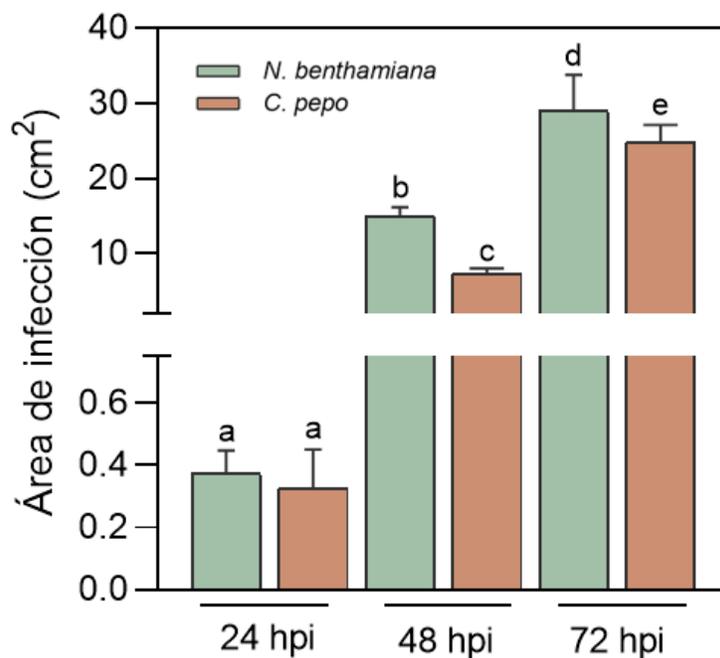


Figura 9. Área de infección en las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* por *P. capsici* D3 a las 24, 48 y 72 hpi. Las barras de error representan \pm la desviación estándar de la media de tres réplicas biológicas. Las letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ ANOVA).

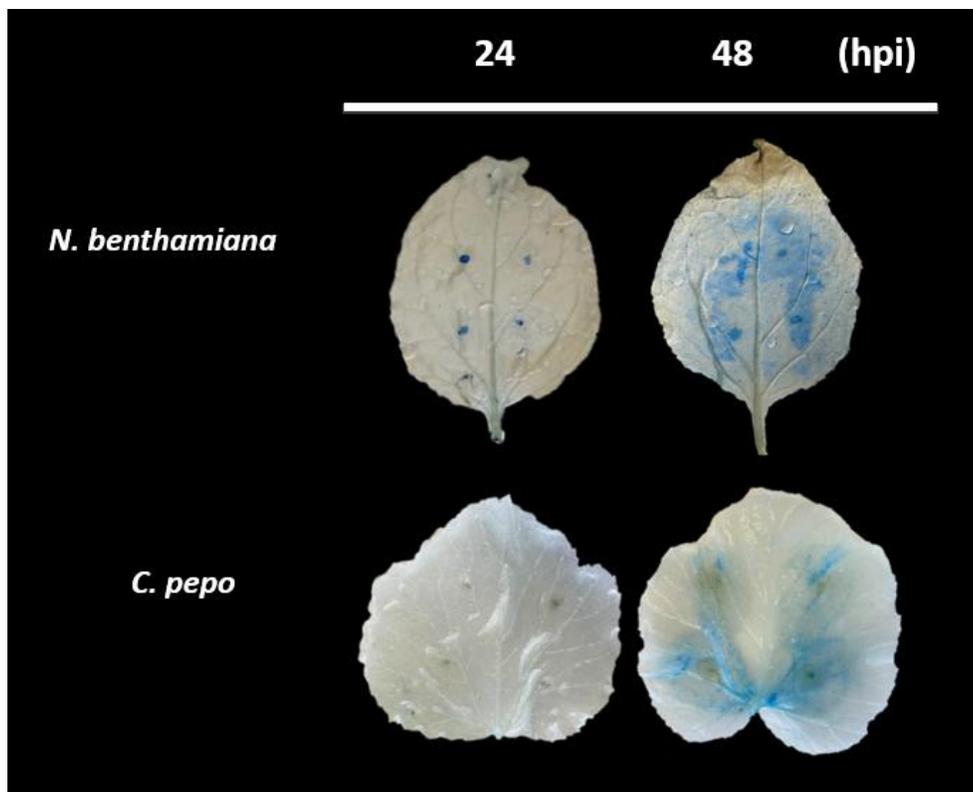


Figura 10. Colonización de *P. capsici* D3 y muerte celular en hojas de *C. pepo* y *N. benthamiana*. Se utilizó una tinción de azul de lactofenol para observar la muerte celular causada por la colonización de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*, mediante la presencia de manchas azules. Se muestran las imágenes más representativas de tres replicas biológicas de los experimentos.

7.2. Diferencias en la acumulación de ROS en *N. benthamiana* y *C. pepo*

Para analizar la respuesta de defensa de *N. benthamiana* y *C. pepo* a la infección con zoosporas de *P. capsici* D3 a las 24 y 48 hpi realizamos tinciones con DAB (**Figura 11**). La relación entre el área acumulada de ROS y el área total de la hoja a las 24 hpi no mostró diferencias significativas entre las hojas de *N. benthamiana* (30.33%) y *C. pepo* (27.77%). A las 48 hpi el porcentaje de la acumulación de ROS aumentó en *N. benthamiana* (93.88%) y en *C. pepo* (87.21%), cubriendo casi por completo la hoja. Sin embargo, observamos mayor intensidad de la coloración de la tinción DAB en *C. pepo* a comparación de *N. benthamiana* (**Figura 12**). Estos resultados muestran que *N. benthamiana* y *C. pepo* responden a la infección de *P. capsici* y que no hay diferencias significativas en el área foliar con acumulación de ROS durante la infección de *P. capsici* D3.

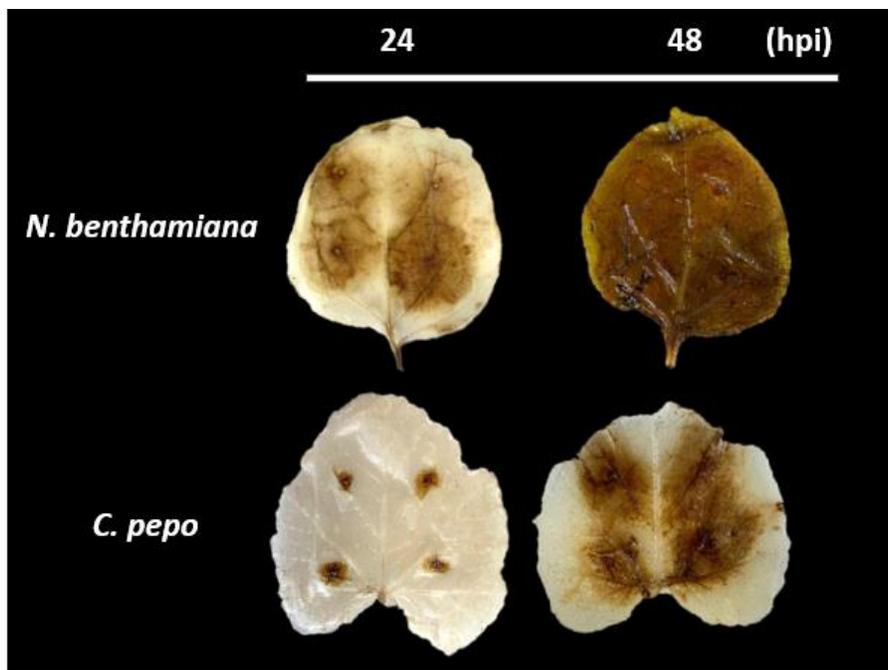


Figura 11. Tinción DAB para la detección de ROS en hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24 y 48 hpi con *P. capsici* D3. Se muestran las imágenes más representativas de tres replicas biológicas de los experimentos.

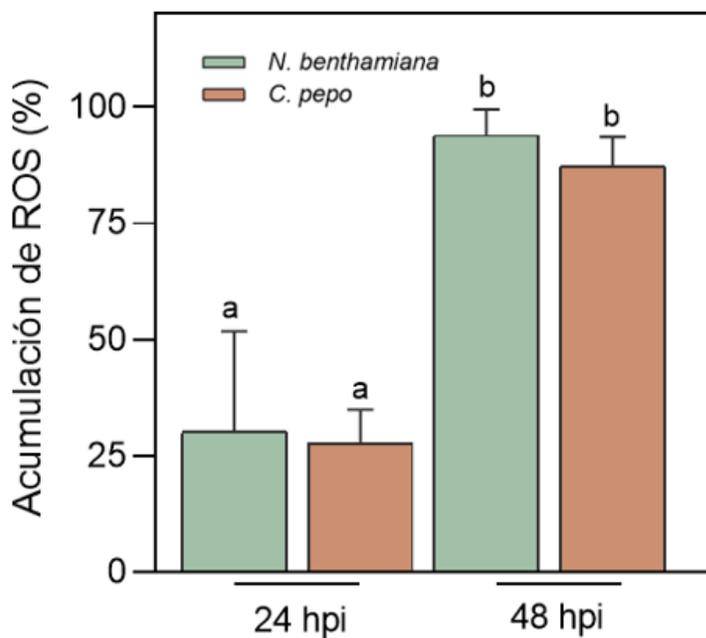


Figura 12. Análisis de acumulación de ROS en hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24 y 48 hpi con *P. capsici* D3. Porcentaje de acumulación de ROS con respecto al área total de las hojas. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

7.3. Efecto de la interacción con *C. pepo* y *N. benthamiana* sobre la morfología de *P. capsici* D3

Una vez caracterizado el fenotipo de la infección de *P. capsici* D3 en *N. benthamiana* y *C. pepo*, aislamos el patógeno de hojas de ambas plantas hospederas infectadas por 72 h y comparamos los patrones morfológicos y de crecimiento de las colonias de micelio. Los reaislamientos de *P. capsici* D3 de *N. benthamiana* y *C. pepo* variaron en el patrón de crecimiento. *P. capsici* D3 reaislado de *N. benthamiana* mostró un patrón estrellado irregular y poco micelio aéreo, y los obtenidos de *C. pepo* tienen un patrón estrellado irregular menos definido y con micelio denso (**Figura 13**). Ambos reaislados no mostraron diferencias significativas durante el crecimiento de micelio en comparación con el control (**Figura 14**).

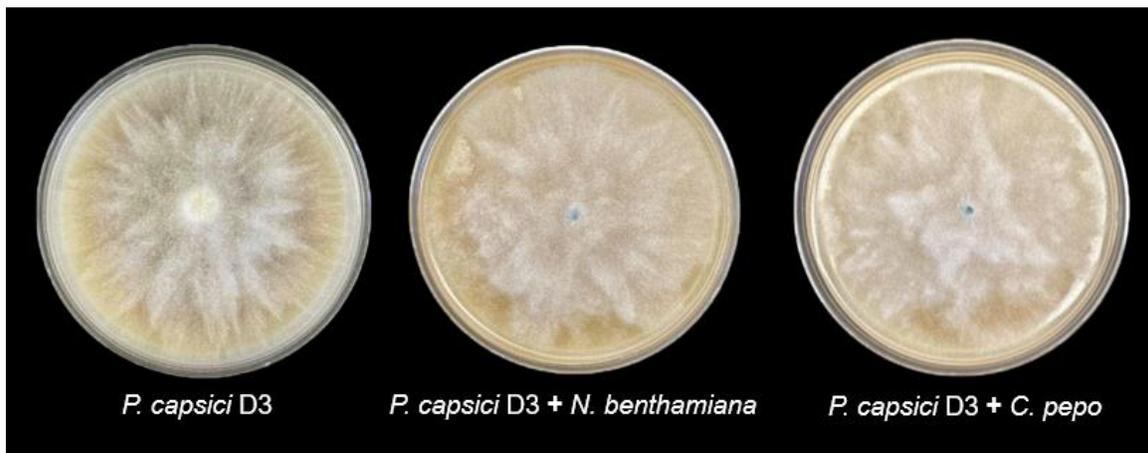


Figura 13. Morfología colonial de *P. capsici* después de la infección de *N. benthamiana* y *C. pepo*. Colonias de *P. capsici* D3 en medio V8 después de crecer 7 días a 28°C en oscuridad. Se muestran las imágenes más representativas de tres replicas biológicas del experimento.

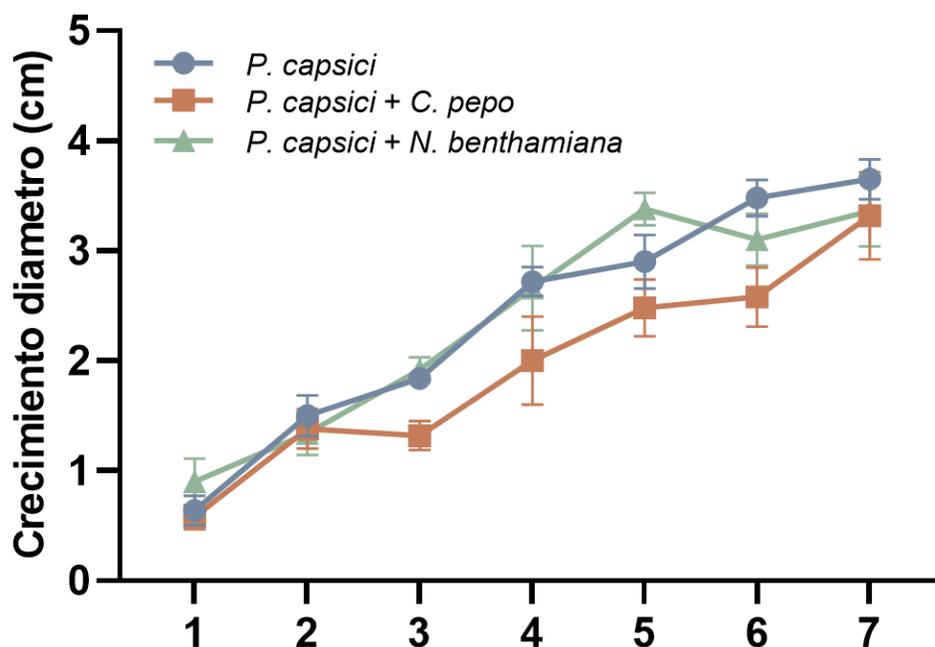


Figura 14. Cinética de crecimiento de aislados de *P. capsici* D3. Crecimiento de *P. capsici* (diámetro de expansión de micelio en placas V8) después de haber infectado *C. pepo* y *N. benthamiana*. Se muestra la media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar ($p < 0,05$, ANOVA).

7.4. Ensayos de PCR y estandarización de genes codificantes de metilasas / desmetilasas de histonas de *P. capsici* D3

A partir de DNA obtenido de micelio de *P. capsici* realizamos PCR con gradiente para identificar las temperaturas de fusión (T_m) ideales para la amplificación específica de los siguientes genes: gen endógeno EF1, genes metilasas de histonas de lisina (HMT); DOT1, SETD1, SET SMYD, SET SMYD3, SETMAR) y desmetilasa (HDM); JmjC2, JmjC 6021. Las T_m obtenidas fueron 57° C (SET SMYD), 58.2 °C (EF1, RxLR_553394 y CRN_114043), 59.3°C (DOT1, SETMAR, JmjC y RxLR_12066), 61.8 °C (JmjC 6021 y CRN 106136), 60.7° C (SET SMYD3) y 63°C (SETD1). Para corroborar la integridad de la amplificación del gen obtenido por PCR, realizamos un gel de electroforesis y observamos una intensidad de amplificación adecuada (**Figura 15**). La expresión relativa del gen metilasa (SET SMYD3) y desmetilasa (JmjC 6021) durante la interacción de *P. capsici* D3 en *N. benthamiana* y *C. pepo*, se analizó posteriormente por RT-qPCR.

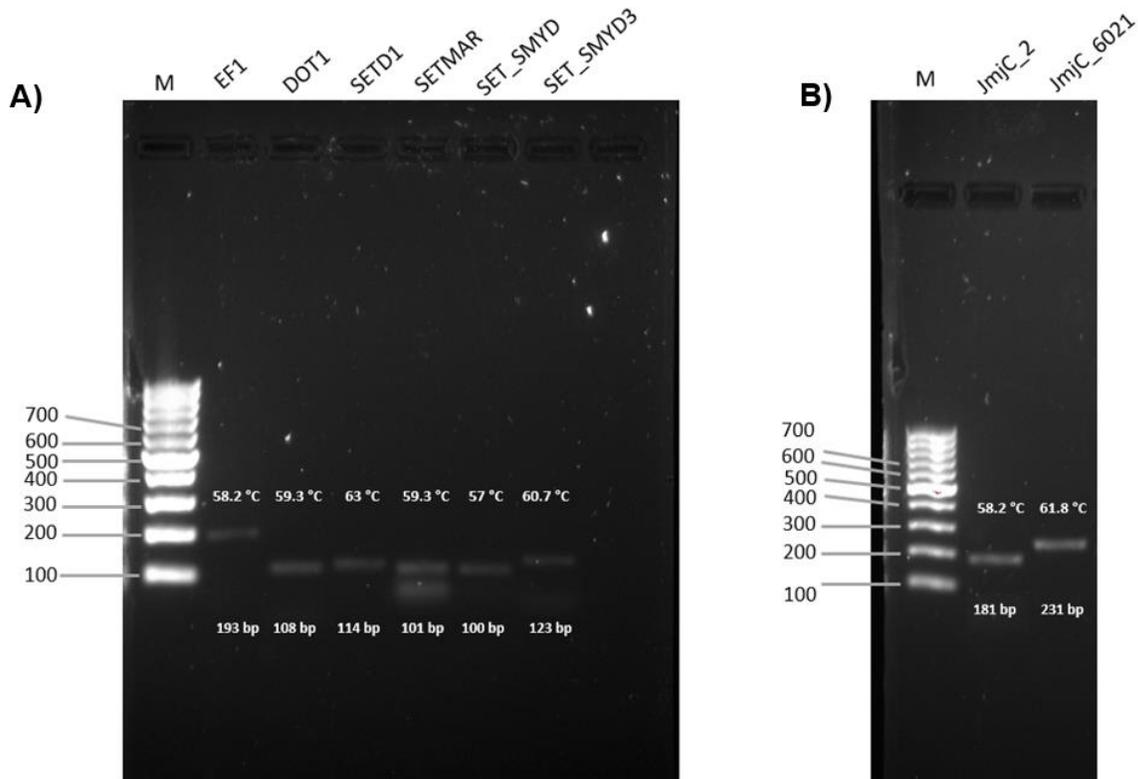


Figura 15. Estandarización de la amplificación por PCR de genes que codifican para metilasas y desmetilasas de histonas. Electroforesis en gel de productos de PCR de genes metilasa y desmetilasa de histonas. Determinación de la temperatura de alineamiento de los oligos utilizados para la amplificación de genes que codifican para **(A)** un gen endógeno (EF1) y genes HMT, y **(B)** genes HDM. M = marcador molecular 1 kb.

7.5. Extracción de RNA

Las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* infectadas por *P. capsici* mostraban una necrosis muy avanzada a las 72 hpi, por lo que evaluamos diferentes protocolos (TRIzol, Quick-RNA Plant Miniprep Kit y una mezcla de ambos protocolos) para obtener RNA con una pureza, integridad y cantidad adecuada (**Tabla 3**). El método de extracción con TRIzol mostró una concentración promedio de RNA de 602.16 ng/μl de las hojas de *N. benthamiana* y de 944.98 ng/μl para *C. pepo* a las 72 hpi. El RNA absorbe la luz UV a 260 nm, la proteína a 280 nm y, polifenoles y polisacáridos a 230 nm. Por lo que la muestra tendrá una pureza alta; libre de contaminación cuando la relación A260/280 y A260/230, sea de por lo menos 1.60 (Kim *et al.*, 2014; George., 2018). Durante la extracción de RNA por TRIzol, la muestra de *N. benthamiana* mostro una relación A260/280 promedio de 1.91 y *C. pepo* de 1.78, y en A260/230 promedio fue de 1.36 y 1.33, respectivamente.

Las concentraciones promedio de las muestras de RNA obtenidas con el kit Quick-RNA Plant Miniprep Kit (Zymo Research) fueron menor a las obtenidas con el método de TRIzol (menos de 100 ng/μl), pero aun así eran adecuadas para una síntesis de cDNA donde se requiere una concentración mínima de 80 ng/μl. La concentración promedio de RNA de las muestras de *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 72 hpi fueron de 92.95 y 83.05 ng/μl, respectivamente. La relación A260/280 y A260/230 fue menor a 1.6 para ambas muestras, lo que se considera como con contaminación proteica, y de polifenoles y polisacáridos. La mezcla de protocolos solo mostró una concentración promedio adecuada para las muestras de *C. pepo* con 294.5 ng/μl, mientras que en *N. benthamiana* fue 73.22 ng/μl. La relación en A260/280 en *N. benthamiana* fue 1.96 y en *C. pepo* 1.08, y en A260/230 en *N. benthamiana* fue 1.51 y en *C. pepo* 0.75.

Tabla 3. Análisis espectrofotométrico de RNA aislado mediante diferentes protocolos.

Método	Muestra	Concentración (ng/ μl)	A260/280	A260/230
TRIzol	<i>N. benthamiana</i> (72 hpi)	602.16	1.912	1.36
	<i>C. pepo</i> (72 hpi)	944.98	1.78	1.33
Quick-RNA Plant Miniprep Kit	<i>N. benthamiana</i> (72 hpi)	92.95	1.40	1.36
	<i>C. pepo</i> (72 hpi)	83.05	1.47	0.66
Mezcla	<i>N. benthamiana</i> (72 hpi)	73.22	1.96	1.51
	<i>C. pepo</i> (72 hpi)	294.5	1.08	0.75

La mezcla de protocolos mostro la produjo la concentración y pureza promedio más alta de RNA de *N. benthamiana*. El método con TRIzol produjo la concentración promedio más alta de RNA de *C. pepo* a las 72 hpi. Sin embargo, el RNA extraído tenía una pureza baja. A pesar de que algunas concentraciones promedio de RNA de las muestras no cumplían con una cantidad y/u pureza adecuada, había replicas que tenían los valores adecuados. Para verificar la integridad de estas muestras realizamos una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los resultados mostraron una integridad adecuada en las muestras de TRIzol, y ambas bandas nítidas de RNA 28S y 18S, pero había degradación de RNA (**Figura 16**). En las muestras obtenidas por Quick-RNA Plant Miniprep Kit no se lograron distinguir las subunidades 28S y 18S además de que se observó una degradación del RNA. Las muestras obtenidas por la mezcla de ambos métodos presentaron menor presencia de las subunidades 28S y 18S, pero una menor desintegración de RNA. Esto demuestra que el RNA extraído de las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* por la mezcla de ambos métodos está libre de contaminantes proteínas, polisacáridos y solventes orgánicos en comparación con los métodos de aislamiento de RNA (TRIzol y Quick-RNA Plant Miniprep Kit) (**Figura 16**).

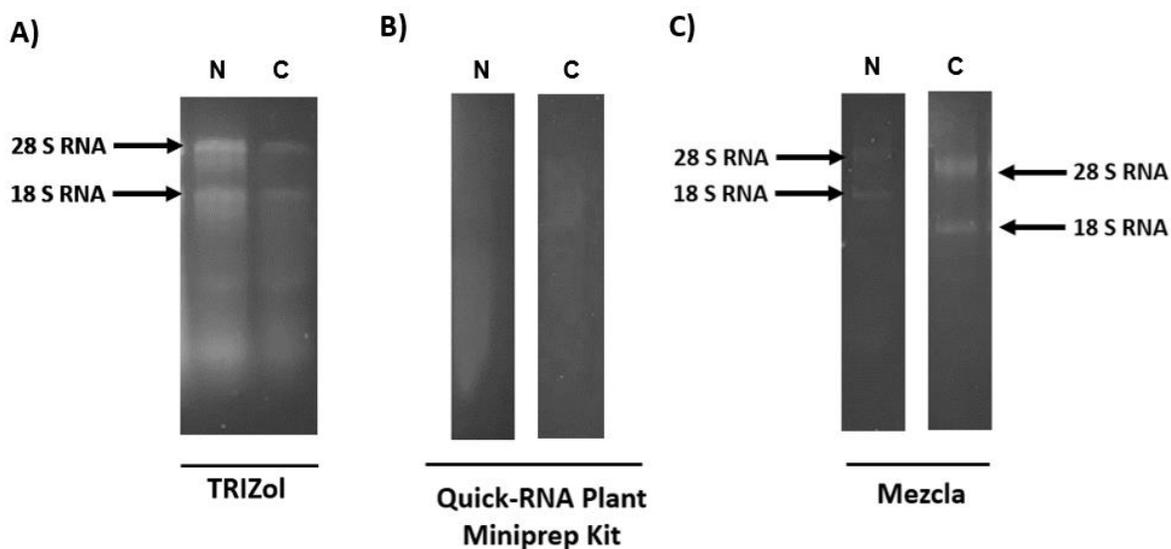


Figura 16. Electroforesis en gel del RNA total aislado de hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* infectadas a las 72 hpi. (A) Método Trizol (B) Quick-RNA Plant Miniprep Kit y (C) Mezcla de método TRIzol y Quick-RNA Plant Miniprep Kit. N = muestra de hoja de *N. benthamiana* 72 hpi, C = muestra de hoja de *C. pepo* 72 hpi.

7.6. Perfil de expresión de genes codificantes de metilasa / desmetilasa durante la infección de *P. capsici* D3

Para analizar una posible función de la marca epigenética de trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) en la infección de *P. capsici*, analizamos la expresión de un gen de metilasa de histonas (SMYD3) y de una desmetilasa de histonas (JmjC6021) a las 24, 48 y 72 hpi en *N. benthamiana* y *C. pepo*. Se determinó el valor medio del umbral de ciclo (Ct) para cada gen, considerando como gen de referencia al gen EF1 y como condición control el micelio de *P. capsici* D3 tras crecer durante 7 días en medio V8. Tanto SET SMYD3 como JmjC 6021 mostraron un aumento en los niveles de transcripción durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*.

A las 24 hpi los niveles de expresión relativa de la metilasa SMYD3 no mostraron un aumento significativo en *N. benthamiana* (5.39 ± 1.46 Fold Change) y *C. pepo* (8.782 ± 0.78 Fold Change) con respecto al control de micelio en agar. A las 48 hpi los niveles de SMYD3 en *N. benthamiana* (4.6 ± 1.35 Fold Change) y *C. pepo* (10.54 ± 1.87 Fold Change) no mostraron diferencias significativas entre ellas ni con respecto a las 24 hpi. Sin embargo, a las 72 hpi hubo un aumento significativo en los niveles de expresión relativa de SMYD3 en *N. benthamiana* (42.59 ± 21.24), en contraste con la infección en *C. pepo* (0.96 ± 0.03) que no mostró un cambio significativo con respecto al control (**Figura 17**). La desmetilasa JmjC6021 mostró una represión significativa en niveles de expresión a las 24 hpi en *N. benthamiana* (0.21 ± 0.08 Fold Change) y *C. pepo* (0.15 ± 0.03 Fold Change). El nivel de expresión más alto de JmjC6021 se detectó a las 48 hpi en *N. benthamiana* (2.18 ± 0.14 Fold Change) y *C. pepo* (2.145 ± 0.31 Fold Change), pero a las 72 hpi se observaron de nuevo bajos niveles de expresión de JmjC6021 en *N. benthamiana* (0.11 ± 0.03 Fold Change) y *C. pepo* (0.15 ± 0.016 Fold Change) (**Figura 18**).

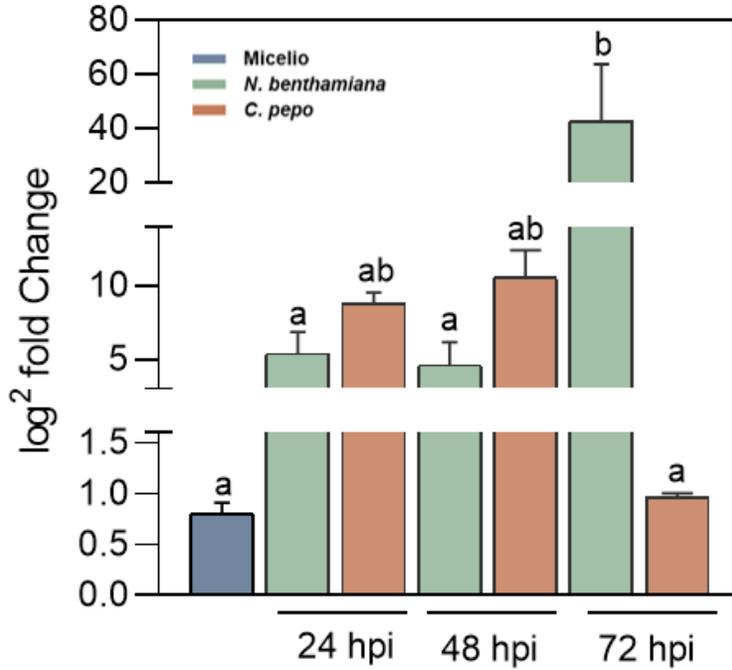


Figura 17. Niveles relativos de expresión del gen SMYD3 durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* determinados por RT-qPCR. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

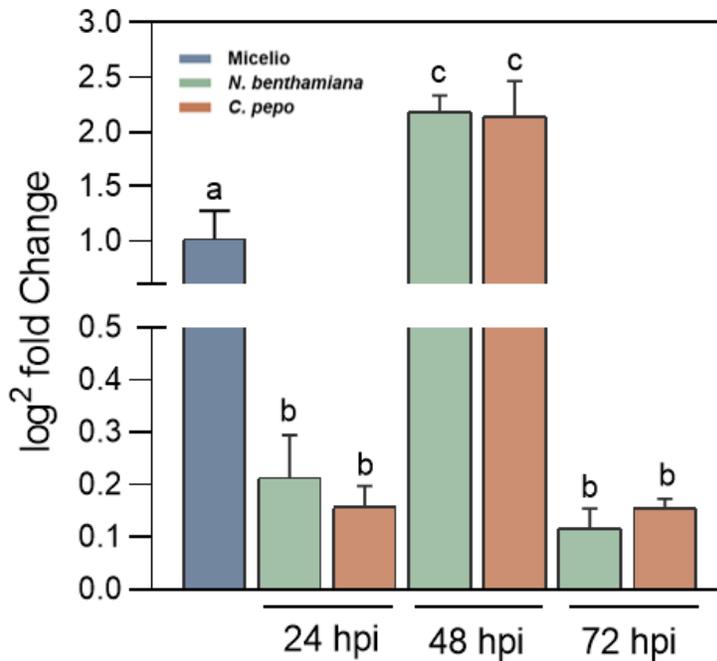


Figura 18. Niveles relativos de expresión del gen JmjC durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* determinados por RT-qPCR. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

7.7. Perfil de expresión de genes codificantes de efectores *Avr* de *P. capsici* D3 durante la infección en diferentes plantas hospederas

Analizamos los niveles de expresión relativa de los genes *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* asociados con la virulencia de *P. capsici* mediante RT-qPCR a partir de RNA total extraído de hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* infectadas a las 24, 48 y 72 hpi. Usamos como gen de referencia al gen EF1 y como condición control el micelio de *P. capsici* D3 tras crecer durante 7 días en medio V8. El gen *Avr1a* mostró una diferencia significativa en los niveles de transcripción a las 24 hpi solo en *C. pepo* (1820 ± 1121 Fold Change), mientras que en *N. benthamiana* (463 ± 53.59 Fold Change) no hubo cambios significativos con respecto al control. A las 48 hpi, los niveles de expresión relativa de *Avr1a* disminuyeron de manera significativa en *C. pepo* (52.76 ± 15.79 Fold Change) en comparación de los niveles observados a las 24 hpi y en *N. benthamiana* no mostramos cambios significativos (31.90 ± 15.4 Fold Change). La disminución en la expresión relativa de *Avr1a* en *C. pepo* se mantuvo y no mostramos cambios significativos (0.13 ± 0.06 Fold Change) en comparación con las 24 hpi. Los niveles de expresión a las 72 hpi en *N. benthamiana* (1.75 ± 0.53 Fold Change) no mostraron una diferencia significativa con respecto a los niveles observados al control de micelio. Observamos que el gen *Avr1a* mostró diferencias significativas en los niveles de expresión relativa solo en *C. pepo* a las 24 hpi (**Figura 19**).

La expresión relativa del gen *Avr1b* mostró un aumento significativo durante la infección a las 24 hpi en *N. benthamiana* (41 ± 7.65 Fold Change) en comparación con *C. pepo* (1.3 ± 0.28 Fold Change) y el control de micelio. A las 48 hpi la expresión relativa de *Avr1b* disminuyó en *N. benthamiana* (0.15 ± 0.05 Fold Change). Mientras que en *C. pepo* (0.67 ± 0.69 Fold Change) no hubo cambios significativos con respecto al control y las muestras de 24 hpi. Durante las 72 hpi no se mostraron diferencias significativas en *N. benthamiana* (1.05 ± 0.18 Fold Change) y *C. pepo* (0.09 ± 0.004 Fold Change) con respecto a las 48 hpi. Observamos que el gen *Avr1b* mostró diferencias significativas en los niveles de expresión relativa solo en *N. benthamiana* a las 24 hpi (**Figura 20**).

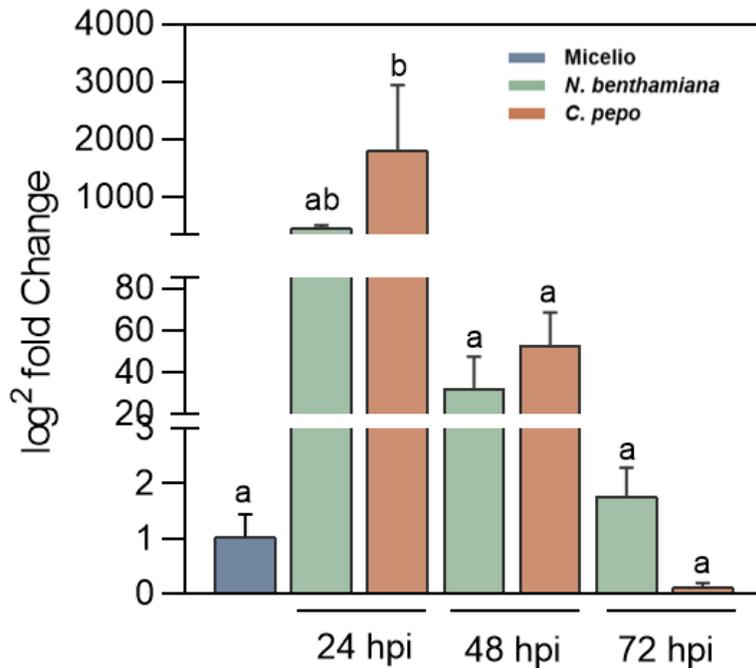


Figura 19. Niveles relativos de expresión de genes *Avr1a* durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* determinados por RT-qPCR. Los datos muestran la media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

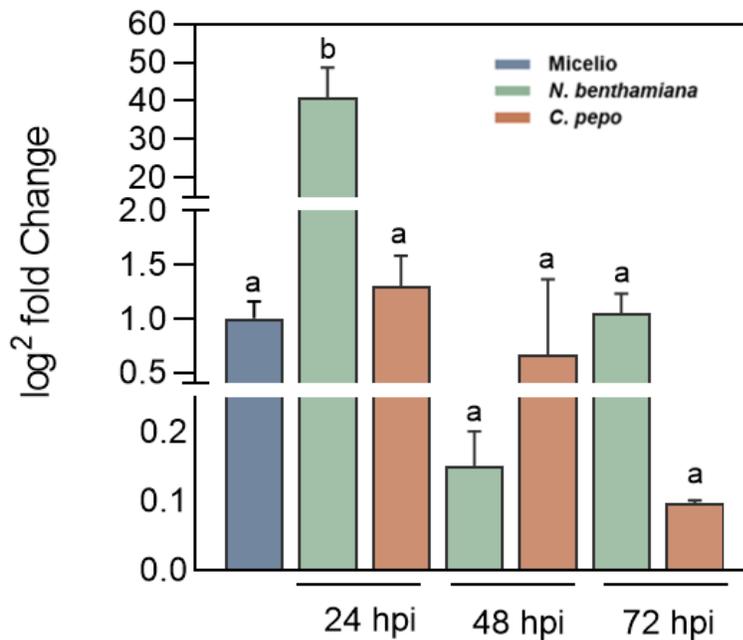


Figura 20. Niveles relativos de expresión de genes *Avr1b* durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* determinados por RT-qPCR. Media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm la desviación estándar. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

El gen *Avr3a1* mostró un aumento significativo en su expresión relativa durante a las 24 hpi en *N. benthamiana* (17.37 ± 13.62 Fold Change) y *C. pepo* (52.19 ± 5.4 Fold Change), así como una diferencia significativa en los niveles de expresión entre los niveles de expresión entre *N. benthamiana* y *C. pepo*. Los niveles de *Avr3a1* disminuyeron de manera significativa a las 48 hpi en *N. benthamiana* (4.47 ± 0.87 Fold Change) y *C. pepo* (4.13 ± 1.39 Fold Change) con respecto a las muestras de 24 hpi, mostrando niveles similares a los del control. A las 72 hpi, la expresión de *Avr3a1* no mostró diferencias en *N. benthamiana* (1.62 ± 0.25 Fold Change) y *C. pepo* (2.12 ± 0.26 Fold Change) en comparación de las 48 hpi, pero si a las 24 hpi. Observamos que el gen *Avr3a1* mostró diferencias significativas en los niveles de expresión relativa en *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24 hpi (**Figura 21**).

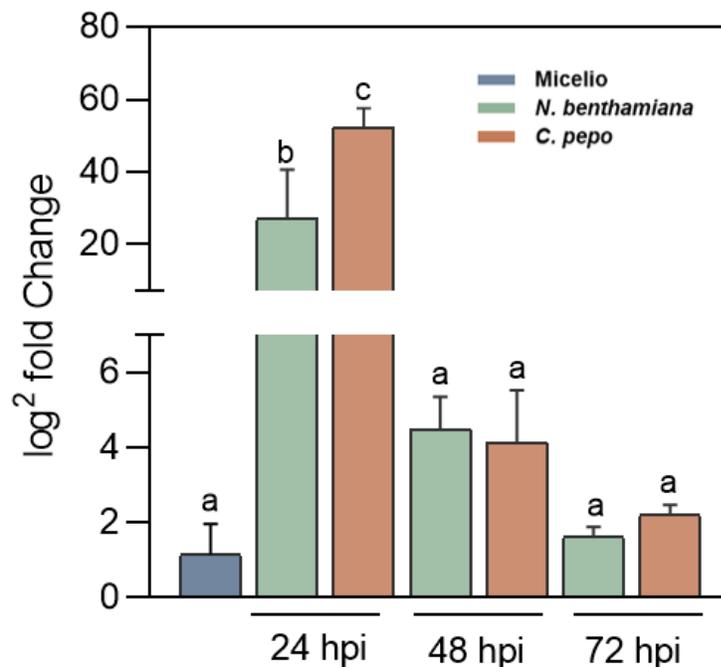


Figura 21. Niveles relativos de expresión de genes *Avr3a1* durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* determinados por RT-qPCR. Media de tres réplicas biológicas de los experimentos \pm desviación estándar. Las letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA).

8. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, las especies de *Phytophthora* como *P. capsici* se han vuelto una amenaza para los ecosistemas agrícolas, ornamentales y forestales. Algunas de las características que hacen a *P. capsici* tan devastador es su amplio rango de plantas hospederas, resistencia a fungicidas, supervivencia de zoosporas por largos periodo en el suelo y, ciclo de infección relativamente corto y hemibiotrófico. El impacto de *P.capsici* hace necesario estudiar los procesos infectivos con el fin de elaborar estrategias de mitigación (Jiang & Tyler, 2012; Lamour *et al.*, 2012; Kamoun *et al.*, 2015;). Durante el proceso de infección, un patógeno vegetal puede causar una muerte celular en la planta hospedera como mecanismo de virulencia o; desencadenar una muerte programada como respuesta de defensa en la planta (respuesta hipersensible [HR]). La fluorescencia de la clorofila es un método utilizado para identificar la presencia de patógenos vegetales. Cuando la luz es absorbida por la clorofila, la cual está presente en los complejos de captación de luz (LHC) de los tilacoides, puede (i) impulsar la fotosíntesis; (ii) emitirse como calor; o (iii) emitirse como luz (fluorescencia). Pero en presencia de un patógeno vegetal, un mal funcionamiento de las células vegetales ocasionaría la disminución de la fluorescencia de la clorofila (Rolfe & Scholes., 2010; Murchie & Lawson., 2013; Wen *et al.*, 2019; Landeo *et al.*, 2021).

En los experimentos de infección con micelio de *P. capsici* D3 en *N. benthamiana* y *C. pepo*, observamos bajo luz UV, la transición a la etapa necrotrófica a partir de las 24 hpi. Estos resultados son similares a las observaciones realizadas en otros patosistemas de *P. capsici* como el tomate (*Solanum lycopersicum* 'Moneymaker'), donde la fase biotrófica, es seguida por una transición a necrotrofía después de 24 hpi y, a las 72 hpi se observa una esporulación del patógeno (Jupe *et al.*, 2013). La necrosis observada bajo luz UV en las hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* durante la infección de *P. capsici*, puede depender de otros factores como las respuestas inmunes de la planta (Govrin & Levine., 2000). Por lo tanto, también analizamos el proceso de infección de *P. capsici*, mediante tinciones de azul de lactofenol, que tiñe tantas estructuras fúngicas como células vegetales muertas (Bi *et al.*, 2009; Shlezinger *et al.*, 2011). Para tener un mejor control de la infección se colocaron cuatro puntos de inoculación en la hoja cada uno con 100 zoosporas, a diferencia de los ensayos bajo luz UV, que fueron inoculadas las hojas con micelio. En este experimento reportamos una mayor intensidad por la tinción con lactofenol en *N. benthamiana*, tanto a las 24 como 48 hpi en comparación con *C. pepo*, lo que mostró un mayor crecimiento de *P. capsici* D3 en *N. benthamiana*. Sin embargo, el tejido necrosado en el tiempo 72 hpi no

permitió manipular las hojas para realizar las tinciones en los experimentos con micelio y zoosporas. La rápida propagación de *P. capsici* en *N. benthamiana* ya había sido reportada por Vega *et al.*, 2014, pero en *C. pepo* no se había estudiado el comportamiento del patógeno en experimentos con hojas desprendidas.

Una de las primeras respuestas tras el reconocimiento de PAMPs de los patógenos vegetales es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que funcionan como agentes antimicrobianos y/o moléculas de señalización durante la respuesta PTI. Sin embargo, durante la respuesta ETI, la acumulación de ROS continúa y junto con el ácido salicílico (SA) desencadena una respuesta de muerte celular programada, conocida como respuesta hipersensible (HR) (Jones & Dangl., 2006). Al momento de identificar la muerte celular bajo luz UV en patógenos necrotróficos y hemibiotróficos como *P. capsici* se puede observar la respuesta HR de la planta, así como la necrosis dirigida por el patógeno. Por lo tanto, también realizamos tinciones con el reactivo histoquímico diaminobencidina (DAB) para observar la respuesta de defensa de *N. benthamiana* y *C. pepo* durante la infección por zoosporas de *P. capsici* D3. DAB en contacto con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), principal derivado de oxígeno genera un precipitado de color café oscuro (Daudi & O'Brien., 2012). En las tinciones con DAB, identificamos que el porcentaje de acumulación de ROS es similar en *N. benthamiana* y *C. pepo* a las 24 y 48 hpi a pesar de que en *N. benthamiana* hay mayor intensidad de producción de ROS que *C. pepo*. Esto es contrario a lo observado en el área necrótica bajo luz UV, donde había diferencias significativas entre distintos hospederos en los mismos tiempos de la infección (48 y 72 hpi).

En *N. benthamiana* a diferencia de otras especies de *Nicotiana* como *N. tabacum* y *N. repanda*, la muerte celular desencadenada por una HR no es suficiente para desplegar una resistencia contra *P. capsici* (Vega *et al.*, 2014), pudiendo ocurrir lo mismo en *C. pepo*, lo que permite estas plantas sean susceptibles a *P. capsici*. Para estudiar la diferencia en las respuestas de defensa de las plantas hospederas ante la infección de *P. capsici*, sería necesario analizar los cambios transcripcionales tanto de *N. benthamiana* y *C. pepo* durante la infección de *P. capsici* para reportar el tipo de estrategia que desencadenan; “tropas de élite” (bajo número de genes, pero alta intensidad de expresión), o “tácticas de cantidad” (gran número de genes, pero expresión de baja intensidad). Otro aspecto que estudiar sería la expresión de los efectores durante la infección de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo*. La función de las proteínas efectoras secretadas por patógenos, como las especies de *Phytophthora*, aun no es clara, aunque se ha relacionado con la transición de la fase de

biotrofia a necrotrofia (Jupe *et al.*, 2013; Muthuswamy *et al.*, 2018). Recientemente, se reportó que el efector RxLR207 de *P. capsici* puede desestabilizar componentes responsables de la regulación de la homeostasis de ROS. Esto activaría la muerte celular mediada por ROS en plantas como *N. benthamiana* y representaría un proceso de *P. capsici* que contribuye a la transición de la etapa biotrófica a la necrotrofica (Li *et al.*, 2019).

La capacidad de los patógenos vegetales de evadir los mecanismos de resistencia se ha atribuido al reconocimiento de las proteínas efectoras (Haas *et al.*, 2009). Por lo tanto, los genes efectores están sometidos a un rápido cambio evolutivo en las poblaciones de patógenos. Los análisis de los genomas de patógenos muestran que los genes efectores se encuentran en regiones genómicas ricas en repeticiones, como elementos transponibles (TE) que pueden tener como resultado polimorfismos, lo que ha permitido la diversificación y pérdida de efectores por recombinación no homóloga (Chen *et al.*, 2018; Fouché *et al.*, 2018). En los últimos años, también se ha mostrado un interés en los mecanismos epigenéticos para regular la expresión de los genes efectores, en especial por las modificaciones postraduccionales de histonas (PTM) (Kasuga & Gijzen 2013; Gijzen *et al.* 2014). A pesar de que se han reportado distintas marcas epigenéticas en *P. infestans* y *P. sojae* relacionadas con la regulación de los factores de virulencia y ciclo de vida, aún se desconoce a fondo el papel de las modificaciones postraduccionales de histonas en la regulación del mecanismo de infección en *P. capsici* (Wang *et al.*, 2020b; Rojas-Rojas & Vega-Arreguín, 2021). De los mecanismos epigenéticos para la regulación de la expresión de genes de virulencia, la metilación de histonas es el que menos atención ha recibido. La metilación de H3K4 es parte de la regulación de la virulencia de diversos patógenos vegetales como las especies de *Fusarium*. En *Fusarium graminearum*, la subunidad de Ccl1 de COMPASS, regula los niveles de H3K4me3 del estado transcripcional de los genes de la biosíntesis de metabolitos secundarios (SMs). En otros patógenos filamentosos, los homólogos de la metilasa Set1 intervienen en funciones especializadas como; el ritmo circadiano en *Neurospora crassa*, desarrollo de estructuras de infección y reproducción asexual en *Magnaporthe oryzae* (Studt *et al.*, 2017). Mientras que en *Botrytis cinerea*, la H3K4 desmetilasa JARID1 (Jar1) regula varios procesos de su desarrollo y virulencia, mediante la formación de los conidios y apresorios, adaptación al estrés por la regulación de ROS endógeno niveles endógenos de ROS, y el ensamblaje de Sep4, una proteína que inicia la formación de la estructura de infección (IFS) y entrada del patógeno a la planta hospedera (Hou *et al.*, 2020).

En este trabajo se determinó estudiar los genes de *P. capsici* que codifican para una enzima metilasa (SET SYMD3) y una desmetilasa (JmjC 6021), los cuales están relacionados con la marca epigenética H3K4me3. H3K4me3 es un marcador epigenético de transcripción activa, que generalmente se encuentra en regiones promotoras o 5' de los genes. Sin embargo, se ha descrito también el silenciamiento de genes ubicados cerca de los telómeros cromosómicos mediado por COMPASS (complejo proteico asociado a Set1) (Kim *et al.*, 2021; Erlendson & Freitag., 2022; Studt *et al.*, 2017). Durante la infección de *P. capsici*, la metilasa SET SMYD3 se relacionó con una represión en la transcripción, mientras que JmjC 6021 con una activación en la expresión génica. Sin embargo, es importante remarcar que la metilasa SMYD3 y desmetilasa JmjC 6021 no son contraparte, el aumento de un gen metilasa no significa necesariamente la disminución del gen desmetilasa en la misma región. Sugerimos que la marca H3K4me3 puede estar influyendo en las diferentes etapas de la infección de *P. capsici*, como la transición de biotrofia a necrotrofia en *C. pepo* y en *N. benthamiana* solo en la etapa final de necrotrofia. Durante la infección de *P. capsici*, la metilasa SMYD3 mostró un aumento significativo en los niveles de expresión en *N. benthamiana* solo a las 72 hpi. Por otro lado, la desmetilasa JmjC 6021 solo mostró cambios significativos, a las 48 hpi en *N. benthamiana* y *C. pepo*, pudiendo tener un papel importante durante la etapa de transición de biotrofia a necrotrofia.

Anteriormente, nuestro grupo de trabajo identificó la expresión diferencial de genes efectores *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* durante la infección de *P. capsici* en distintas plantas hospederas de la familia *Solanaceae*, *Cucurbitaceae* y *Fabaceae*. Por este motivo analizamos la expresión de los genes *Avr* de *P. capsici* durante la infección en *C. pepo* y *N. benthamiana*. Identificamos que los niveles de expresión de los genes *Avr* muestran una alta expresión durante el inicio de la infección que va disminuyendo hasta las 72 hpi, además de que se muestran cambios dependiendo del tiempo de infección y la planta hospedera. Observamos una alta expresión de los genes *Avr* a las 24 hpi. *Avr1a* en *C. pepo*, *Avr1b* en *N. benthamiana* y *Avr3a1* en *N. benthamiana* y *C. pepo*. Esto sugiere un papel importante durante la transición de la fase biotrófica a la fase necrotrofica. Los genes *Avr1a* y *Avr1b* muestran un porcentaje de identidad de 88.12 %, mientras que *Avr3a1* muestra solo 57.75 % de identidad con *Avr1a* y 56.90 % con *Avr1b* (**Figura S1**). La función de *Avr3a1* ha sido relacionado con la inducción de la respuesta HR (Vega-Arreguín *et al.*, 2014), por lo que la alta expresión de *Avr1a* y *Avr1b* puede sugerir un papel similar de estos genes durante la infección de *P. capsici*, a pesar de que solo comparten un motivo con *Avr3a1*

(Figura S2). Se ha reportado que la resistencia de plantas no hospederas de *Nicotiana* spp. como *N. tabacum* se da por el reconocimiento de la proteína efectora *PcAvr3a1* por proteínas codificadas en genes de resistencia a enfermedades (R) afines. Sin embargo, en otras especies como *N. benthamiana*, el silenciamiento de *PcAvr3a1* no muestra efectos sobre la infección por *P. capsici* (Vega-Arreguín *et al.*, 2014; Vega-Arreguín *et al.*, 2017). Por lo que los mecanismos epigenéticos podrían estar regulando la expresión de *Avr* durante la infección de *P. capsici*.

A pesar de que no observamos correlación de la expresión de la metilasa SMYD3 y desmetilasa JmjC 6021 con los genes *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1*, identificamos que JmjC 6021 puede estar teniendo un papel importante durante la transición de la fase de biotrofia a necrotrofia al estarse expresando a las 48 hpi, permitiendo una regulación al alza de genes que están siendo reprimidos por la marca H3K4me3. Existen diversos genes involucrados en el proceso de infección de *P. capsici* que pueden estar siendo regulados por la expresión de SMYD3. Se ha reportado un aumento en la expresión de genes RXLR durante la fase necrotrófica de *P. capsici* en la infección de tomate, por lo que SMYD3 podría estar regulando la expresión de genes de las familias que no fueron analizados en este trabajo (Jupe *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario realizar otros experimentos para verificar que genes están siendo regulados por las acciones de SMYD3 y JmjC6021 sobre la marca epigenética H3K4me3. En trabajos futuros el siguiente paso sería buscar los genes cuya expresión está regulada por la marca de metilación H3K4me3. Para eso se realizarían experimentos de infección en distintos tiempos y hospederos, seguido de una inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) utilizando un anticuerpo específico para esta marca y una secuenciación a partir del DNA obtenido. Con esto podríamos determinar el patrón de la metilación H3K4me3 en distintas condiciones y definir un posible papel en la regulación de la virulencia de *P. capsici*.

9. CONCLUSIONES

- *P. capsici* es capaz de colonizar hojas de *N. benthamiana* y *C. pepo* e inducir la respuesta inmune en ambas plantas hospederas.
- Durante la colonización de *P. capsici* en *N. benthamiana* y *C. pepo* se muestra la expresión de genes relacionados con la supresión de la respuesta de defensa ambos hospederos.
- Los genes que codifican para enzimas relacionadas con la metilación / desmetilación de histonas relacionados con la marca H4K3me3 muestran cambios en su expresión de acuerdo con el tiempo de infección y a las dos plantas hospederas.

10. ANEXOS

```

PcAVR3a1          ATCGATGGTGCAGTCGCTCGATGCGCGACTCAACGGCCAAGCTGATGGCACAAGATTT-C
Pcap_Avr1_        -----ATGAAGTCAATCTAT-CGCGTCC-----TCCTGCTGACGGTGTTCGCCCTAC
Pcap_Avr1b_Pcapsici -----ATGAACTCAATGTAC-CGCGTCC-----TCCTGCTTACGGTGTTCGCCTTGC
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          TTCGTGCACACCACGA-----GAAT-----GAAGA-----AGAAATCCG
Pcap_Avr1_        TTTGTGGTCTCTCCAACGCTGTGAATTCAGGTGGAAGATTGTTGCGGGTAGTGGACTCAA
Pcap_Avr1b_Pcapsici TTTGTGGATTCTCAAATGCTGCGAATTCAGGTGGGAGATTGTTGCGGGTCGTGGACTCCG
                ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          ACAGAGAGGAAAGGGG-----CCTCACGGATTTGTTC-----
Pcap_Avr1_        CCGACGAGAGGGGAGGATTTCCATCGTACCTCAAGGATTCATTAAGTGGAGAATCA
Pcap_Avr1b_Pcapsici CCGAAGAGAGGGGGGATTTACCTCGTACCTCATGGACTCTTCACTAAGTGGAGAATCA
                *   * * *   * * *   * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          -----AAGACCG-----AGAAGGCGG-----
Pcap_Avr1_        ACTCGAAGATCAAGTCTTGGGTCAAGAAGCAGAAGACGGACGAATACGTTCTATCCAAAC
Pcap_Avr1b_Pcapsici ACTCAAAGATTAACTCTTGGGTCAACAAGCAGAAGACGGACGAATACGTTCTAGCCAAAC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          -----CAGTGAAGAAAATGGCCAAGGCCATCA-----TGGCAGACCC
Pcap_Avr1_        TGGGTCTAAGCACCTTGACAGGGAAAGACCTGGTGAAGGCCCCCAAATACTCGCAATTCC
Pcap_Avr1b_Pcapsici TGGGACTAAGCACACTTGACAGGGAAAGAAGTCTGTAAGGCCGCCAAATATCCTCAATTCC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          AAG----CAAGGCCGATGACGTATACCAGAAGTGGGCGGACAAGGGATATACTCTTACGC
Pcap_Avr1_        AGGATTTCAAGGTC---GGTATGTGGCTGAAAGAAGC-GACA-----CCTACAACGA
Pcap_Avr1b_Pcapsici AAGATTTCAAGGTT---GGCGTGTGGCTGAAAGAGGC-GACA-----CCTACAACGT
                * *   * * * * *   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          AACTGAGCGACTTCTTGAAGTCCAAGACCAGGGGGAAGTACGATCGAGTCTACA-ACGGG
Pcap_Avr1_        CAGTGTTCAACACTTTGGGACTGAATA-AAGTGGAAAGGCGCAGTGGAGAAAGCAGACGAC
Pcap_Avr1b_Pcapsici CAGTGTTCAAGACTTTGGGACTGGATA-AAGTGGAAAGGCGCAGTGGAGAAAGCAGACGAC
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          TACGCGATCCACCTGGATTATTGAAAAGCTCT-----GCTGCT
Pcap_Avr1_        TTCGGCACTTACGTGAAATATGTAATGGCCCTCGGGGAAAAGGCAGACGACTACCCCTTT
Pcap_Avr1b_Pcapsici TTCGGGACTTACGTGAAATATGTAATGGCCCTCGGGGAAAAGGCAGACGACTACCCCTATT
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          GTCGAAGCACAAAAAGTTTTAGAGTAACGTC-----AATGACAA
Pcap_Avr1_        GTCACGTGGCGGAAGCTCTCGGAGGAGGATCTCTTGAACAAGTGGAGCTAAAACGAAAG
Pcap_Avr1b_Pcapsici ACCAGGTGGCGGGAGCTTTTCGGGGGAGGATCTCTTGAACAAGTGAAGCTAAAGCGACAA
                *   * * *   * * * * * * * * * * * * * * * *

PcAVR3a1          C-----TCGGCGGCCGC-----
Pcap_Avr1_        ATCCTTCTTCTAGTGAAGAGAGACGAGATCGATATCAGCGTCATGCTGGGGTAG
Pcap_Avr1b_Pcapsici CTCCTATTTCTAGCGAAGAGAAAATGCAATCGACATCAGGATCATGCTGGGT---
                * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura S1. CLUSTAL Alineación de secuencias de *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* por MUSCLE

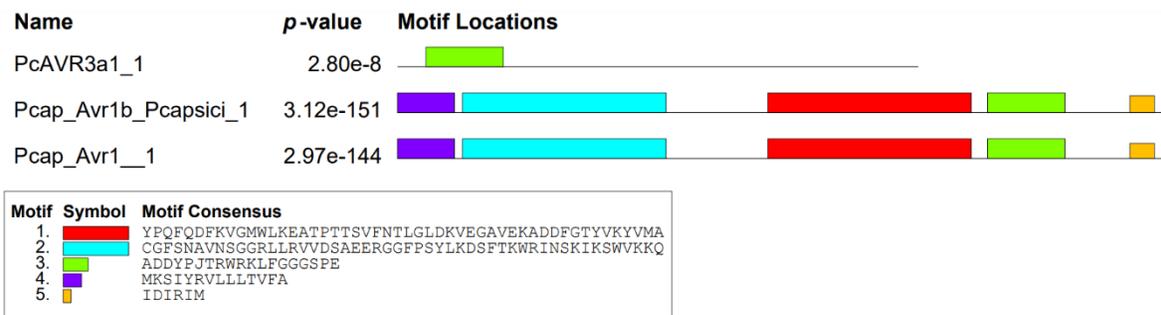


Figura S2. Motivos de *Avr1a*, *Avr1b* y *Avr3a1* por Multiple Em for Motif Elicitation (MEME)

11. REFERENCIAS

- Ali, S., Laurie, J. D., Linning, R., Cervantes-Chavez, J. A., Gaudet, D., & Bakkeren, G. (2014). An immunity-triggering effector from the barley smut fungus *Ustilago hordei* resides in an Ustilaginaceae-specific cluster bearing signs of transposable element-assisted evolution. *PLoS pathogens*, *10*(7), e1004223.
- Anderson, R. G., Deb, D., Fedkenheuer, K., & McDowell, J. M. (2015). Recent progress in RXLR effector research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *28*(10), 1063-1072.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*, *436*(7054), 1103-1106.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research*, *21*(3), 381-395.
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in plant science*, *9*, 628.
- Beakes, G. W., Glockling, S. L., & Sekimoto, S. (2012). The evolutionary phylogeny of the oomycete "fungi". *Protoplasma*, *249*(1), 3-19.
- Bi, Y., Chen, W., Zhang, W., Zhou, Q., Yun, L., & Xing, D. (2009). Production of reactive oxygen species, impairment of photosynthetic function and dynamic changes in mitochondria are early events in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Biology of the Cell*, *101*(11), 629-643.
- Birch, P. R., Boevink, P. C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., & Whisson, S. C. (2008). Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current opinion in plant biology*, *11*(4), 373-379.
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Banfield, M. J., & Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current opinion in plant biology*, *15*(4), 483-492.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E. E. (2006). Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *Journal of molecular evolution*, *62*(4), 388-420.
- Chen, H., Shu, H., Wang, L., Zhang, F., Li, X., et al. (2018). *Phytophthora* methylomes are modulated by 6mA methyltransferases and associated with adaptive genome regions. *Genome biology*, *19*(1), 1-16.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*(4), 803-814.
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, *341*(6147), 746-751.
- Daudi, A., & O'Brien, J. A. (2012). Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio-protocol*, *2*(18), e263-e263.
- Davis, B. M., Chao, M. C., & Waldor, M. K. (2013). Entering the era of bacterial epigenomics with single molecule real time DNA sequencing. *Current opinion in microbiology*, *16*(2), 192-198.
- Delcuve, G. P., Rastegar, M., & Davie, J. R. (2009). Epigenetic control. *Journal of cellular physiology*, *219*(2), 243-250.

- Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548 (2010).
- Erlendson, A. A., & Freitag, M. (2022). Not all Is SET for Methylation: Evolution of Eukaryotic Protein Methyltransferases. In *Histone Methyltransferases* (pP. 3-40). Humana, New York, NY.
- Ferrell Jr, J. E. (2012). Bistability, bifurcations, and Waddington's epigenetic landscape. *Current biology*, 22(11), R458-R466.
- Fouché, S., Plissonneau, C., & Croll, D. (2018). The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes. *Current opinion in microbiology*, 46, 34-42.
- Freitag, M. (2017). Histone methylation by SET domain proteins in fungi. *Annu Rev Microbiol*, 71(1), 413-439.
- Gacek-Matthews, A., Berger, H., Sasaki, T., Wittstein, K., Gruber, C., Lewis, Z. A., & Strauss, J. (2016). KdmB, a Jumonji histone H3 demethylase, regulates genome-wide H3K4 trimethylation and is required for normal induction of secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *PLoS genetics*, 12(8), e1006222.
- George, A. (2018). Simple and efficient method for functional RNA extraction from tropical medicinal plants rich in secondary metabolites. *Tropical Plant Res*, 5(1), 08-13.
- Gijzen, M., Ishmael, C., & Shrestha, S. D. (2014). Epigenetic control of effectors in plant pathogens. *Frontiers in plant science*, 5, 638.
- Gobena, D., Roig, J., Galmarini, C., Hulvey, J., & Lamour, K. (2012). Genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates from pepper and pumpkin in Argentina. *Mycologia*, 104(1), 102-107.
- Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M. A., & Rivero, A. (2012). Epigenetics of host–pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS pathogens*, 8(11), e1003007.
- Govrin, E. M., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology*, 10(13), 751-757.
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K., & Hausbeck, M. K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant disease*, 96(11), 1588-1600.
- Grünwald, N. J., Garbelotto, M., Goss, E. M., Heungens, K., & Prospero, S. (2012). Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. *Trends in microbiology*, 20(3), 131-138.
- Guccione, E., & Richard, S. (2019). The regulation, functions and clinical relevance of arginine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(10), 642-657.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., et al. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461(7262), 393-398.
- Hattori, N., & Ushijima, T. (2016). Epigenetic impact of infection on carcinogenesis: mechanisms and applications. *Genome medicine*, 8(1), 1-13.
- Hausbeck, M. K., & Lamour, K. H. (2004). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant disease*, 88(12), 1292-1303.

- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(2), 115-122.
- Hou, J., Feng, H. Q., Chang, H. W., Liu, Y., Li, G. H., Yang, S., *et al.* (2020). The H3K4 demethylase Jar1 orchestrates ROS production and expression of pathogenesis-related genes to facilitate *Botrytis cinerea* virulence. *New Phytologist*, 225(2), 930-947.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & molecular medicine*, 49(4), e324-e324.
- Iyer, L. M., Anantharaman, V., Wolf, M. Y., & Aravind, L. (2008). Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes. *International journal for parasitology*, 38(1), 1-31.
- Jamieson, K., Rountree, M. R., Lewis, Z. A., Stajich, J. E., & Selker, E. U. (2013). Regional control of histone H3 lysine 27 methylation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 6027-6032.
- Janevska, S., Güldener, U., Sulyok, M., Tudzynski, B., & Studt, L. (2018). Set1 and Kdm5 are antagonists for H3K4 methylation and regulators of the major conidiation-specific transcription factor gene ABA1 in *Fusarium fujikuroi*. *Environmental microbiology*, 20(9), 3343-3362.
- Jiang, R. H., & Tyler, B. M. (2012). Mechanisms and evolution of virulence in oomycetes. *Annual review of phytopathology*, 50, 295-318.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A. J., Morris, J. A., Zhang, R., Hedley, P. E., & Huitema, E. (2013). *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome biology*, 14(6), 1-18.
- Jurkowska, R. Z., & Jeltsch, A. (2016). Mechanisms and biological roles of DNA methyltransferases and DNA methylation: from past achievements to future challenges. *DNA Methyltransferases-Role and Function*, 1-17.
- Jwa, N. S., & Hwang, B. K. (2017). Convergent evolution of pathogen effectors toward reactive oxygen species signaling networks in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1687.
- Kamoun, S. (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell*, 2(2), 191-199.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J., *et al.* (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 16(4), 413-434.
- Kasuga, T., & Gijzen, M. (2013). Epigenetics and the evolution of virulence. *Trends in microbiology*, 21(11), 575-582.
- Kim, J. H., Jin, H. O., Park, J. A., Chang, Y. H., Hong, Y. J., & Lee, J. K. (2014). Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *Springerplus*, 3(1), 1-5.
- Kim, J., Park, S., Kwon, S., Lee, E. J., & Lee, J. S. (2021). Set1-mediated H3K4 methylation is required for *Candida albicans* virulence by regulating intracellular level of reactive oxygen species. *Virulence*, 12(1), 2648-2658.

- Klose, R. J., Kallin, E. M., & Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews genetics*, 7(9), 715-727.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705.
- Krasnow, C. S., Hammerschmidt, R., & Hausbeck, M. K. (2017). Characteristics of resistance to *Phytophthora* root and crown rot in *Cucurbita pepo*. *Plant disease*, 101(5), 659-665.
- Kumar, V., Thakur, J. K., & Prasad, M. (2021). Histone acetylation dynamics regulating plant development and stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(10), 4467-4486.
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., *et al.* (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1350-1360. (b)
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular plant pathology*, 13(4), 329-337. (a)
- Landeo Villanueva, S., Malvestiti, M. C., van Ieperen, W., Joosten, M. H., & van Kan, J. A. (2021). Red light imaging for programmed cell death visualization and quantification in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 22(3), 361-372.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P. J., & Govers, F. (2003). Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in microbiology*, 11(10), 462-469.
- Lee, D., Lal, N. K., Lin, Z. J. D., Ma, S., Liu, J., Castro, B., Lee, D., Lal, NK., Lin ZD., Ma. S., Liu, J., Castro, B., Toruno, T., Dinesh-Kumar, SP., & Coaker, G. (2020). Regulation of reactive oxygen species during plant immunity through phosphorylation and ubiquitination of RBOHD. *Nature communications*, 11(1), 1-16.
- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, 12: 401-408
- Li, Q., Ai, G., Shen, D., Zou, F., Wang, J., Bai, T., *et al.* (2019). A *Phytophthora capsici* effector targets ACD11 binding partners that regulate ROS-mediated defense response in Arabidopsis. *Molecular plant*, 12(4), 565-581.
- Liu, C. L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S. L., Friedman, N., & Rando, O. J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS biology*, 3(10), e328.
- Liu, Y., Liu, N., Yin, Y., Chen, Y., Jiang, J., & Ma, Z. (2015). Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum*. *Environmental microbiology*, 17(11), 4615-4630.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(11), 838-849.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38.

- Moreira-Morrillo, A. A., Monteros-Altamirano, Á., Reis, A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). *Phytophthora capsici* on *Capsicum* Plants: A Destructive Pathogen in Chili and Pepper Crops.
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of experimental botany*, 64(13), 3983-3998.
- Muthuswamy, A., Kakkattil Balakrishnan, V., Palaniyandi, U., & Chandran, M. V. (2018). Pathogenic variability in *Phytophthora capsici* from black pepper (*Piper nigrum* L.) as revealed by transcriptome analysis. *Indian Phytopathology*, 71(4), 495-503.
- Naveed, Z. A., Wei, X., Chen, J., Mubeen, H., & Ali, G. S. (2020). The PTI to ETI continuum in *Phytophthora*-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*, 11, 593905.
- Nwasike, C., Ewert, S., Jovanovic, S., Haider, S., & Mujtaba, S. (2016). SET domain-mediated lysine methylation in lower organisms regulates growth and transcription in hosts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1376(1), 18-28.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E.S.; Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548-6553.
- Pham, K. T. M., Inoue, Y., Vu, B. V., Nguyen, H. H., Nakayashiki, T., Ikeda, K. I., & Nakayashiki, H. (2015). MoSET1 (histone H3K4 methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. *PLoS genetics*, 11(7), e1005385.
- Pons-Hernández, J. L., Guerrero-Aguilar, B. Z., González-Chavira, M. M., González-Pérez, E., Villalobos-Reyes, S., & Muñoz-Sánchez, C. I. (2020). Variabilidad fenotípica de aislados de *Phytophthora capsici* en Guanajuato. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(8), 1891-1901.
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10), 1057-1068.
- Qian, C., & Zhou, M. M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 63(23), 2755-2763.
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2009). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and soil*, 321(1), 341-361.
- Rojas-Rojas, F. U., & Vega-Arreguín, J. C. (2021). Epigenetic insight into regulatory role of chromatin covalent modifications in lifecycle and virulence of *Phytophthora*. *Environmental Microbiology Reports*, 13(4), 445-457.
- Rolfe, S. A., & Scholes, J. D. (2010). Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*, 247(3), 163-175.
- Rothbart, S. B., & Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(8), 627-643.
- Schmidt, M. I., Duncan, B. B., e Silva, G. A., Menezes, A. M., Monteiro, C. A., Barreto, S. M., et al. (2011). Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The lancet*, 377(9781), 1949-1961.

- Scott, P., Bader, M. K. F., Burgess, T., Hardy, G., & Williams, N. (2019). Global biogeography and invasion risk of the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Environmental Science & Policy*, 101, 175-182.
- Shlezinger, N., Minz, A., Gur, Y., Hatam, I., Dagdas, Y. F., Talbot, N. J., & Sharon, A. (2011). Anti-apoptotic machinery protects the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* from host-induced apoptotic-like cell death during plant infection. *PLoS pathogens*, 7(8), e1002185.
- Soyer, J. L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., *et al.* (2014). Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS genetics*, 10(3), e1004227.
- Studt, L., Janevska, S., Arndt, B., Boedi, S., Sulyok, M., Humpf, H. U., *et al.* (2017). Lack of the COMPASS component Ccl1 reduces H3K4 trimethylation levels and affects transcription of secondary metabolite genes in two plant-pathogenic *Fusarium* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 2144.
- Thines, M. (2018). Oomycetes. *Current Biology*, 28(15), R812-R813.
- Thines, M., & Kamoun, S. (2010). Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 427-433.
- Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., & Singh, B. K. (2021). Author Correction: Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 72-72.
- Tyler, B. M. (2007). *Phytophthora* sojae: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular plant pathology*, 8(1), 1-8.
- Tzelepis, G., Hodén, K. P., Fogelqvist, J., Åsman, A. K., Vetukuri, R. R., & Dixelius, C. (2020). Dominance of Mating Type A1 and Indication of Epigenetic Effects During Early Stages of Mating in *Phytophthora infestans*. *Frontiers in microbiology*, 11, 252.
- Vega-Arreguín, J. C., Jalloh, A., Bos, J. I., & Moffett, P. (2014). Recognition of an *Avr3a1* homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 770-780.
- Vega-Arreguín, J. C., Shimada-Beltrán, H., Sevillano-Serrano, J., & Moffett, P. (2017). Non-host plant resistance against *Phytophthora capsici* is mediated in part by members of the I2 R gene family in *Nicotiana* spp. *Frontiers in plant science*, 8, 205.
- Vetukuri, R. R., Avrova, A. O., GRENVILLE-BRIGGS, L. J., Van West, P., Söderbom, F., Savenkov, E. I., *et al.* (2011). Evidence for involvement of Dicer-like, Argonaute and histone deacetylase proteins in gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Molecular plant pathology*, 12(8), 772-785.
- Waddington, C. H. (2014). *The strategy of the genes*. Routledge.
- Wang, L., Chen, H., Li, J., Shu, H., Zhang, X., Wang, Y., *et al.* (2020). Effector gene silencing mediated by histone methylation underpins host adaptation in an oomycete plant pathogen. *Nucleic Acids Research*, 48(4), 1790-1799. (b)
- Wang, X. W., Guo, L. Y., Han, M., & Shan, K. (2016). Diversity, evolution and expression profiles of histone acetyltransferases and deacetylases in oomycetes. *BMC genomics*, 17(1), 1-14.

Wang, X. W., Lv, J. L., Shi, Y. R., & Guo, L. Y. (2020). Comparative transcriptome analysis revealed genes regulated by histone acetylation and genes related to sex hormone biosynthesis in *Phytophthora infestans*. *Frontiers in genetics*, 11, 508. (a)

Wen, L. (2013). Cell death in plant immune response to necrotrophs. *J Plant Biochem Physiol*, 1, 1-3.

Wu, E. J., Wang, Y. P., Yahuza, L., He, M. H., Sun, D. L., Huang, Y. M., *et al.* (2020). Rapid adaptation of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* to changing temperature. *Evolutionary applications*, 13(4), 768-780.

Yoshida, K., Schuenemann, V. J., Cano, L. M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., *et al.* (2013). The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *elife*, 2, e00731.

Zhang, J., & Zhou, J. M. (2010). Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Molecular plant*, 3(5), 783-793.

Zhang, S., Li, C., Si, J., Han, Z., & Chen, D. (2022). Action mechanisms of effectors in plant-pathogen interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6758.

Zhao, W., Wang, T., Liu, S., Chen, Q., & Qi, R. (2015). The histone acetyltransferase PsGcn5 mediates oxidative stress responses and is required for full virulence of *Phytophthora sojae*. *Microbial pathogenesis*, 87, 51-58.