



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**UNIDAD LEÓN**

**Estudio de la virulencia de *Phytophthora capsici* en cuatro interacciones planta-patógeno y la expresión de genes efectores, metilasas y desmetilasas de histonas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Licenciado en Ciencias Agrogenómicas**

**P R E S E N T A:**

**Rodrigo Muñoz Javier**

**TUTORES:**

**Dr. Julio César Vega Arreguín**

**Dr. Fernando Uriel Rojas Rojas**



León, Guanajuato

2023



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 la memoria de mi hermano Félix, y de mis amigos Normita y Miguelin.

## **Agradecimientos**

A la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León por proveerme las herramientas y recursos necesarios para mi formación académica en la carrera de Ciencias Agrogenómicas. Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas a su acervo de conocimiento, y porque en ella pude desarrollarme y crecer tanto en el ámbito académico cómo en lo personal.

Al programa de becas de titulación para proyectos de investigación para la UNAM 2022-2023, por apoyarme en la realización de este proyecto de tesis.

A mis padres Blanca Javier y Sotero Muñoz por darme la vida, y por todo su apoyo. Por enseñarme valiosos principios, por el cariño y esfuerzo que han demostrado toda la vida.

A mis hermanxs Félix, Juan, Chayito, Chochil y Abelito por ser parte de mi vida, de quienes espero que logren aquello que los haga felices y vean en mí un soporte en sus proyectos.

A mis padrinos Emmanuel Domínguez y Judith Martínez por su invaluable apoyo desde mis primeros años educativos.

A la bióloga Mercedes Serrano Coronado por ser una gran profesora y mentora, quien me inspiró el interés y pasión por la biología durante el bachillerato.

Agradezco especialmente al Dr. Julio C. Vega Arreguín por su tutoría y por aceptarme en su grupo de investigación donde tuve la oportunidad de aprender mucho de su equipo para llevar a cabo el presente proyecto de tesis.

Al Dr. Fernando Uriel Rojas Rojas por su valiosa tutoría y acompañamiento durante todo el proceso de realización del presente trabajo, agradezco porque más que un tutor ha sido un mentor que me da consejos y comparte su experiencia .

A la Dra. Cinthia V. Soberanes Gutiérrez por enseñarme a realizar algunos experimentos que llevé a cabo. También agradezco a la Sra. Tere por su apoyo en proporcionar el material necesario para los experimentos realizados.

A Monse potaxie y Moni por compartir conmigo un año de trabajo de investigación, agradezco su compañía y apoyo durante los experimentos de tesis, les deseo mucho éxito en todo lo que se propongan. Y a Jacobo por sus consejos que fueron muy útiles durante el proceso de establecimiento de los experimentos.

A mi amigx Pancho y su familia por alojarme cálidamente cuando llegué a León.

A Ulises Uriel Díaz Maldonado por su compañía, por compartir conmigo su tiempo y su visión de la vida.

A mis amigxs de fitotecnia Rosalía, Dulce, Gerardo, Manuel, Priscila, Nidia, Alex y Rigo por estar en los buenos y malos momentos, y por hacer más llevadera la vida universitaria.

A mis amigxs Elsa, Alice y Eddy por ser la familia clavata con la que compartí memorables aventuras y de quienes he aprendido mucho sobre la vida y la familia, los quiero mucho.

A mis amigxs agrogenómicos Paula, Paola, Brendin, Aarón Jaime, Abel y Gema por su valiosa amistad, por todo el apoyo que me han brindado en lo académico y en lo emocional, que valoro mucho.

A los profesorxs miembros del comité sinodal Dra. Harumi Shimada, Dr. Julio Amezcua, Dra. Alejandra Rougon y Dra. Kalpana por sus valiosas revisiones y comentarios que contribuyeron a la mejora de este documento de tesis.

A todas las personas que no menciono explícitamente aquí pero que han estado en mi vida y me han enseñado muchas cosas que me han hecho llegar hasta aquí (profesores, conocidos, familiares y amigos).

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Abreviaturas .....	4
Resumen.....	5
<b>1</b> <b>Introducción</b> .....	6
<b>2</b> <b>Planteamiento del problema</b> .....	10
<b>3</b> <b>Justificación</b> .....	11
<b>4</b> <b>Hipótesis</b> .....	13
<b>5</b> <b>Objetivos</b> .....	13
5.1    Objetivo general.....	13
5.2    Objetivos específicos .....	13
<b>6</b> <b>Marco teórico</b> .....	14
6.1    El fitopatógeno y la enfermedad.....	14
6.1.1    Ciclo y estructuras de infección.....	14
6.1.2    Rango de hospederos.....	15
6.2    La patogenicidad y la virulencia.....	15
6.3    Los mecanismos moleculares de la enfermedad por <i>P. capsici</i> .....	16
6.3.1    El papel de los efectores en el desarrollo de la enfermedad.....	16
6.3.2    Efectores de avirulencia .....	16
6.4    La interacción planta-patógeno .....	17
6.4.1    La compatibilidad en las interacciones planta-patógeno.....	17
6.5    El sistema inmune de la planta .....	18
6.5.1    Inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos .....	18
6.5.2    Inmunidad activada por efectores .....	18
6.5.3    La interdependencia de las vías de inmunidad PTI-ETI.....	19
6.5.4    Susceptibilidad activada por efectores.....	19
6.6    Genética de la resistencia a la enfermedad .....	20
6.6.2    La resistencia cualitativa .....	20
6.6.3    La resistencia cuantitativa .....	20
6.7    Evasión de la inmunidad del hospedero .....	21
6.7.1    Mecanismos moleculares en la evasión de la inmunidad .....	21
6.8    Modificaciones epigenéticas en la adaptación al hospedero.....	21
6.9    Información de los hospederos de estudio .....	22

<b>7</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	24
7.1	Crecimiento de plantas y material vegetal.....	24
7.2	Ensayos de infección .....	24
7.2.1	Inoculación con zoosporas en hojas desprendidas .....	24
7.2.3	Inoculación con discos de micelio en hojas desprendidas.....	25
7.2.3	Inoculación de raíz en plantas completas.....	25
7.3	Tinciones histológicas.....	26
7.3.1	Tinción con DAB .....	26
7.3.2	Tinción con azul de tripano .....	26
7.4	Observaciones macroscópicas.....	27
7.5	Evaluación de morfología de colonia.....	27
7.6	Extracciones de RNA del tejido de interacción planta- <i>P. capsici</i> .....	28
7.6.1	Extracción de RNA con TRizoI™ .....	28
7.6.2	Extracción de RNA con el kit “Quick-RNA plant miniprep kit” .....	29
7.6.3	Combinación de protocolos extracción de RNA .....	30
7.7	Retrotranscripción, PCR y qPCR .....	30
7.8	Análisis de secuencias de genes efectores homólogos.....	31
7.9	Ensayos de expresión transitoria del efector Avr3a1 en plantas .....	32
7.10	Obtención de imágenes y datos de virulencia .....	33
7.11	Normalización de datos de expresión relativa de genes.....	33
7.12	Análisis de datos.....	34
<b>8</b>	<b>Resultados</b> .....	36
8.1	Comparación de la virulencia de <i>P. capsici</i> entre cuatro interacciones planta-patógeno. .....	36
8.2	Los cambios en la morfología de colonia de <i>P. capsici</i> y la producción de zoosporas difieren en la interacción.....	39
8.3	Diferencias detectadas en la respuesta a la infección por <i>P. capsici</i> entre distintas interacciones planta-patógeno .....	41
8.4	Los niveles de expresión relativa de genes efectores Avr están regulados diferencialmente entre las interacciones planta- <i>P. capsici</i> .....	43
8.5	El nivel de respuesta a la expresión del efector Avr3a1 de <i>P. capsici</i> supone diferente respuesta inmunitaria en dos especies solanáceas.....	46
8.6	Las interacciones planta-patógeno modulan los niveles de expresión de una metilasa y una desmetilasa de histonas .....	48

<b>9</b>	<b>Discusión</b> .....	50
<b>10</b>	<b>Conclusiones</b> .....	60
<b>11</b>	<b>Referencias</b> .....	62
<b>12</b>	<b>Material suplementario</b> .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Evaluación fenotípica de la reacción a la inoculación de <i>P. capsici</i> en raíz en diferentes especies.....	37
<b>Figura 2.</b>	Progresión de la infección ocasionada por <i>P. capsici</i> en hojas.....	38
<b>Figura 3.</b>	Ensayos de morfología de colonia in vitro.....	40
<b>Figura 4.</b>	Observaciones macroscópicas de la respuesta a la infección en hojas de diferentes plantas.....	42
<b>Figura 5.</b>	Niveles de expresión de genes efectores Avr de <i>P. capsici</i> a las 48 hpi.....	43
<b>Figura 6.</b>	Niveles de expresión de genes efectores Avr de <i>P. capsici</i> a las 72 hpi.....	44
<b>Figura 7.</b>	Análisis comparativo de las secuencias de genes efectores Avh y Avr de <i>P. infestans</i> , <i>P. sojae</i> y <i>P. capsici</i> con actividad de avirulencia conocida.....	46
<b>Figura 8.</b>	Respuesta hipersensible por la expresión de INF1 y Avr3a1 en las solanáceas silvestres <i>S. americanum</i> y <i>P. angulata</i> .....	47
<b>Figura 9.</b>	Niveles de expresión de SMYD3 y JmJC6021 de <i>P. capsici</i> en cuatro interacciones diferentes.....	49
<b>Figura 10.</b>	Modelos de los principales mecanismos para la resistencia y susceptibilidad en la interacción planta-patógeno.....	58
<b>Figura 11.</b>	Comparación de la interacción planta- <i>P. capsici</i> .....	77
<b>Figura 12.</b>	Electroforesis de RNA en gel de Agarosa.....	78
<b>Figura 13.</b>	Electroforesis en gel de agarosa de las PCR de las muestras de cDNA.....	79

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Oligonucleótidos utilizados para determinar los niveles de expresión relativa de efectores Avr.....	31
<b>Cuadro 2.</b>	Oligonucleótidos usados para determinar los niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021.....	31
<b>Cuadro 3.</b>	Especies de plantas utilizadas en este estudio.....	36
<b>Cuadro 4.</b>	Secuencias de nucleótidos de los genes efectores Avr de este estudio.....	80
<b>Cuadro 5.</b>	Secuencias de nucleótidos de SMYD3 y JmJC6021.....	81

## Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico	hpi	Horas postinoculación
RNA	Ácido ribonucleico	dpi	Días postinoculación
mRNA	RNA mensajero	UV	Ultravioleta
nt	Nucleótidos	s	Segundos
bp	Pares de bases	μL	Microlitros
GC %	Porcentaje de Guanina Citosina	L	Litros
cDNA	DNA complementario	μM	Micromolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	M	Molar
RT	Retrotranscripción	g	Gramos
qPCR	PCR cuantitativa	mg	Miligramos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos	ng	nanogramos
PRR	Receptores de reconocimiento de PAMP	mL	Mililitros
PTI	Inmunidad activada por PAMP	×g	Gravedades fuerza centrífuga
NLR	Receptores de tipo NOD	Ct	Cycle treshold
ETI	Inmunidad activada por efectores	EV	Vector vacío
ETS	Susceptibilidad activada por efectores	PCA	Análisis de Componentes Principales
Avr	Avirulencia	F	Forward
Avh	Homólogos de avirulencia	R	Reverse
EF	Factor de elongación	v	Volumen
HR	Respuesta hipersensible	min	Minutos
ROS	Especies reactivas de oxígeno	nt	Nucleótidos
DAP	Diaminobenzidina	Tm	Temperatura de alineamiento
dH <sub>2</sub> O	Agua desionizada	Long.	Longitud

Las abreviaturas en este trabajo se definieron por sus siglas en inglés, a menos que se indique lo contrario.

## Resumen

La interacción planta-patógeno involucra una lucha entre los mecanismos moleculares de la virulencia del patógeno y la respuesta de defensa de la planta. La enfermedad se produce cuando el patógeno vence el sistema inmunológico de la planta para establecerse con éxito. En la interacción de *Phytophthora capsici* con plantas silvestres relacionadas con los cultivos modernos se establecen procesos poco estudiados. Estas interacciones resultan útiles para investigar la regulación de los mecanismos moleculares de la virulencia del patógeno y la resistencia genética de las plantas. En este estudio, evaluamos la patogenicidad de *P. capsici* y la respuesta a la infección en *Solanum americanum*, *Vigna unguiculata*, *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum* y *Physalis angulata*. Asimismo, determinamos los niveles de expresión relativa de Avr3a1, Avr1 y Avr1b, tres genes efectores de tipo Avr de *P. capsici*, así como, de SMYD3 una metilasa y JmJC6021 una desmetilasa de colas de histonas. También, evaluamos la activación de la respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1 en *S. americanum* y *P. angulata*. Nuestros resultados muestran que en las distintas interacciones planta-patógeno se regula diferencialmente la expresión de los efectores Avr y la metilasa y desmetilasa de histonas, dependiente del tiempo transcurrido en la interacción. Esto podría suceder como resultado de los esfuerzos del patógeno para sobrevivir y completar el ciclo de infección. Además, encontramos que en los genotipos *S. americanum* y *C. annuum* se establecen interacciones compatibles, mientras que en *V. unguiculata* y *P. angulata* se establecen interacciones parcialmente incompatibles con dicho patógeno. Este estudio sobre el espectro de resistencia a susceptibilidad en los genotipos de plantas puede ayudarnos a comprender los mecanismos que usa *P. capsici* para adaptarse a los hospederos.

# 1 Introducción

La interacción planta-patógeno es un escenario de lucha constante entre los mecanismos de defensa del hospedero y las estrategias de virulencia especializadas de los fitopatógenos (Jones y Dangl, 2006; Jupe *et al.*, 2013). Las plantas poseen un sistema de defensa complejo para responder al ataque de patógenos, compuesto por PTI, que es la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), y la inmunidad activada por efectores conocida como ETI, que emplea receptores inmunes que reconocen efectores de los patógenos (Jones y Dangl, 2006; Spoel y Dong, 2012; J. M. Zhou y Zhang, 2020; Song *et al.*, 2021). Los patógenos por su parte secretan proteínas efectoras como factores de virulencia esenciales para desencadenar el desarrollo de la enfermedad y contrarrestar la inmunidad de las plantas (Whisson *et al.*, 2007; Qutob *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). Así, el desarrollo de la enfermedad ocurre cuando los patógenos derrotan el sistema de defensa de la planta (Dong y Ma, 2021). Por consiguiente, tanto el patógeno como el hospedero mantienen una estricta regulación transcripcional de su maquinaria genética que impulsa lo que se conoce como carrera armamentista patógeno-hospedero (Jupe *et al.*, 2013; Dong y Ma, 2021).

*P. capsici* es uno de los oomicetos fitopatógenos que más daños causa en los cultivos de importancia agroalimentaria, por su amplio rango de hospedantes y su expansión a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012). Desde su identificación en Nuevo México, Estados Unidos, *P. capsici* se ha propagado por todas las regiones agrícolas a nivel global, pues una vez que se instala en los campos se vuelve difícil controlarlo y erradicarlo (Kamoun *et al.*, 2015; Barchenger *et al.*, 2018). Su rango de hospederos va desde los más comunes que pueden ser las solanáceas como el chile y el jitomate o las cucurbitáceas como la calabaza, el pepino, melón, entre otros (Lamour *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2018). En dichos hospederos *P. capsici* afecta distintas partes de la planta como raíces, tallos, hojas y frutos, y el rango de hospederos se expande a una gran variedad de plantas de diferentes familias botánicas (Lamour *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2018; Saltos *et al.*, 2021). Este oomiceto también presenta un rápido desarrollo de la enfermedad y un ciclo de vida hemibiotrófico, cuya incidencia e impactos negativos en los cultivos va en aumento (Lamour *et al.*, 2012; Kamoun *et al.*, 2015; Barchenger *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2018).

De los estudios anteriores se sabe que debido a que presenta una rápida adaptación a los fungicidas, cambios ambientales y a nuevos hospederos, esto dificulta su control (Hausbeck y Lamour, 2007; Lamour *et al.*, 2012). Con la disponibilidad de las secuencias genómicas en *P. capsici* se han estudiado los genes efectores individuales para descifrar su función en la virulencia (Fan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2021). Además, los datos transcriptómicos publicados de *P. capsici* también han aclarado el estudio de la regulación transcripcional de la infección en los hospederos para mantener su ciclo de vida (Jupe *et al.*, 2013). Algunos aspectos estudiados en el desarrollo de la infección han mostrado que el patógeno modula su actividad de virulencia para adaptarse a sus hospederos haciendo uso de su maquinaria molecular y plasticidad (Lamour *et al.*, 2012; Jupe *et al.*, 2013; Dunn y Smart, 2015; Barchenger *et al.*, 2018). De acuerdo con Gómez-Díaz *et al.*, (2012), las interacciones planta-patógeno se encuentran entre los sistemas más dinámicos y con mayor plasticidad, lo cual, está estrechamente relacionado con la supervivencia y transmisión. Como se plantea en el modelo “zig-zag” del desarrollo de la enfermedad, la resistencia y susceptibilidad de los hospederos son dos factores fundamentales que determinan el éxito y la patogenicidad de *P. capsici* (Jones y Dangl, 2006; Dong y Ma, 2021).

Un enfoque reciente, al menos en lo referente al estudio de los mecanismos moleculares de la interacción planta-*Phytophthora*, es la regulación epigenética (Dong y Ma, 2021). En algunos estudios se han reportado relaciones entre algunas marcas epigenéticas y la expresión de genes relacionados con la patogénesis o la regulación de la virulencia durante la infección en microorganismos filamentosos. Lo cual indica que la regulación epigenética puede ser un mecanismo que explique el éxito de los patógenos en el desarrollo de las enfermedades ya que son capaces de contrarrestar y escapar a la inmunidad del hospedero (Gómez-Díaz *et al.*, 2012; Dubey y Jeon, 2017). Por ejemplo, la metilación en la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3), que se ha estudiado en diversos patógenos como *Colletotrichum higginsianum*, *Botrytis cinerea*, *Magnaporthe oryzae* y *Fusarium fujikuroi*, se relaciona con la actividad de virulencia y patogenicidad durante la infección del hospedero, además de regular el desarrollo y la sobrevivencia del organismo (Janevska *et al.*, 2018; Dallery *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2020).

Actualmente, hay pocos estudios que aclaren el papel que juega la regulación epigenética en la virulencia de *Phytophthora* y en su adaptación a diferentes hospederos y a cambios ambientales. Específicamente, solo hay dos informes de un mismo grupo de investigación en *P. sojae* sobre cambios transcripcionales de efectores regulados por una marca epigenética de metilación de colas de histonas (Wang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2023). Estos datos presentados por Wang *et al.* (2020) y Chen *et al.*, (2023) sustentan la hipótesis de que la regulación transcripcional de los factores de virulencia de *Phytophthora* puede estar correlacionada con el estado de metilación de las colas de histonas, lo cual resalta la variación epigenética de la cromatina como un mecanismo que regula la expresión de efectores. En una revisión reciente acerca de la función de las modificaciones epigenéticas en el ciclo de vida y en la virulencia de los oomicetos del género *Phytophthora* se destaca la falta de estudios de aspectos epigenéticos en *P. capsici*, puesto que, la información referente a este tema se centra solamente en *P. infestans* y *P. sojae* (Rojas-Rojas y Vega-Arreguín, 2021).

A pesar de los esfuerzos por dilucidar los mecanismos involucrados en la patogenicidad de *P. capsici* (Vega-Arreguín *et al.*, 2017), estos no se han descrito completamente y sus interacciones con algunos hospederos no están caracterizadas. Por ello, en este estudio caracterizamos la patogenicidad y adaptación del fitopatógeno cuando se enfrenta con cuatro especies de plantas no estudiadas como hospederos de forma convencional (*S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*). Para esto se realizaron evaluaciones fenotípicas mediante ensayos de patogenicidad, observaciones macro y microscópicas, además de tinciones histológicas para detectar las diferencias en la respuesta a infección por *P. capsici* entre las distintas interacciones planta-patógeno. Se detectaron cambios en la morfología de la colonia micelial y en la producción de zoosporas, además, se encontró que la respuesta de la planta a la infección es dependiente del tipo de interacción. Determinamos los niveles de expresión relativa de Avr3a1, Avr1 y Avr1b, genes efectores de tipo Avr de *P. capsici*, así como, de SMYD3 una metilasa y JmJC6021, una desmetilasa de cola de histonas. Así mismo, evaluamos la activación de la respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1 en *S. americanum* y *P. angulata*, destacando el resultado de que *S. americanum* responde a la expresión del efector, pero no *P. angulata*, lo que supone diferente respuesta inmunitaria.

Los datos obtenidos muestran que las distintas interacciones planta-patógeno modulan diferencialmente la regulación de la expresión de los efectores Avr y de las metilasa y desmetilasa de histonas, dependiente del tiempo del transcurso de la interacción. Además, informamos sobre los genotipos de *S. americanum* y *C. annuum* como interacciones compatibles, diferentes a *V. unguiculata* y *P. angulata* que son parcialmente incompatibles.

También, se constató que la variación en la regulación del estilo de vida de *P. capsici* está en función del ambiente que establece con cada hospedero, lo que impulsa la adaptación del patógeno y posiblemente la expansión del rango de hospederos. Queda por examinar la relación de la marca epigenética H3K4me3 sobre la regulación de la virulencia y de la adaptación de *P. capsici* D3 cuando infecta plantas que no se reconocen como hospederos preferidos. Esta marca se ha relacionado con la regulación de la virulencia en diferentes microorganismos fitopatógenos, pero aquí solo determinamos los niveles de expresión relativa. Por último, se sabe poco sobre las interacciones de *P. capsici* con las plantas examinadas en este trabajo, por lo que con los resultados obtenidos se generan nuevas preguntas sobre si podemos aprovechar el espectro de resistencia y la variación natural de las plantas no hospederas para descifrar los mecanismos que hacen funcionar la resistencia genética a *P. capsici*.

## 2 Planteamiento del problema

A pesar de los esfuerzos por dilucidar los mecanismos relacionados con la virulencia de *P. capsici* (Vega-Arreguín *et al.*, 2017), no se han descrito completamente o no están caracterizadas sus interacciones con algunas plantas hospedadas y no hospedadas. Además, se conoce poco acerca de las interacciones de *P. capsici* con *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*. Hasta ahora, no se han descrito las respuestas a la infección de estas cuatro especies de plantas, tampoco se ha explorado la actividad de genes efectores Avr ni los niveles de transcripción o cómo se regulan los genes en el transcurso de la infección. Así mismo, las modificaciones epigenéticas y el papel que éstas juegan en la autorregulación del patógeno para adaptarse al ambiente y sobrevivir han sido mucho menos estudiadas. Por la evidencia existente, sabemos que los efectores tienen la capacidad de alterar procesos vitales de las plantas y que la regulación epigenética se superpone principalmente a los efectores, por lo que, definimos estos dos aspectos como cruciales para comprender las interacciones planta-patógeno.

### 3 Justificación

El desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici* impone grandes pérdidas en rendimiento y calidad en los cultivos agrícolas de gran importancia (Lamour *et al.*, 2012). Este microorganismo presenta un amplio rango de hospederos, alto grado de incidencia y se ha diseminado ampliamente en las regiones productoras agroalimentarias a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012; Kamoun *et al.*, 2015; Barchenger *et al.*, 2018). A causa del gran impacto económico que implican las enfermedades por *P. capsici* en sus hospederos de cultivo, resulta relevante comprender la naturaleza de éste patógeno (Jupe *et al.*, 2013), puesto que está catalogado como el quinto fitopatógeno de mayor importancia para la fitopatología molecular global (Kamoun *et al.*, 2015).

La creciente evidencia ha mostrado que los efectores son los actores principales en el desarrollo de la enfermedad causada por *P. capsici*, ya que son necesarios para la colonización y la infección de sus hospederos (Jones y Dangl, 2006; Białas *et al.*, 2018; Ngou *et al.*, 2021). A pesar de que los genes efectores son los más estudiados, existe una amplia lista de los cuales no se conoce su función precisa ni el papel que juegan en modular la respuesta de defensa de las plantas para tener éxito y establecer la enfermedad (Maillot *et al.*, 2022). Pese a la disponibilidad de muchas secuencias genómicas de *P. capsici* no se han logrado estudiar, de manera extensiva, los genes involucrados en la infección (Lamour, Mudge, *et al.*, 2012; Jupe *et al.*, 2013; Reyes-Tena *et al.*, 2019). De esto se sabe menos en no hospederos o en las interacciones incompatibles (Vega-Arreguín *et al.*, 2017). Muchos estudios se han centrado en identificar efectores implicados en la virulencia, en cambio otros estudios se enfocan en encontrar efectores con actividad de avirulencia.

Por otra parte, existen pocos estudios que aclaren el papel que juega la regulación epigenética de la virulencia de *Phytophthora* en la adaptación a diferentes hospederos y cambios ambientales (Li *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020; Rojas-Rojas y Vega-Arreguín, 2021; Chen *et al.*, 2023). Asimismo, existen solo dos estudios sobre los cambios transcripcionales que presentan efectores regulados por marcas epigenéticas de metilación de histonas, H3K27me3 y H3K6me9, en *P. sojae* (Wang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2023). Por lo tanto, resulta de interés estudiar la epigenética de *P. capsici*, un

patógeno que infecta muchas especies de plantas, se adapta rápidamente a los fungicidas, a cambios ambientales y a nuevos hospederos. Algunos estudios de genómica comparativa han informado que *P. capsici* no posee genes que codifiquen para metiltransferasas de DNA, pero si para metilasas y desmetilasas de histonas (Wang *et al.*, 2016), por ello, en este estudio se ha elegido la marca epigenética H3K4me3 porque existe evidencia de su regulación en otros organismos patógenos filamentosos y en el genoma de *P. capsici* se encuentran presentes genes de enzimas relacionadas con dicha marca.

En la interacción de *P. capsici* con plantas silvestres relacionadas con los cultivos modernos en ocasiones se establecen patosistemas poco estudiados, que no están descritos o no están caracterizados. Los distintos hospederos constituyen distintos ambientes a los que el patógeno se tiene que adaptar para completar su ciclo de vida. Estos procesos de adaptación a los ambientes restrictivos son potencialmente útiles para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de los factores de virulencia (efectores) y la regulación epigenética en el patógeno. Así como, las posibles fuentes de resistencia genética en determinados genotipos de plantas.

Los estudios extensos sobre las interacciones planta-patógeno aportan conocimientos valiosos para la comprensión de las enfermedades de las plantas, y proveen las bases teóricas para implementar estrategias de manejo de las fuentes de transmisión de las enfermedades (Reis *et al.*, 2018) y con esto, proteger la salud vegetal y asegurar la producción de alimentos, objetivo principal que se persigue en los esfuerzos de investigación de los fitopatógenos.

## 4 Hipótesis

Las interacciones que se establecen entre *P. capsici* con diferentes genotipos de plantas no hospederas desencadena diferentes mecanismos de virulencia y alteran de manera diferencial la expresión de genes efectores y genes relacionados con la regulación epigenética por metilación en el patógeno.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Estudiar la virulencia del oomiceto fitopatógeno *P. capsici* en las plantas *S. americanum*, *C. annuum* var. *Glabriusculum*, *V. unguiculata* y *P. angulata*, así como, la relación de la virulencia con la regulación de la expresión de genes efectores y metilasas/desmetilasas de histonas.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar la virulencia de *P. capsici* en las plantas *S. americanum*, *C. annuum* var. *Glabriusculum*, *V. unguiculata* y *P. angulata*.
2. Evaluar la respuesta de defensa de las plantas *S. americanum*, *C. annuum* var. *Glabriusculum*, *V. unguiculata* y *P. angulata* posterior al establecimiento de la interacción con *P. capsici*.
3. Determinar los niveles de expresión de los genes efectores *Avr3a1*, *Avr1* y *Avr1b*, la metilasa *SMYD3* y la desmetilasa de histonas *JmJC6021* de *P. capsici* cuando se impone en *S. americanum*, *C. annuum* var. *Glabriusculum*, *V. unguiculata* y *P. angulata*.
4. Evaluar la respuesta de defensa PTI y ETI de las solanáceas silvestres *S. americanum* y *P. angulata* mediante la expresión transitoria de *INF1* y *Avr3a1*.

## 6 Marco teórico

### 6.1 El fitopatógeno y la enfermedad

*Phytophthora capsici* Leonian es un oomiceto fitopatógeno causante de enfermedades devastadoras en cultivos a nivel mundial (Lamour *et al.*, 2012; Barchenger *et al.*, 2018; Stajich *et al.*, 2021). La enfermedad consiste en pudrición de raíz y corona, necrosis del tallo, tizón de la hoja y pudrición en frutos, en una lista amplia de hospederos (Leonian 1922; Erwin y Ribeiro, 1996; Granke *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012). De acuerdo con Lamour *et al.* (2012), los síntomas de la enfermedad varían dependiendo del hospedero, la parte de la planta infectada y las condiciones ambientales. Su transmisión es por el suelo a través del riego o la lluvia (Erwin y Ribeiro, 1996; Barchenger *et al.*, 2018).

#### 6.1.1 Ciclo y estructuras de infección

*P. capsici* presenta un ciclo de infección hemibiotrófico, debido a que, al inicio del proceso de infección tiene una etapa biotrófica, en la que los síntomas de la enfermedad son visualmente imperceptibles (Lamour *et al.*, 2012; Jupe *et al.*, 2013), seguida de una etapa necrotrófica al final del desarrollo completo de la enfermedad, donde se puede ver necrosis o muerte del tejido vegetal infectado (Jupe *et al.*, 2013; Fawke *et al.*, 2015). La germinación de los esporangios es la fuente de transmisión de la enfermedad, ya sea mediante la formación de hifas o liberando zoosporas móviles que nadan hasta llegar a la superficie de la planta hospedera (Lamour *et al.*, 2012; Fawke *et al.*, 2015). En la biotrofia, tanto los esporangios que contienen las zoosporas como las zoosporas individuales son capaces de germinar en la superficie de la hoja, adhiriéndose por la formación del apresorio y penetrando en las células mediante la formación de haustorios (Fawke *et al.*, 2015). Posteriormente, en la necrotrfia cuando ocurre la colonización de las capas celulares internas, las células infectadas mueren y se produce la necrosis, a la que le sigue una producción de nuevos esporangios para un nuevo ciclo de infección (Lamour, *et al.*, 2012).

### 6.1.2 Rango de hospederos

Para *P. capsici* se ha reportado una lista extensa de hospederos a los que puede infectar, aunque inicialmente se describió el aislado de Chile por Leonian (1922). En diversos estudios, se ha informado que este patógeno puede enfermar a un rango amplio de hospederos en diversos ambientes: en condiciones de campo, en invernadero y en laboratorio (Erwin y Ribeiro, 1996; Hausbeck y Lamour, 2007; Granke *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012). Las especies de plantas de cultivo preferidas por *P. capsici* suelen ser solanáceas como pimiento, Chile, tomate y berenjena. Al igual que, cucurbitáceas como pepino, calabaza, melón y sandía, incluyendo fabáceas como el frijol ejotero y el frijol lima (Erwin y Ribeiro, 1996; French-Monar *et al.*, 2006; Hausbeck y Lamour, 2007; Tian y Babadoost, 2007; Granke *et al.*, 2012). Además de las familias botánicas Solanaceae, Cucurbitaceae y Fabaceae, ahora se sabe que *P. capsici* puede infectar muchas otras especies de plantas pertenecientes a más de 20 familias no relacionadas taxonómicamente (Erwin y Ribeiro, 1996; Granke *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012; Barchenger *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2018).

### 6.2 La patogenicidad y la virulencia

Por convención, en fitopatología se usa el término patogenicidad para referirse a una descripción cualitativa de la capacidad de un patógeno para ser un agente causal de enfermedad y la virulencia como una medida cuantitativa del grado de patogenicidad en un genotipo particular de plantas (D'Arcy, 2001; Sacristan *et al.*, 2021). La finalidad de los patógenos es causar enfermedad y a menudo se piensa que tiene que ver con el estilo de vida o la capacidad de los patógenos para obtener lo que necesitan para sobrevivir a toda costa. Su éxito se consolida con la capacidad para colonizar un hospedero y transmitirse a otros, y para maximizar la aptitud en la interacción con las plantas emplean algunas estrategias como las actividades de virulencia, según Sacristan *et al.* (2021). Los mismos autores plantean que las actividades de virulencia son cualquier cosa que juega a favor de los patógenos para desencadenar la infección y multiplicarse, consecuentemente ocasionando una enfermedad en el sentido cualitativo o cuantitativo.

### 6.3 Los mecanismos moleculares de la enfermedad por *P. capsici*

*P. capsici*, al igual que los microorganismos fitopatógenos oomicetos del género *Phytophthora*, poseen genes que codifican para proteínas y otras moléculas que son capaces de interferir con la actividad de defensa de las plantas (Kamoun, 2006; Hogenhout *et al.*, 2009) para cambiar el ambiente a su favor y así abrirse paso para colonizar el tejido vegetal .

#### 6.3.1 El papel de los efectores en el desarrollo de la enfermedad

Según la definición asociada a fitopatología, los efectores son una serie de proteínas que los patógenos producen y transfieren hacia las células de las plantas para favorecer la infección de determinadas especies de plantas compatibles (Kamoun, 2006). Estos efectores son capaces de alterar los procesos celulares de sus hospederos, ya que usualmente actúan al unirse o al modificar enzimáticamente las moléculas del hospedero (Petre *et al.*, 2021). Los efectores son conocidos como los factores principales de la actividad de virulencia en la interacción entre las plantas y sus patógenos (Wang *et al.*, 2019). Algunas moléculas ejercen su actividad efectora en el espacio extracelular, estos son llamados efectores apoplásticos porque interfieren con proteínas vegetales de la primera capa de defensa contra patógenos (Schornack *et al.*, 2009). Otro tipo de efectores de oomicetos se dirigen al interior de la célula hospedera, estos son los llamados efectores citoplásmicos y hay dos clases de ellos, los Crinkler (CRN) y los RxLR (Schornack *et al.*, 2009; Fawke *et al.*, 2015; Petre *et al.*, 2021).

#### 6.3.2 Efectores de avirulencia

Los efectores que activan la respuesta de defensa en algunas plantas hospederas, son los que se denominan efectores de “avirulencia” o Avr (Sperschneider *et al.*, 2015; Bialas *et al.*, 2018; Dong y Ma, 2021). Se les conoce como efectores Avr porque el sistema inmunitario de algunas plantas ha evolucionado para reconocerlos, y consecuentemente activar la ETI (Sperschneider *et al.*, 2015), que se manifiesta como una respuesta hipersensible (HR). De hecho, las actividades de avirulencia de los efectores de tipo Avr siempre están bajo una presión selectiva para evadir el reconocimiento por parte de los receptores inmunitarios mientras mantienen su papel de Avr en las interacciones planta-patógeno (Bozkurt *et al.*, 2012).

Dado que, la HR es una respuesta de defensa efectiva contra los patógenos. Según Schornack *et al.* (2009), los efectores de oomicetos caracterizados con actividades de avirulencia son efectores citoplásmicos de tipo RxLR, que pueden dirigirse al interior de la célula mediante los motivos de proteína RxLR-dEER (Tyler *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2008). Un aspecto que genera confusión con el termino Avr es que algunos de estos efectores también tienen funciones de virulencia en genotipos de plantas que son susceptibles a una cepa del patógeno porque no han evolucionado con receptores específicos para reconocerlos (Goss *et al.*, 2013).

#### 6.4 La interacción planta-patógeno

Las interacciones entre las plantas con sus patógenos, en principio son muy dinámicas, porque implican mecanismos de acción de los componentes moleculares del patógeno contra los componentes de la inmunidad de las plantas, y viceversa. Las plantas naturalmente poseen un sistema inmunológico para defenderse del ataque de los patógenos, y las enfermedades ocurren cuando los patógenos logran derrotar la inmunidad de la planta (Jones y Dangl, 2006; Dong y Ma, 2021).

##### 6.4.1 La compatibilidad en las interacciones planta-patógeno

El éxito en el desarrollo de la enfermedad por un patógeno está determinado, en parte, por la compatibilidad entre los componentes de virulencia y los componentes de inmunidad de las plantas (Jones y Dangl, 2006), lo que da como resultado interacciones compatibles, parcialmente incompatibles e incompatibles, es decir, un espectro de susceptibilidad a resistencia. En las interacciones compatibles, un patógeno adaptado tiene éxito en el desarrollo de la enfermedad en un hospedero susceptible. En cambio, en las interacciones parcialmente incompatibles, el patógeno adaptado sobrevive limitadamente en un hospedero parcialmente resistente. A diferencia de las interacciones incompatibles, donde el patógeno no adaptado no sobrevive en un hospedero resistente (Jones y Dangl, 2006; Panstruga y Moscou, 2020; Maillot *et al.*, 2022).

## 6.5 El sistema inmune de la planta

Las plantas poseen sistemas inmunitarios innatos que les permiten defenderse de diversos atacantes patógenos. Dichos sistemas inmunitarios están conformados por componentes complejos que las plantas han desarrollado para detectar y hacer frente a los patógenos que les causan enfermedades (Jones y Dangl, 2006; Saur *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022).

### 6.5.1 Inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos

Cuando las plantas son atacadas por patógenos se activa un primer nivel del sistema de defensa, la inmunidad activada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), conocida como PTI. La PTI es accionada por los PAMP de los patógenos, ya que estos son detectados a través de receptores de reconocimiento de PAMP (PRR) que se encuentran en la superficie celular (Jones y Dangl, 2006; Zhou y Zhang, 2020; Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021a; Yuan *et al.*, 2021b). Estos PRR son quinasas receptoras que conducen la señalización celular al asociarse con sus correceptoras reguladoras para iniciar respuestas inmunitarias que protejan contra los patógenos. La PTI efectiva puede reducir fuertemente la colonización de los patógenos adaptados y detener eficazmente a la mayoría de los patógenos no adaptados, además de que ayuda a la resistencia basal. Como resultado de la PTI se tiene la entrada de calcio, la producción de ROS y la inducción de la expresión de genes de defensa (Jones y Dangl, 2006; Couto y Zipfel, 2016; Ngou *et al.*, 2021).

### 6.5.2 Inmunidad activada por efectores

Muchos patógenos pueden burlar la primera respuesta de defensa de las plantas desplegando moléculas que funcionan como factores de virulencia (Jones y Dangl, 2006; Cui *et al.*, 2015; Maillot *et al.*, 2022). Estas moléculas denominadas “efectores” son codificadas por los patógenos con el objetivo de combatir las respuestas de defensa de las plantas actuando en la célula vegetal e interfiriendo con la fisiología de las células del hospedero (Ngou *et al.*, 2021; Petre *et al.*, 2021).

Como segunda medida de defensa, las plantas son capaces de detectar los efectores mediante la activación de receptores intracelulares que activan la respuesta inmune contra patógenos, esta respuesta de inmunidad se conoce como inmunidad activada por efectores (ETI) (Zhou y Zhang, 2020; Yuan *et al.*, 2021b). La activación de la ETI implica el uso de un tipo de receptores con repeticiones ricas en leucina (NLR) diferentes a los PRR responsables de la respuesta por PTI (Yuan *et al.*, 2021b). Por su parte, los NLR pueden detectar directa o indirectamente a los efectores de patógenos que son afines, esto ocurre en el espacio intracelular y da lugar a una respuesta inmunitaria más fuerte (Peng *et al.*, 2018; Lu y Tsuda, 2020).

### 6.5.3 La interdependencia de las vías de inmunidad PTI-ETI

Estudios recientes han presentado evidencia de que las dos vías de inmunidad, la PTI y la ETI, convergen en ciertos puntos reguladores de su funcionamiento. Anteriormente, las dos vías habían sido consideradas como dinámicas separadas o solo se había teorizado que la ETI era una respuesta ampliada de la PTI; ahora la evidencia experimental está esclareciendo la información desconocida sobre los puntos conectados entre PTI y ETI (Jones y Dangl, 2006; Pruitt *et al.*, 2021). Los nuevos descubrimientos establecen que la ETI también depende de los componentes reguladores de la PTI para una resistencia completa y que, en cierto modo, actúa mejorando la PTI al aumentar los niveles de los componentes de señalización (Ngou *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021).

### 6.5.4 Susceptibilidad activada por efectores

Una parte central que se plantea en el modelo “zigzag” de Jones y Dangl (2006), es la susceptibilidad activada por efectores (ETS), que explica la dinámica compleja presente durante las interacciones de los efectores de patógenos con los componentes de la inmunidad de las plantas. La ETS ocurre porque muchos patógenos adaptados emplean conjuntos de efectores para contrarrestar los mecanismos de defensa de las plantas, esto es lo que se conoce como mecanismo de contradefensa del patógeno (Wang *et al.*, 2019). Los efectores interfieren con la señalización inmunitaria, neutralizando o anulando las acciones de defensa vegetal para favorecer la infección y finalmente el desarrollo de la enfermedad (Jones y Dangl, 2006; Chen *et al.*, 2022).

Dicha interrupción de las acciones de defensa es lo que da lugar a una carrera armamentista entre plantas y patógeno, o lo que en inglés se conoce como “arms race”. Por lo tanto, la adaptación de los efectores para derrotar la inmunidad de las plantas y ganar patogenicidad es meramente un resultado de las presiones de selección que promueven la coevolución y el surgimiento de nuevos mecanismos de defensa y contradefensa (Wang *et al.*, 2019; Dong y Ma, 2021; Martel *et al.*, 2021).

## 6.6 Genética de la resistencia a la enfermedad

La resistencia de las plantas al ataque de los fitopatógenos usualmente se divide en resistencia cualitativa o cuantitativa, según la intensidad, que es determinada por los mecanismos de respuesta de la planta (Roux *et al.*, 2014; Cowger y Brown, 2019).

### 6.6.2 La resistencia cualitativa

La resistencia es de tipo cualitativa cuando la progresión de la enfermedad se detiene, sin desarrollo del patógeno (Maillot *et al.*, 2022). Está basada en la interacción gen por gen, que consiste en la presencia de un par de genes compatibles, un gen de resistencia en la planta que es capaz de reconocer un gen de avirulencia del patógeno (Veneault-Fourrey y Rep, 2021). Esto implica una presión de selección fuerte para los patógenos, lo que resulta en la selección de las variantes de virulencia de efectores, para revertir la resistencia a susceptibilidad y ganar patogenicidad, rompiendo así la resistencia de las plantas hospederas (Palloix *et al.*, 2009; Cowger y Brown, 2019).

### 6.6.3 La resistencia cuantitativa

La resistencia es de tipo cuantitativa cuando los esfuerzos de la planta están dirigidos a reducir o limitar el desarrollo del patógeno, lo que conlleva una reducción de la enfermedad en lugar de la ausencia completa (Maillot *et al.*, 2022). El fenotipo de resistencia de la enfermedad lo determina la interacción de múltiples genes, actuando en diferentes vías de regulación e involucra muchos genes con efectos pequeños a moderados que contribuyen a la resistencia (Corwin y Kliebenstein, 2017; Veneault-Fourrey y Rep, 2021). Debido a esto, se considera de amplio espectro porque es más duradera, debido a la reducida selección de las variantes de virulencia de efectores, ya que la presión de selección es menor (Palloix *et al.*, 2009; Cowger y Brown, 2019).

## 6.7 Evasión de la inmunidad del hospedero

Cuando los fitopatógenos pueden escapar sin ser detectados por el sistema inmune de las plantas hospederas, utilizando diversas estrategias que les dan ventaja para enfermar con éxito a las plantas (Wang *et al.*, 2022), se conoce como evasión de la inmunidad del hospedero.

### 6.7.1 Mecanismos moleculares en la evasión de la inmunidad

Se han descrito diversos mecanismos moleculares implicados en la evasión de la inmunidad vegetal en el contexto de la regulación del patógeno. Estos mecanismos, se pueden clasificar en dos tipos: los que tienen que ver con cambios directamente en las secuencias de DNA, y las modificaciones epigenéticas que no implican cambios en la secuencia del DNA (Dong y Ma, 2021). Por un lado, los cambios en la secuencia del DNA incluyen mutaciones puntuales, duplicaciones, reordenamientos (inserciones y deleciones) y actividad de transposones. Por otra parte, las modificaciones de histonas y la acumulación de pequeños RNA son mecanismos descritos en la regulación epigenética (Chen *et al.*, 2021; Dong y Ma, 2021; Wang *et al.*, 2022). La actividad molecular en la evasión está enfocada a producir variantes que ayuden a escapar, suprimir o alterar el reconocimiento del patógeno por parte del sistema inmunitario vegetal, de modo que el patógeno complete su ciclo de vida (Na y Gijzen, 2016).

## 6.8 Modificaciones epigenéticas en la adaptación al hospedero

La lucha coevolutiva constante para sobrevivir que ocurre en la interacción planta-patógeno, se trata de una carrera de ambas partes por estar un paso adelante en nuevos mecanismos moleculares de defensa de las plantas y contradefensa de los patógenos para sobrevivir (Wang *et al.*, 2019). En este contexto, la regulación epigenética se superpone a la regulación por efectores en la virulencia, y se ha descrito como una regulación clave en algunos microorganismos fitopatógenos (Wang *et al.*, 2022).

En *Phytophthora*, la regulación epigenética es un aspecto que recientemente se está explorando, y se conoce bien en especies como *P. infestans* y *P. sojae*, pero no en *P. capsici* (Dong y Ma, 2021).

En estudios recientes se ha observado la evasión del reconocimiento de efectores por parte del sistema inmunitario de la planta, y esto se debe al silenciamiento de efectores Avr mediado por las modificaciones epigenéticas en *P. sojae* (Wang *et al.*, 2020; Dong y Ma, 2021). Las modificaciones de histonas que guían la transcripción mediante la modulación de la cromatina, y la acumulación de pequeños RNA que conducen el silenciamiento de genes transcripcional y postranscripcionalmente, son dos principales mecanismos epigenéticos explorados en *Phytophthora* (Dong y Ma, 2021).

Un estudio reciente de Wang *et al.* (2020), informó que la marca epigenética represiva que consiste en el aumento de la trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) en la ubicación del efector Avr1b de *P. sojae* se relaciona con el silenciamiento del efector. Se sugiere que esto frena la expresión del efector y consecuentemente ocurre la evasión del reconocimiento inmunitario de hospedero, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad en condiciones nativas, pero no en mutantes. Este estudio da soporte a las crecientes investigaciones sobre la relación existente entre la regulación de la expresión de efectores del patógeno por modificaciones epigenéticas de histonas, como un mecanismo de plasticidad transcripcional para autorregularse, adaptarse al hospedero y sobrevivir (Wang *et al.*, 2020).

### 6.9 Información de los hospederos de estudio

Las plantas hospederas preferidas o más habituales para *P. capsici* están bien caracterizadas, sobre todo especies de cultivos agrícolas y de importancia comercial. Pero existen algunas especies silvestres y otras no convencionales que son poco comunes en los estudios de interacción planta-*P. capsici* (Reis *et al.*, 2018) y son plantas que están emparentadas con los cultivos modernos, tales como *Solanum americanum*, *Vigna unguiculata*, *Capsicum annuum* var. *Glabriusculum* y *Physalis angulata* (De La Torre S. *et al.*, 2018; Lemmon *et al.*, 2018; Goettsch *et al.*, 2021; Tobón-Niedfeldt *et al.*, 2022).

*S. americanum* comúnmente llamada hierba mora es una especie solanácea silvestre que usualmente se le considera como maleza, aunque es consumida como alimento en ciertas regiones de México. La especie se encuentra dentro de *Solanum nigrum*, un complejo grupo de especies cuya taxonomía no se ha definido del todo (Lin *et al.*, 2022), sin embargo, se ha sugerido como *Solanum americanum* (Witek *et al.*, 2021). Esta especie está adquiriendo una creciente importancia y se está investigando por ser una fuente de resistencia a enfermedades por *P. infestans* y *Ralstonia solanacearum* (Witek *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2021). Otra especie es *V. unguiculata*, una fabácea conocida como frijol caupí o ejotero, que en México se podría considerar un cultivo huérfano poco estudiado. La categoría de cultivo huérfano se refiere a la característica de pocos esfuerzos en la investigación de dicha especie, pese a los buenos rasgos productivos y a su tolerancia a las condiciones abióticas y bióticas adversas (Oyatomi *et al.*, 2016; Tadele 2019). Asimismo, incluimos un chile silvestre proveniente de poblaciones de *C. annuum* que corresponde a la variedad *Glabriusculum* del estado de Sonora (Goettsch *et al.*, 2021). Por último, *P. angulata* es una solanácea silvestre considerada como maleza, sin embargo, se encuentra relacionada con plantas de cultivos de importancia económica, como el tomatillo o tomate verde cultivado en México (Martínez *et al.*, 2023). *P. angulata* al igual que *S. americanum* y *C. annuum*, están emparentadas con cultivos como el jitomate, la papa y el pimiento, por ser miembros de la misma familia de las solanáceas (De La Torre *et al.*, 2018; Goettsch *et al.*, 2021).

## 7 Materiales y métodos

### 7.1 Crecimiento de plantas y material vegetal

En este estudio se incluyeron plantas de cuatro especies diferentes, estas son *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*, las cuales se crecieron en invernadero, con un fotoperiodo natural de 16-8 horas día-noche. La germinación de semillas de las diferentes plantas se realizó en charolas de 24 cavidades con un sustrato 70-30 v/v de Peat Moss-vermiculita. A los 7 días posteriores a la emergencia se realizó el trasplante de las plántulas en macetas de un volumen de 1.6 litros (L) con una mezcla de sustrato de 70-30 v/v de Peat Moss-vermiculita. Las plantas crecieron en el invernadero hasta su uso en los experimentos en el laboratorio, el riego fue constante y la fertilización comenzó a las dos semanas después de la siembra empleando el fertilizante Miracle-Gro® (4 g/L de agua) que se aplicó en el agua de riego cada 7 días. Se utilizaron hojas desprendidas de las plantas de maceta de 4-5 semanas de edad para llevar a cabo los experimentos de patogenicidad y aislamiento de RNA de tejido vegetal infectado.

### 7.2 Ensayos de infección

#### 7.2.1 Inoculación con zoosporas en hojas desprendidas

En este estudio se utilizó la cepa D3 de *P. capsici*, que se cultiva de manera rutinaria en el laboratorio en placas Petri con medio V8® (Campbell's) más los antibióticos ampicilina y rifampicina (100 mg/mL). Con un sacabocados del número 4 se inocularon discos de micelio en las placas de V8® para permitir el crecimiento del patógeno *in vitro* durante 7-10 días. Posteriormente, las placas con *P. capsici* se expusieron a la luz directa durante 4 días para permitir el desarrollo de esporangios y producción de zoosporas adecuadas para la inoculación de plantas. Las zoosporas se recolectaron de los cultivos de *P. capsici* que produjeron esporangios. Para esto, se adicionaron 10 mL de agua de dH<sub>2</sub>O en campana de flujo laminar, luego, las placas se incubaron a 4 °C durante 90 min. Después, las placas se agitaron en el sentido de las manecillas del reloj para favorecer la liberación de las zoosporas y se transfirió toda el agua con zoosporas a tubos de fondo cónico de 50 mL.

Con una cámara de Neubauer se contó la concentración de zoosporas en las suspensiones y se inocularon 10  $\mu$ L con aprox. 100 zoosporas por  $\mu$ L en las hojas de los diferentes hospederos. La inoculación con zoosporas se efectuó únicamente en las hojas utilizadas en los ensayos de detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la tinción con azul de tripano (Ver sección 7.3.2) para detectar muerte celular.

### 7.2.3 Inoculación con discos de micelio en hojas desprendidas

Los ensayos de virulencia se realizaron en hojas desprendidas de cuatro especies de plantas (*S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*). Las hojas de la parte intermedia de la planta adecuadamente seleccionadas fueron colocadas en cámaras de humedad montadas con charolas de unicel de 20x35 cm y papel húmedo. Se inocularon con discos de V8<sup>®</sup> con micelio de *P. capsici* obtenidos con un sacabocados del número 1, en la superficie abaxial de la hoja. Luego, se incubaron en obscuridad a 28 °C en cámaras húmedas que posteriormente fueron colocadas en una cámara de incubación. Se realizaron observaciones diariamente en luz visible y luz UV, con las fotografías obtenidas se midió el área de infección con el software ImageJ (las fotografías fueron tomadas a las 24, 48 y 72 hpi). Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente con 8 réplicas de cada hospedero. Para las extracciones de RNA se recuperó el tejido y se congelaron muestras de interacción planta-*P. capsici* a las 24, 48 y 72 hpi usando nitrógeno líquido, y se conservaron a -80 °C para su uso posterior.

### 7.2.3 Inoculación de raíz en plantas completas

Las plantas de 5 semanas de edad fueron inoculadas con 1 mL de suspensión con zoosporas de *P. capsici* a una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  zoosporas/mL. Con una micropipeta se inocularon 1000  $\mu$ L en el sustrato cerca de la raíz y corona. Asimismo, se hidrató el sustrato de las macetas de las plantas previo a la inoculación para favorecer el movimiento de las zoosporas. Las plantas permanecieron en el laboratorio a temperatura ambiente y el fotoperiodo del día. Posteriormente, se tomaron fotografías a los 3 y 7 dpi para evaluar el efecto del patógeno y se registraron las observaciones fenotípicas.

### 7.3 Tinciones histológicas

#### 7.3.1 Tinción con DAB

Para determinar los efectos de la interacción de *P. capsici* D3 con los hospederos, se implementó la tinción con diaminobenzidina (DAB) para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Siguiendo el protocolo descrito por Daudi y O'Brien (2012), la solución de tinción con DAB se preparó con 50 mg de DAB y 45 mL de dH<sub>2</sub>O estéril para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Por un lado, se preparó una solución desteñidora con etanol al 96 % más ácido acético en una proporción 3:1 (v/v). Por otro lado, una solución blanqueadora se preparó con etanol al 96 %, ácido acético y glicerol en una proporción 3:1:1 (v/v/v). Para la tinción de hojas, se tomaron únicamente las hojas infectadas de 24 y 48 horas, se colocaron en placas de Petri y se adicionaron 6 mL de la solución DAB. Posteriormente, se aplicaron 6 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM) a las muestras, se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron en agitación a 80 rpm durante 8 horas. Después de la incubación, se reemplazó la solución de tinción DAB por la solución desteñidora durante una noche para eliminar la clorofila. Finalmente, se reemplazó la solución desteñidora por la solución blanqueadora y se dejó reposar durante 1 noche más a temperatura ambiente para eliminar el remanente de clorofila en las hojas.

#### 7.3.2 Tinción con azul de tripano

En la tinción con azul de tripano se llevó a cabo la metodología de Fernández-Bautista *et al.* (2016), para ello, se preparó una solución de tinción de azul de tripano con 10 mL de ácido láctico (85% v/v), 10 mL de fenol (tampón TE equilibrado, pH 7.5-8.0), 10 mL de glicerol (≥99%), 10 mL de dH<sub>2</sub>O y 20 mg de azul de tripano. También, se preparó la solución decolorante con etanol (98-100%) + ácido acético, y las soluciones limpiadoras A (ácido acético-etanol, 1:3 v/v) y B (ácido acético-etanol-glicerol, 1:5:1 v/v). Para el procedimiento de tinción se tomaron hojas infectadas con *P. capsici* D3, se mezclaron 50 mL de solución de tinción y 50 mL de etanol 96% (1:1 v/v) en un vaso de precipitados. El vaso se cubrió con una tapa de vidrio para evitar la evaporación del etanol, y posteriormente la mezcla se calentó en baño María a 96 °C. Una vez que la mezcla hirvió, se introdujeron las hojas en la solución y se dejaron por 5 min o hasta que su color verde se desvaneció por completo.

Las hojas fueron transferidas a placas Petri, se añadió la solución desteñidora y se mantuvieron en agitación durante una noche a temperatura ambiente. Las hojas se enjuagaron con glicerol al 60% al menos 2 veces y cuando estaban completamente desteñidas se colocaron en otra placa Petri para permitir el secado y hacer las observaciones microscópicas.

#### 7.4 Observaciones macroscópicas

La virulencia de *P. capsici* D3 en diferentes hospederos fue realizada mediante observaciones macroscópicas. La progresión de la infección en el tejido foliar se evaluó mediante observaciones con una lámpara de luz UV de onda larga de 100W. Se tomaron fotografías de la infección a las 24, 48 y 72 horas y a partir de estas se obtuvieron datos de área de infección. Por otra parte, se compararon los fenotipos de la infección por *P. capsici*. De igual manera, las tinciones con DAB y azul de tripano se observaron macroscópicamente para detectar diferencias en el proceso de infección en los hospederos.

#### 7.5 Evaluación de morfología de colonia

Para los ensayos de morfología de colonia se utilizaron placas Petri con agar V8® clarificado. Este medio contiene los mismos componentes que el medio V8® estándar, excepto que a los 200 mL/L del jugo V8® se les ha retirado la mayor parte de los componentes sólidos de las verduras mediante centrifugación. Asimismo, se agregaron los antibióticos ampicilina y rifampicina (100 mg/mL) y se inocularon las placas con tejido de diferentes hospederos infectados con *P. capsici*. Previamente se infectaron hojas desprendidas mediante inoculación de disco (las hojas se lavaron con dH<sub>2</sub>O y etanol al 70%), a las 72 horas se obtuvieron discos de hojas infectadas con un sacabocados del número 1. Los discos del mismo tamaño se colocaron en las placas con medio V8® clarificado, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 28°, durante 7 días hasta que el micelio creció en toda la placa. Para los ensayos de crecimiento de colonia micelial se estableció un control con la cepa original de *P. capsici* D3 creciendo en medio V8® clarificado y sin haber infectado ningún hospedero. Se tomaron fotografías cada 24 horas para medir el diámetro de colonia en ImageJ y así graficar el crecimiento de la colonia micelial del día 1 al día 7.

## 7.6 Extracciones de RNA del tejido de interacción planta-*P. capsici*

### 7.6.1 Extracción de RNA con TRizol™

El RNA se extrajo de las muestras de interacción planta-patógeno que se recuperaron del tejido vegetal infectado con *P. capsici* a diferentes tiempos. También se extrajo RNA del micelio de *P. capsici*, ya que este se utilizaría como control para normalizar los datos expresión relativa. Se llevó a cabo por el método de extracción de RNA con Trizol™ (Invitrogen) basado en la metodología de Zhao *et al.* (2018). Para la extracción de RNA, usando nitrógeno líquido se trituró aprox. 5 g de hojas infectadas con *P. capsici*. El polvo fino obtenido se transfirió a un tubo de centrifuga de 1.5 mL. Se agregó 1 mL de reactivo Trizol™ al tubo que contenía el polvo fino y se agitó en vortex durante 30 s. La muestra homogeneizada se incubó durante 5 min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Luego, se centrifugó a 12,000 xg durante 10 min a temperatura ambiente para eliminar los restos celulares y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Enseguida, se agregó 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de Trizol™ y se agitó en vortex vigorosamente durante 15 s, luego, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 4°C a 12,000 xg. La mezcla se separó en una fase roja inferior de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora, como el RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa superior incolora se transfirieron 600 µL de esta a un tubo nuevo, con cuidado y sin alterar la interfase. Posteriormente, se agregó 0.5 mL de alcohol isopropílico grado biología molecular al tubo que contenía la fase acuosa superior incolora. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 4°C a 12,000 xg. Luego, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70% al tubo y se agitó suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento. Se centrifugó a 10,000 xg durante 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante, la pastilla del RNA se secó a temperatura ambiente durante 5-10 min. Después, se agregaron 40 µL de agua libre de RNasa para resuspender el RNA. Finalmente, se midió la concentración y pureza del RNA en NanoDrop®, luego, se realizaron alícuotas con una cantidad de 1,000 nanogramos de RNA que se guardaron a -80°C para su uso posterior.

### 7.6.2 Extracción de RNA con el kit “Quick-RNA plant miniprep kit”

Se utilizó el kit “Quick-RNA plant miniprep kit” de la marca Zymo Research. Las muestras de hojas infectadas colectadas y congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se trituraron finamente en el tubo de lisis con perlas “ZR BashingBead” y se añadieron 800  $\mu\text{L}$  del RNA “lysis buffer”, la mezcla se agitó en vortex durante 30-60 s. Luego, se centrifugó por 1 min a 10,000  $\times\text{g}$ , se transfirieron 400  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en una columna Zymo-Spin IICG en un tubo colector y nuevamente se centrifugó durante 30 s. Se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de etanol grado biología molecular (95-100%) al filtrado, directamente en el tubo colector. Se mezcló con la micropipeta y la mezcla se transfirió a una columna Zymo-Spin II-CR en un tubo colector, después, se centrifugó durante 30 s a 10,000  $\times\text{g}$  y se descartó el filtrado. En este punto, se realizó un tratamiento con DNAasa en la columna, para ello, primero se hizo un lavado con 400  $\mu\text{L}$  del “wash buffer” en la columna, se centrifugó por 30 s y se descartó el filtrado. Posteriormente, se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de una solución de DNAasa directamente en la columna y se incubó durante 30-60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la actividad de la enzima. Posteriormente, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de RNA prep buffer a la columna y se centrifugó por 30 s, se descartó el filtrado y se agregaron 700  $\mu\text{L}$  de RNA wash buffer a la columna, se centrifugó por 30 s y nuevamente se descartó el filtrado. Nuevamente, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de RNA wash buffer, se centrifugó por 2 min y la mezcla se transfirió a un tubo de 1.5 mL libre de RNAasa. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de “DNAse/RNase free water” directo en la matriz de la columna y se centrifugó por 30 s. Luego, se transfirió el RNA eluido en el filtro Zymo-Spin III-HRC, previamente preparado con 600  $\mu\text{L}$  de “Prep Solution” con centrifugación a 8,000  $\times\text{g}$  durante 3 min. Finalmente, el RNA eluido fue transferido al filtro Zymo-Spin III-HRC en un tubo libre de RNAasa de 1.5 mL y se centrifugó a 16,000  $\times\text{g}$  durante 3 min. Se midió la concentración y pureza del RNA en NanoDrop<sup>®</sup>, y se realizaron alícuotas con una concentración de 1,000 nanogramos de RNA para su uso posterior, se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para el tratamiento con DNAasa, previamente, se preparó una mezcla que contenía 8  $\mu\text{L}$  del buffer, 8  $\mu\text{L}$  de la enzima DNAasa y 64  $\mu\text{L}$  de agua inyectable, para cada muestra.

### 7.6.3 Combinación de protocolos extracción de RNA

Debido a la escasez de las columnas “Zymo-Spin IICG” del kit, se probó exitosamente una combinación de protocolos para conjugar las metodologías sin el uso de dichas columnas. Primero, se realizó la extracción cómo lo indica el protocolo del Trizol hasta la obtención de la mezcla con alcohol isopropílico, y a partir de aquí se continuó con el protocolo del kit con columnas. La mezcla con alcohol isopropílico se transfirió a la columna Zymo-Spin II-CR del kit y a partir de este punto, se llevó a cabo la metodología de extracción de RNA con kit incluido el tratamiento con DNAasa. Con esta combinación de protocolos se logró obtener RNA de mayor pureza y concentración.

### 7.7 Retrotranscripción, PCR y qPCR

Se usó el RNA extraído de las muestras de interacción y el RNA de micelio. La síntesis del cDNA de la primera hebra a partir de RNA mensajero (mRNA) se realizó con el “SCRIPT cDNA Synthesis Kit” de Jena Bioscience (<https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PCR-511.0003.pdf>), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó Retrotranscripción (RT) y el oligo-(dT)<sub>20</sub>, probando las opciones sugeridas por el fabricante en los protocolos, **1a** (combinación estándar del RNA/oligo sin desnaturalización) y **1b** (combinación de RNA/oligo con desnaturalización). Se obtuvieron mejores resultados en la síntesis de cDNA preparando el mix de reacción 1b y la incubación de la mezcla a 65 °C durante 5 min, luego se colocó en hielo para completar la reacción con el resto de los componentes indicados. La RT se realizó en un termociclador BIO-RAD T100™ con las condiciones indicadas por el protocolo de síntesis. Para verificar la síntesis correcta se efectuó una PCR usando 1 µL del cDNA producido en la RT y oligonucleótidos (2 µM) para amplificar el gen del factor de elongación (EF1) de *P. capsici*.

La qPCR se realizó usando el kit para qPCR en tiempo real con tinción de “DNA qPCR SybrMaster highROX” que emplea como colorante el “SYBR® Green Fluorescent DNA Stain”, de la marca Jena Bioscience (<https://www.jenabioscience.com/images/PDF/PCR-374.0003.pdf>), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Siguiendo las pautas estándar de biología molecular se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen de interés y el gen de referencia EF1 usado como control endógeno.

La expresión relativa de cada gen de interés se determinó en las diferentes muestras de interacción planta-patógeno y se comparó con su expresión en el micelio de cultivo axénico. Para determinar la expresión relativa, se efectuaron dos réplicas biológicas y tres réplicas técnicas para cada gen, teniendo en cuenta que se produjeran resultados similares en cada una de las repeticiones.

**Cuadro 1.** Oligonucleótidos utilizados para determinar los niveles de expresión relativa de efectores Avr.

Oligos	Secuencia	Long. (nt)	GC %	Tm	Amplicon (bp)
Avr3a1-F	CATCATGGCAGACCCAAGCA	20	55	59 °C	151
Avr3a1-R	ATAATCCAGGTGGATCGCGT	20	50	59 °C	
Avr1-F	CGACGAGAGGGGAGGATTTTC	20	60	59 °C	170
Avr1-R	AGTATTTGGGGGCCTTCACC	20	55	59 °C	
Avr1b-F	GTGGATTCTCCAATGCTGCG	20	55	59 °C	183
Avr1b-R	GTCCCAGTTTGGCTAGAACG	20	55	59 °C	
EF1	CTAAGGGCACCCAGGACTTC	20	60	58.3 °C	193
EF1	TCACCCGACTTCACGAACTT	20	55	58.3 °C	

**Cuadro 2.** Oligonucleótidos usados para determinar los niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021.

Oligos	Secuencia	Long. (nt)	GC %	Tm	Amplicon (bp)
SMYD3-F	ACCTCAACAGCTAAACGCCA	20	50	60.7 °C	123
SMYD3-R	CACGTCGCTCTGGAGACTTT	20	55	60.7 °C	
JmJ6021-F	AGAGGAACTACTGGAGCGGT	20	55	61.8 °C	231
JmJ6021-R	CAAGGGATACCGTACCAAGT	20	55	61.8 °C	

## 7.8 Análisis de secuencias de genes efectores homólogos

Se realizó una búsqueda de genes efectores homólogos de avirulencia (Avh) en otras especies de *Phytophthora* para los cuales está reportada la actividad de avirulencia en la literatura existente. Se obtuvo una lista de genes Avh y Avr en las especies más estudiadas, *P. infestans* y *P. sojae*, además de algunos Avr de *P. capsici*. Las secuencias de nucleótidos de los genes encontrados con actividad de avirulencia conocida, se obtuvieron del NCBI y de los conjuntos de datos de efectores publicados.

Las secuencias de nucleótidos de la lista de efectores agrupados se alinearon con la herramienta en línea Muscle Bioinformatics para obtener un archivo FASTA. El archivo FASTA del alineamiento se pasó a formato phylip y las secuencias se procesaron en PhyML para generar un árbol filogenético de máxima verosimilitud. Con las opciones predeterminadas y el mejor modelo elegido por el software “Smart Model Selection” (SMS) (Guindon *et al.*, 2010; Lefort *et al.*, 2017). El árbol filogenético generado en PhyML se importó desde Evolview suite en formato newick para asignar una raíz, visualizar y agregar anotaciones. En Evolview se agregó un heat map del porcentaje de identidad de nucleótidos de los efectores Avh y Avr de tres especies de *Phytophthora* comparados con los tres efectores analizados en el presente estudio (Avr3a1, Avr1 y Avr1b). Adicionalmente, se agregaron motivos conservados de las secuencias de efectores, los cuales se identificaron con MEME Bioinformatics (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) y los datos se computaron en Evolview (<https://www.evolgenius.info/evolview/#/treeview>).

## 7.9 Ensayos de expresión transitoria del efector Avr3a1 en plantas

Para esta prueba se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 con las construcciones genéticas de INF1 y Avr3a1 de *P. capsici*, previamente obtenidas en el grupo de laboratorio. La cual contiene un plásmido de sobreexpresión en el vector binario pB7WG2D con los genes INF1 y Avr3a1. Se establecieron cultivos en medio LB con los antibióticos Estreptomicina 100 mg/mL y Espectinomicina 100 mg/mL, se dejaron crecer durante dos días a 28 °C en agitación a 180 rpm. A partir de estos se realizó un nuevo cultivo para tener células de 24 h de crecimiento y adecuadas para la agroinfiltración.

Se tomó el cultivo de 24 h y se midió la OD<sub>600</sub> en un espectrofotómetro para la preparación de las bacterias. Los cultivos crecidos en medio LB fueron centrifugados y se resuspendieron en MgCl<sub>2</sub> (2mM), se midió nuevamente la OD<sub>600</sub> y se ajustó a 0.5. Las células se dejaron reposar durante dos horas antes de iniciar la infiltración. Una vez preparadas las bacterias, se infiltraron hojas de plantas de *S. americanum* y *P. angulata* de 4 a 5 semanas de edad, con una jeringa de 1 mL sin aguja y ejerciendo presión sobre el embolo para infiltrar las células de *Agrobacterium* en las hojas.

Se estableció un diseño de cuatro puntos de infiltración en cada hoja, como controles se infiltraron el buffer que consiste en una solución de  $MgCl_2$  y el vector vacío (EV) que es la bacteria *A. tumefaciens* que contiene el plásmido sin el gen. Y *Agrobacterium* que contenía el plásmido más el gen, INF1 en un tratamiento y Avr3a1 en otro. Con ayuda de la aguja de la misma jeringa se realizó una pequeña incisión en los sitios marcados en la superficie abaxial de la hoja para facilitar la infiltración en los cuatro puntos de infiltración por cada hoja (Buffer, EV, INF1 y Avr3a1). Se infiltraron 2-3 hojas por planta, tomando las hojas completamente abiertas de la parte intermedia de la planta, no hojas de mayor edad de la parte inferior ni hojas demasiado jóvenes de la parte superior. Las plantas agroinfiltradas se mantuvieron a temperatura ambiente con el fotoperiodo del día y los fenotipos se evaluaron a los 7 días post-infiltración. El experimento se repitió 3 veces con 6 réplicas técnicas para un número total de 18 datos en *S. americanum* y 2 veces con 6 réplicas para un total de 12 en *P. angulata*.

#### 7.10 Obtención de imágenes y datos de virulencia

Se obtuvieron datos de área de infección utilizando el software de procesamiento de imagen digital ImageJ, que posteriormente se analizaron en RStudio. Se realizó un ANOVA y una prueba de TuckeyHSD para la comparación entre el comportamiento de la virulencia en función de la interacción. Para la evaluación del crecimiento micelial de *P. capsici* D3 en placas Petri se realizaron mediciones de diámetro de colonia con ayuda de ImageJ. A partir de fotografías tomadas diariamente de cada cultivo en placa Petri con una escala de referencia en la misma. De los datos de morfología de colonia se obtuvo la media y el error estándar de la media para graficar una cinética que nos muestra el crecimiento colonial del día 1 al día 7, con ggplot2. Asimismo, de la cuantificación de zoosporas se graficó la concentración estimada en cada una de las muestras provenientes de diferentes interacciones.

#### 7.11 Normalización de datos de expresión relativa de genes

Los datos de Ct de los genes de interés (Avr3a1, Avr1, Avr1b, SMYD3 y JmJC6021) obtenidos por qPCR se normalizaron con respecto al gen endógeno o de referencia (EF1) y los Ct de cada muestra de interacción planta-*P. capsici* se normalizaron al micelio como control.

Los cálculos se realizaron por el método de  $\Delta\Delta Ct$  y para normalizar los datos de Ct de los genes de interés al Ct de EF1 como gen de referencia se obtuvo la diferencia, como se muestra a continuación.

$$\Delta Ct(\text{control}) = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

$$\Delta Ct(\text{Muestra}) = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

Para normalizar el  $\Delta Ct$  de cada muestra de interacción al  $\Delta Ct$  de la muestra de micelio:

$$\Delta\Delta Ct (\text{Muestra}) = \Delta Ct(\text{interacción}) - \Delta Ct (\text{micelio})$$

Debido a que los cálculos se hacen con logaritmo base 2, se utilizó la ecuación  $REN = 2^{-\Delta\Delta Ct (\text{Muestra})}$  para obtener la relación de expresión normalizada para cada gen de interés en las muestras de interacción y finalmente se obtuvo la diferencia entre los valores de fold change de los genes interés en cada muestra de interacción y los valores en el micelio.

## 7.12 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó en RStudio y se visualizaron utilizando la paquetería ggplot2. Primero, todos los datos se capturaron en Microsoft Excel y se guardaron como archivos .csv para posteriormente importarlos en RStudio con readxl. Segundo, el análisis estadístico general fue un ANOVA (aov) y una prueba de TuckeyHSD de los resultados del aov. Para asignar la significancia estadística y el tratamiento con mayor efecto, los resultados se asignaron a un modelo (variable ~ tratamiento) y multcompLetters4(modelo, TuckeyHSD). Los boxplots del área de lesión en tres puntos de tiempo de las cuatro interacciones, se visualizaron incluyendo los datos individuales y las réplicas (Rep 1, Rep 2 y Rep 3) que representan las tres veces que se repitieron los experimentos independientes.

Para obtener la cinética del crecimiento de la colonia micelial de *P. capsici* se obtuvo la media, y el error estándar de la media para cada interacción, y se visualizaron en ggplot2 con la escala de colores viridis. La gráfica de barras de la producción de zoosporas se realizó con la misma paquetería y escala de colores, las barras de error indican la desviación estándar.

Para las gráficas de los niveles de expresión relativa de genes Avr, los cálculos se hicieron en Excel para obtener el Fold change ( $\text{Log}_2$ ), posteriormente, los datos se analizaron en RStudio y se graficaron con ggplot2. Primero, la comparación de la expresión de cada gen por cada interacción, segundo, una visualización general, y tercero, un análisis de componentes principales (PCA) adicional. El cual fue útil para evaluar visualmente las similitudes y diferencias de los datos entre las muestras para determinar si se agrupaban solo datos de la misma muestra, lo que indicaría mayor confiabilidad entre los datos por muestras de cada interacción.

De la evaluación de los fenotipos de la respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1, más los respectivos controles se obtuvieron datos del nivel de respuesta hipersensible. Para ello, primero se definió el HR\_score con base en todos los fenotipos obtenidos, en una escala del 0 al 6. Donde 0 indica que no hay HR visible y 6 representa el mayor nivel de HR. La visualización de los datos de HR\_score se construyó con geompoint de ggplot2, haciendo un conteo (count) del número de datos del nivel de HR que cae en cada score, lo que hace puntos pequeños o más grandes dependiendo del "count" (conteo). Por último, los niveles de expresión relativa de la metilasa/desmetilasa de histona se transformaron de  $\text{Log}_2$  a  $\text{Log}_{10}$  y se visualizaron en un heatmap para mostrar los niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021. Adicionalmente, se agregó un PCA del nivel de expresión relativa, para indicar la variación de los datos en las muestras.

## 8 Resultados

### 8.1 Comparación de la virulencia de *P. capsici* entre cuatro interacciones planta-patógeno

Como primer paso en este estudio, se caracterizó la patogenicidad y virulencia de *P. capsici* en cuatro diferentes interacciones planta-patógeno. Primero, se verificó cualitativamente la patogenicidad de *P. capsici* en la interacción con cuatro especies de plantas, que se enlistan en el **cuadro 3**. Se inocularon zoosporas en la raíz de plantas sanas en maceta y se observó el fenotipo a los 3 y a los 6 dpi. A los 3 dpi se evaluó el progreso de la enfermedad en las plantas, detectamos que *S. americanum* empieza a decaer, porque exhibe síntomas de marchitamiento y que *V. unguiculata*, *C. annuum* y *P. angulata* permanecen sin síntomas aparentes de la enfermedad. Sin embargo, a las 72 horas notamos que *S. americanum* se muestra completamente enferma y con marchitez severa, *V. unguiculata* se muestra tolerante a la enfermedad, pero se observa un decaimiento de las hojas, en *C. annuum* al igual que en *S. americanum*, se observó la mayor severidad de la enfermedad y en *P. angulata* la enfermedad no se desarrolló y permanece sin síntomas aparentes en el transcurso de la interacción, hasta los 6 días postinoculación (**Figura 1B**).

**Cuadro 3.** Especies de plantas utilizadas en este estudio.

Espece	Familia botánica	Cultivar o acesión	Nombre común	Reacción evaluada
<i>Solanum americanum</i>	Solanaceae	Silvestre	Hierba mora americana	S
<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	Cultivo huérfano	Frijol caupí	NH
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>Glabriusculum</i>	Solanaceae	Fomentada	Chiltepín de Sonora	S
<i>Physalis angulata</i>	Solanaceae	Silvestre	Tomatillo silvestre	NH

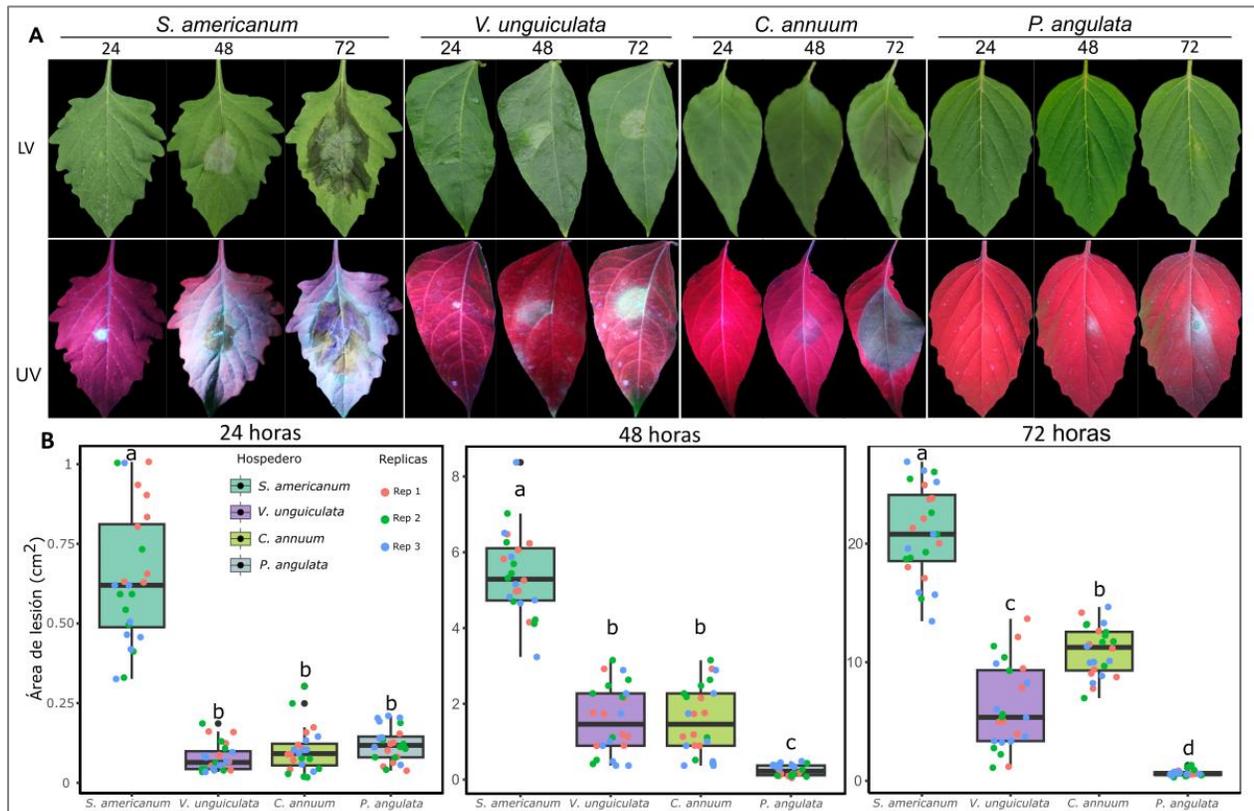
NH=no hospedero, S=susceptible.



**Figura 1.** Evaluación fenotípica de la reacción a la inoculación de *P. capsici* en raíz en diferentes especies. (A) Vista de plantas sanas (sin inoculación) utilizadas en este trabajo, (a) *S. americanum*, (b) *V. unguiculata*, (c) *C. annuum* var. *Glabriusculum*, (d) *P. angulata*. (B) Fenotipos de plantas inoculadas con zoosporas ( $1 \times 10^6$  aprox.) de *P. capsici* en raíz. Se muestran fotografías a los 3 días (izquierda) y 6 días (derecha) postinoculación.

Segundo, realizamos observaciones microscópicas a partir de imágenes de hojas desprendidas inoculadas con *P. capsici* y se dio seguimiento a la interacción en el transcurso del tiempo para detectar y cuantificar el comportamiento de la virulencia de *P. capsici* en las cuatro especies de plantas. Los datos del área de lesión mostraron que la virulencia varió dependiendo del tipo de interacción, y entre las diferentes especies vegetales la progresión de la infección se regula según el genotipo y el tiempo transcurrido. En la **Figura 2A**, se observan los fenotipos de las cuatro interacciones planta-*P. capsici*, en tres puntos de tiempo, a las 24, 48 y 72 h. La virulencia fue significativamente mayor en *S. americanum* en los tres puntos de tiempo. A las 24 h no hubo diferencias significativas entre el área de lesión por *P. capsici* entre *V. unguiculata*, *C. annuum* y *P. angulata*.

A las 48 horas no se observaron diferencias en el área de lesión entre *V. unguiculata* y *C. annuum*, pero si se observó el área de lesión significativamente menor en *P. angulata*. En cambio, a las 72 horas las interacciones se separan en cuanto a virulencia, puesto que, se observaron diferencias significativas entre el área de lesión entre todas las interacciones.



**Figura 2.** Progresión de la infección ocasionada por *P. capsici* en hojas. **(A)** Fenotipos de hojas infectadas *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*, a las 24, 48 y 72 hpi, observadas bajo luz visible y luz UV. **(B)** Medición del área de lesión y de expansión de la infección sobre la superficie de las hojas en los distintos hospederos. Las mediciones se realizaron a las 24, 48 y 72 h en las mismas hojas con ayuda del software ImageJ. Los datos se analizaron con un one-way ANOVA y una prueba de Tuckey HSD en Rstudio. Las letras indican las diferencias significativas en el área de lesión entre los diferentes hospederos, las letras iguales indican que no hay diferencias significativas en dichos hospederos, en cambio, las letras diferentes indican diferencias significativas y el orden alfabético indica los hospederos con mayor y menor progresión del área de lesión, respectivamente.

En la interacción *S. americanum*-*P. capsici*, se observó una clara diferenciación de la fase biotrófica y necrotrófica, incluso con las observaciones macroscópicas en luz visible (**Figura 2A**). Esta diferencia de fases se observó en *C. annuum* var. *Glabriusculum* a las 72 horas, pero en menor nivel.

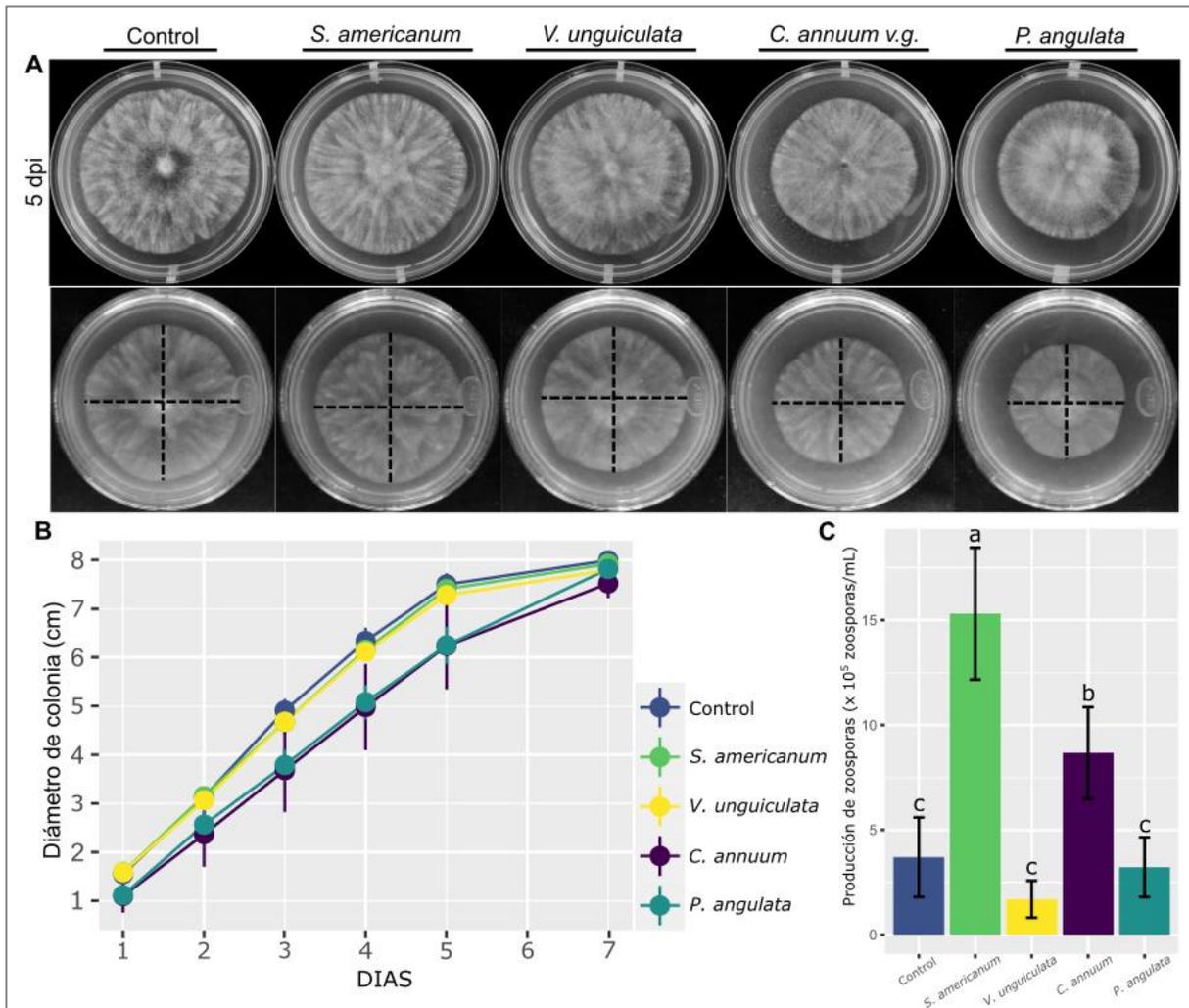
En *S. americanum* (**Figura 11A**) y *V. unguiculata* (**Figura 2A**) se indujo una respuesta similar a una respuesta hipersensible previo a la expansión de la infección a través del tejido foliar. Asimismo, la transición de la fase biotrófica a necrotrófica ocurrió primero en *S. americanum* (**Figura 2A y Figura 11A**) y después en *C. annuum* var. *Glabriusculum*, mientras que en *V. unguiculata* no se detectó una diferenciación clara de la transición en algunas hojas evaluadas. En *P. angulata* tampoco se observó la transición de fase (**Figura 2A y Figura 11B**) porque no hubo una progresión de la infección como ocurrió en los hospederos susceptibles *S. americanum* y *C. annuum*. Curiosamente, el fenotipo de hidrosis o “water soaking”, una característica de la infección por patógenos que puede verse como un signo del progreso de la infección exitosa (Ekanayake *et al.*, 2022; Hu *et al.*, 2022; Lajeunesse *et al.*, 2023), solo se observó de manera clara en *S. americanum* a las 72 horas, en cambio en *C. annuum* fue casi indetectable por la rápida transición de biotrofia a necrotrofia. Este fenotipo no se detectó en *V. unguiculata* ni en *P. angulata* (**Figura 2A y Figura 11B**).

Los resultados de la evaluación de la virulencia, en síntesis, exhiben variaciones en la progresión de la infección o diferencias en las reacciones causadas por el patógeno, dependiendo de la interacción. Los datos fenotípicos permitieron constatar que determinados genotipos difieren en el grado de resistencia, unos pueden sobrevivir al patógeno y otros pueden ser susceptibles. Lo anterior nos permitió comparar las variaciones en la virulencia de *P. capsici*, en un espectro del nivel de resistencia de cuatro especies de plantas.

## 8.2 Los cambios en la morfología de colonia de *P. capsici* y la producción de zoosporas difieren en la interacción

Los experimentos de crecimiento micelial en los ensayos de morfología de colonia de *P. capsici* se realizaron para detectar cambios en la forma y el patrón de crecimiento del micelio, guiados por la interacción planta-patógeno. Partiendo de la premisa de que cada planta impone un ambiente distinto al que *P. capsici* se tiene que adaptar, infectamos hojas desprendidas de *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*.

Dejamos crecer por 72 horas y tomamos nuevo inóculo directamente de las hojas infectadas, inoculamos discos de dichas hojas en placas con medio V8® y se dio seguimiento al nuevo crecimiento micelial. Luego, se midió el diámetro de colonia diariamente desde el día 1 al día 7, hasta que el control cubriera completamente la placa. El control se refiere a la cepa de “stock” *in vitro* que se siembra rutinariamente en el laboratorio, sin inocular en alguna planta.



**Figura 3.** Ensayos de morfología de colonia *in vitro*. **(A)** Observaciones macroscópicas del crecimiento micelial de los cultivos de discos de hojas infectadas de diferentes hospederos a los 4 días (abajo) y a los 5 días (arriba). **(B)** Crecimiento de colonias de *P. capsici* del día 1 al día 7. El patógeno se inoculó y se dejó crecer en el hospedero, luego se recuperó y se dejó crecer en medio V8 clarificado. **(C)** Concentración de zoosporas producidas por *P. capsici* en los aislados de hojas infectadas. Las letras indican las diferencias significativas entre las diferentes muestras. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre dichas condiciones. Las letras diferentes indican diferencias significativas. El orden alfabético indica las muestras con mayores y menores diferencias respectivamente.

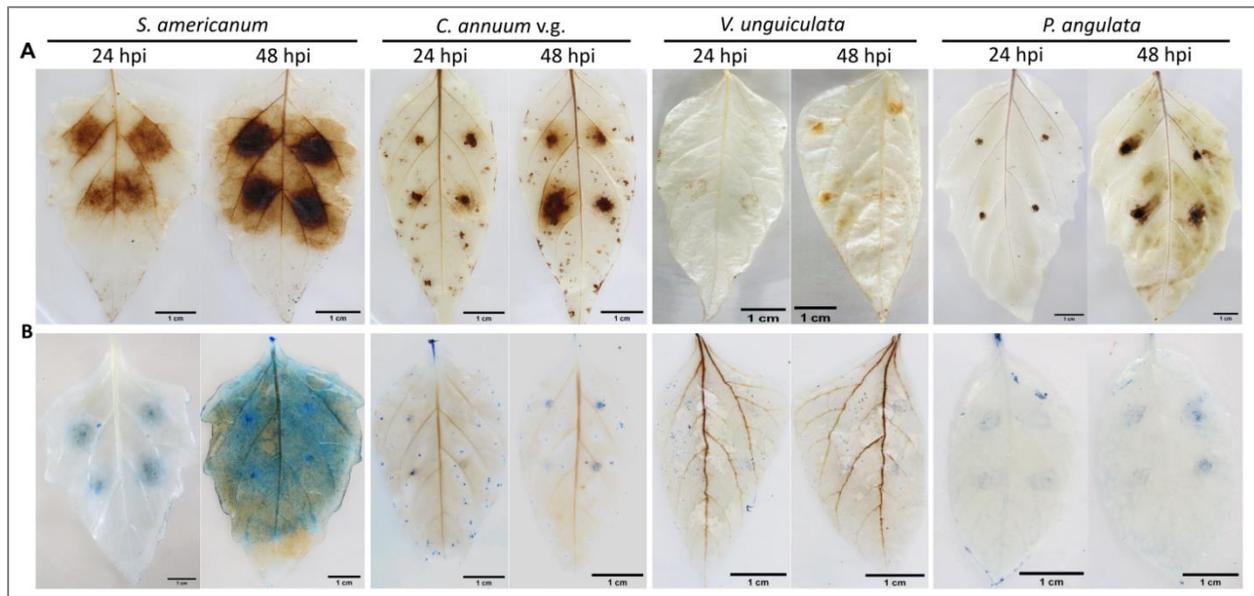
Los fenotipos detectados por las observaciones macroscópicas mostraron diferencias en la morfología de la colonia micelial dependiente del tipo de interacción (**Figura 3A**). Comúnmente, *P. capsici* presenta una morfología estrellada abierta o relajada, en medio V8, como se observa en el control (**Figura 3A**), pero cuando se impuso en diferentes especies de plantas, tendió a cambiar su morfología. El aislado de *S. americanum* todavía presentó micelio en forma estrellada, pero fue más cerrada o compacta en comparación con el control. En cambio, cuando la cepa se aisló tanto de *V. unguiculata* como de *C. annuum* la forma del micelio se volvió más laxa, menos densa y estrellada. Asimismo, después de la interacción con *P. angulata* el micelio fue menos denso y nada estrellado.

Los datos de diámetro de colonia visualizados en la gráfica de la **Figura 3B**, indican que el crecimiento de la colonia micelial no fue significativamente diferente entre el control, *S. americanum* y *V. unguiculata*, pero sí lo fue entre estos tres anteriores y los aislados de *C. annuum* var. *Glabriusculum* y *P. angulata*. La producción de zoosporas varió significativamente entre los aislados de los distintos hospederos (**Figura 3C**). En resumen, la morfología de colonias y la producción de zoosporas son dos aspectos que se comportaron diferente por efecto del ambiente impuesto por la especie de planta.

### 8.3 Diferencias detectadas en la respuesta a la infección por *P. capsici* entre distintas interacciones planta-patógeno

Para comparar la respuesta a la infección por *P. capsici* en las cuatro interacciones planta-patógeno, se montaron ensayos de infección con zoosporas, luego, se llevó a cabo una tinción histológica del tejido vegetal inoculado con *P. capsici* D3, así como una prueba bioquímica para la detección de ROS. Con esto, pudimos evaluar la respuesta a la infección distintiva de cada planta. Las observaciones macroscópicas de los fenotipos mostraron que las dos pruebas implementadas para detectar la muerte celular y la acumulación de ROS produjeron resultados similares, los cuales están determinados por el tipo de interacción planta-*P. capsici*. Se observó que en *S. americanum* se produjo una mayor cantidad de ROS, que se extendió sobre la mayor parte de la superficie de la hoja. Esto ocurrió diferente en *C. annuum* var. *Glabriusculum*, ya que mostró una respuesta disminuida desde el inicio de infección hasta las 48 horas, lo cual no es concordante con los fenotipos de infección con micelio a las 48 horas.

En *V. unguiculata* no hubo respuesta notable en la producción de ROS a las 24 y 48 horas, lo que es consistente con el limitado pero latente avance de la infección con micelio. En *P. angulata* la respuesta fue mínima a las 24 horas, pero aumentó a las 48 horas sin incremento de la muerte celular. En la **Figura 4A**, se muestran las diferencias en la producción de ROS en respuesta a la infección por *P. capsici* en las cuatro plantas estudiadas, a las 24 y 48 hpi.

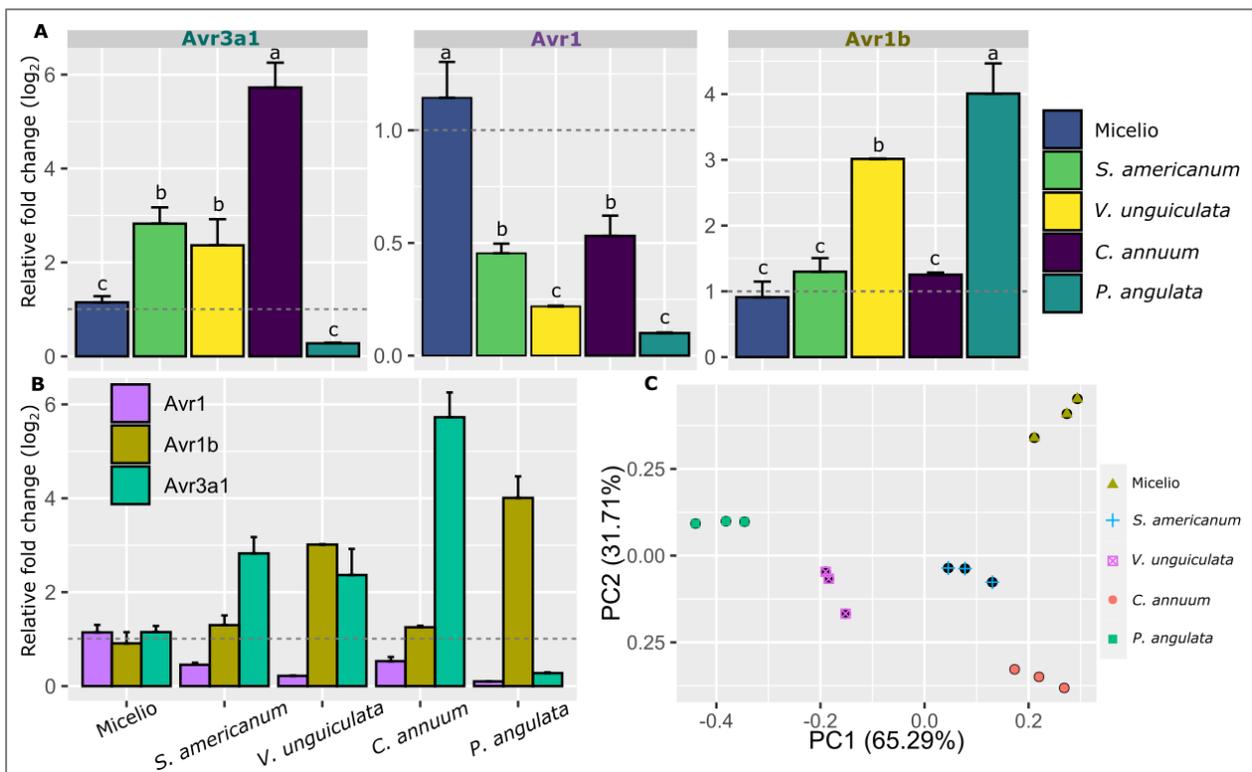


**Figura 4.** Observaciones macroscópicas de la respuesta a la infección en hojas de diferentes plantas. **(A)** Tinción de DAB para la detección de la acumulación de ROS inducida por la infección por *P. capsici*. Las fotografías se obtuvieron a las 24 y 48 hpi. **(B)** Fenotipos de muerte celular y colonización del patógeno en el tejido vegetal infectado a las 24 y 48 hpi, obtenidos mediante observaciones macroscópicas de tinciones con azul de tripano.

Por otra parte, en la **Figura 4B** se observan los fenotipos de muerte celular en el tejido de la hoja, revelados con la tinción con azul de tripano, a las 24 y 48 hpi. La mayor muerte celular se observó en *S. americanum* en los dos puntos de tiempo, en cambio, en las demás plantas fue limitada. Incluso en *V. unguiculata* y *P. angulata* solo se notaron los puntos de reacción dónde se inocularon las zoosporas, pero no se observó expansión de la muerte celular. Lo que fue consistente con los niveles de ROS, que variaron dependiendo del grado de infección que logró desarrollar el patógeno en las hojas.

## 8.4 Los niveles de expresión relativa de genes efectores Avr están regulados diferencialmente entre las interacciones planta-*P. capsici*

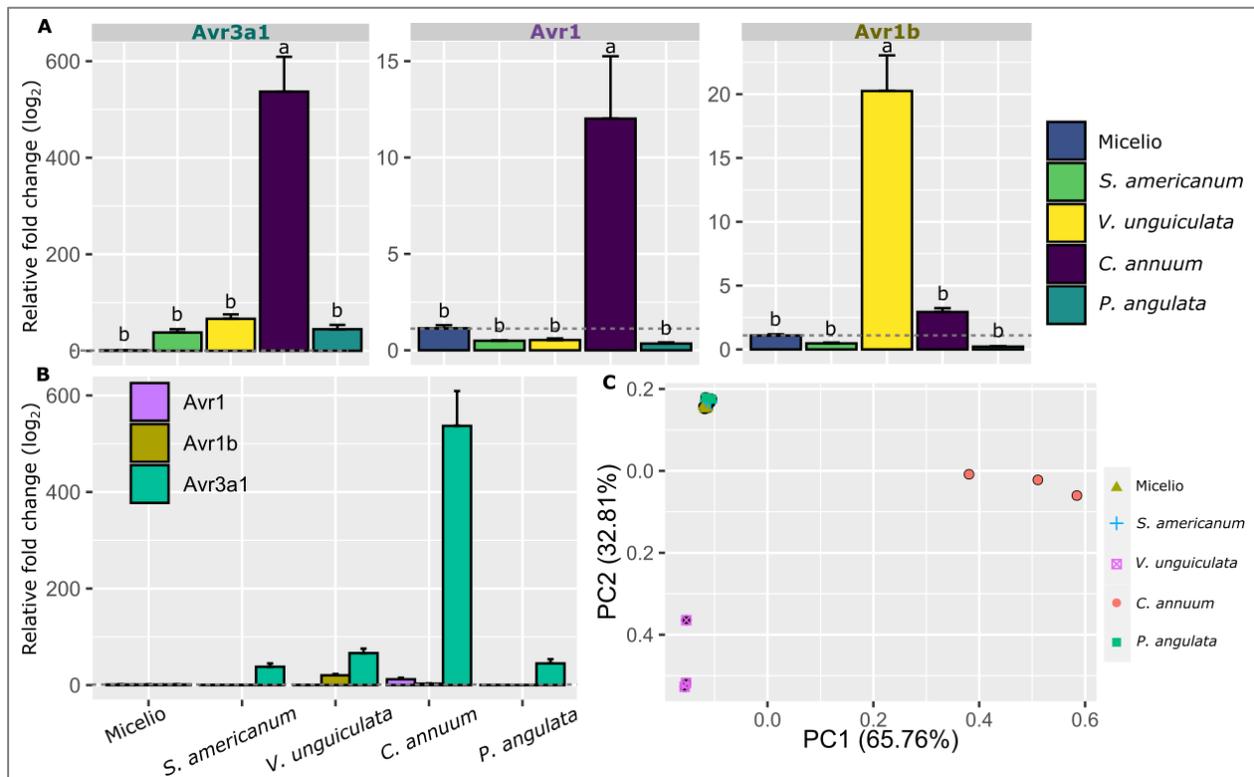
Determinamos, por RT-qPCR, los niveles de expresión relativa de tres genes efectores tipo Avr (Avr3a1, Avr1 y Avr1b) de *P. capsici* en cuatro interacciones planta-patógeno (*S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* y *P. angulata*), a las 48 y 72 hpi del transcurso de la interacción. Los datos obtenidos de las qPCR fueron normalizados, primero, con respecto al gen constitutivo EF1 y, segundo, con respecto a la expresión de los genes en el micelio de *P. capsici* cultivado en agar V8® clarificado.



**Figura 5.** Niveles de expresión de genes efectores Avr de *P. capsici* a las 48 hpi. **(A)** Expresión relativa de los genes efectores Avr3a1, Avr1 y Avr1b, expresada en fold change determinada por el método de  $\Delta\Delta Ct$  de los datos obtenidos de RT-qPCR, en muestras de RNA de micelio y muestras de interacción en *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* y *P. angulata*. Las líneas punteadas indican el límite del nivel de expresión en el control y las letras muestran las diferencias significativas en los niveles de expresión entre las muestras. **(B)** Una vista general de los niveles de expresión relativa de los efectores en el micelio y los cuatro hospederos. **(C)** Un PCA de los datos de expresión relativa de los efectores agrupados por muestras.

Pudimos examinar el comportamiento en los patrones de expresión de Avr3a1, Avr1 y Avr1b, en el transcurso del tiempo de diferentes interacciones planta-*P. capsici*.

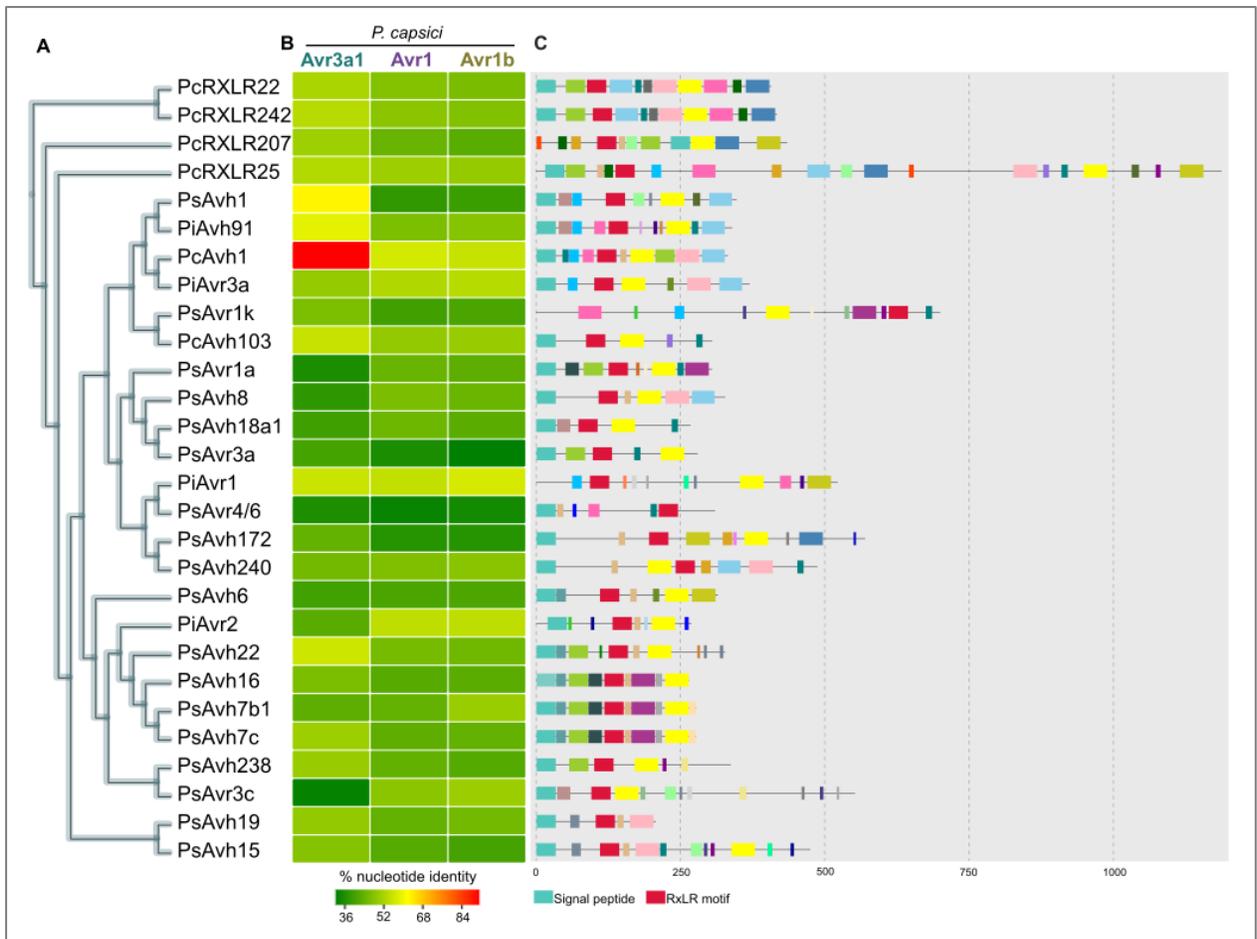
Encontramos que, a las 48 hpi Avr3a1 se expresó a un nivel significativamente más alto en la interacción con *C. annuum*. En *S. americanum* y *V. unguiculata* se expresó a niveles similares, pero en *P. angulata* los transcritos estuvieron por debajo de los niveles de transcrito del micelio. En el caso del gen Avr1, en todas las interacciones los niveles de transcritos se expresaron en valores por debajo de los transcritos en el micelio. En cambio, Avr1b en todas las interacciones se expresó por arriba de su expresión en el micelio, particularmente, en *P. angulata* Avr1b se expresó significativamente más que en el resto de las interacciones. En *V. unguiculata* Avr1b se expresó más que en *S. americanum* y en *C. annuum*, y en estas dos últimas interacciones Avr1b se expresó en niveles similares. En la **Figura 5** se muestra la expresión de efectores Avr a las 48 hpi. El componente PC1 explica la mayor parte de la variabilidad (65.29 %) en los datos por muestras (interacción planta-*P. capsici*) analizadas (**Figura 5 C**).



**Figura 6.** Niveles de expresión de genes efectores Avr de *P. capsici* a las 72 hpi. **(A)** Expresión relativa de Avr3a1, Avr1 y Avr1b. Las líneas punteadas indican el límite del nivel de expresión en el control y las letras muestran las diferencias significativas en los niveles de expresión entre las muestras. **(B)** Visualización general de los niveles de expresión relativa de los efectores agrupados en las 5 condiciones de estudio (micelio y los cuatro hospederos). **(C)** PCA que muestra la variación de los datos de expresión relativa, en cada una de las muestras, representadas por formas y diferente color.

En la **Figura 6**, analizamos los datos de expresión de Avr3a1, Avr1 y Avr1b a las 72 hpi del transcurso de la interacción. Aquí, constatamos que Avr3a1 a las 72 horas se expresó a niveles altos en *C. annuum*, comparado con los niveles de expresión de las otras tres interacciones. En las interacciones de *P. capsici* con *S. americanum*, *V. unguiculata* y *P. angulata* no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de Avr3a1, aunque, cabe remarcar que se expresa por arriba del nivel de expresión en el micelio. Asimismo, Avr1 al igual que Avr3a1 se expresó más en la interacción de *C. annuum*, pero no a niveles dramáticos, y en el resto de las interacciones Avr1 se expresó por abajo del nivel del micelio. Por otra parte, Avr1b a las 72 hpi experimentó un cambio en su expresión, se expresó más en *V. unguiculata* que en otras interacciones. Como se muestra en las **Figuras 6A y 6B**, entre las 48 y 72 hpi ocurrieron cambios drásticos en los patrones de expresión de los genes Avr, los cuales están relacionados con el tiempo transcurrido de la interacción y el tipo de interacción. Para el caso del set de datos de expresión relativa después de 72 hpi del transcurso la interacción, la mayor parte de la variabilidad sustenta en el PC1 (65.76 %), al igual que los de 48 horas (**Figura 6C**).

Para examinar a mayor profundidad la función de los efectores Avr de *P. capsici*, incluimos una exploración adicional de las secuencias de nucleótidos de una lista de efectores homólogos de avirulencia (Avh) de *P. infestans*, *P. sojae* y *P. capsici*. Comparamos la similitud de las secuencias mediante el software bioinformático MUSCLE, de efectores Avh contra los efectores Avr de *P. capsici* incluidos en este estudio. Obtuvimos los datos de porcentaje de identidad de nucleótidos de la lista de secuencias de efectores Avh con actividad de Avr conocida, construimos un mapa de calor y agregamos los motivos de DNA identificados con el software MEME-motifs. Con este análisis, constatamos que pese a la variación en las secuencias de los efectores Avh en las especies y entre especies, se conservan regiones que codifican para motivos de proteína, que son esenciales para la actividad de avirulencia. Destaca la presencia del motivo RxLR necesario para la traslocación de los efectores Avr que activan la inmunidad ETI. La mayoría de los efectores Avh incluidos en el análisis tienen funciones ya descritas, lo que permite un acercamiento a las posibles funciones de los efectores Avr3a1, Avr1 y Avr1b, evaluados en este estudio. Los resultados del análisis de secuencias se muestran en la **Figura 7**.

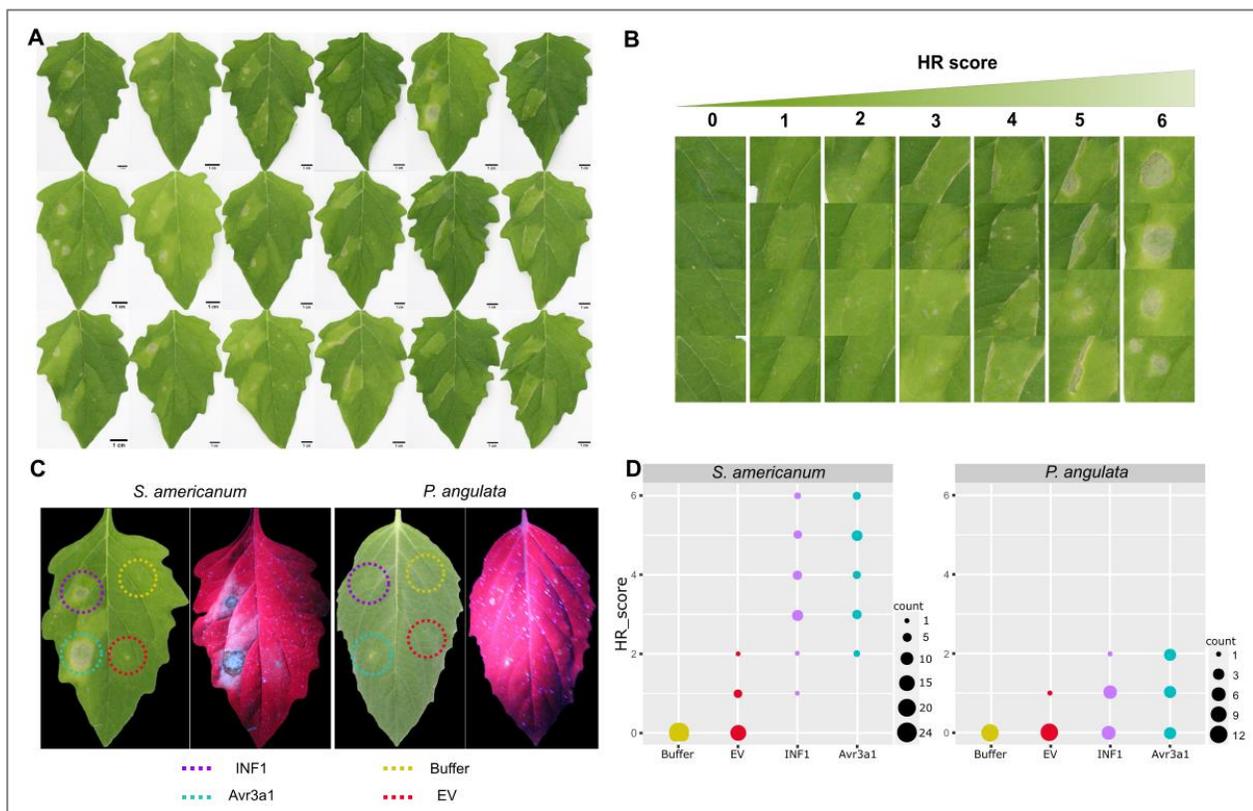


**Figura 7.** Análisis comparativo de las secuencias de genes efectores Avh y Avr de *P. infestans*, *P. sojae* y *P. capsici* con actividad de avirulencia conocida. **(A)** Árbol máxima verosimilitud del alineamiento de secuencias de la base de datos de NCBI de genes efectores Avh y Avr conocidos, realizado con PhyML y visualizado en Evolview. **(B)** Porcentaje de identidad de nucleótidos de las secuencias de efectores Avh y Avr conocidos contra los efectores de este estudio: Avr3a1, Avr1 y Avr1b. **(C)** Identificación de motivos conservados en las secuencias de genes efectores Avh y Avr, analizados mediante MEME Bioinformatics y visualizados con Evolview. Los colores diferentes indican motivos conservados. Las líneas punteadas marcan el límite de pares de bases.

## 8.5 El nivel de respuesta a la expresión del efector Avr3a1 de *P. capsici* supone diferente respuesta inmunitaria en dos especies solanáceas

Para verificar la respuesta inmunitaria de las plantas sobreexpresamos transitoriamente, por infiltración con *Agrobacterium*, dos genes indicadores de la respuesta de defensa de la planta. Para esto, utilizamos *S. americanum* y *P. angulata*, porque estas plantas mostraron respuestas contrastantes tanto en la acumulación de ROS como en muerte celular.

Implementamos la técnica de agroinfiltración con *A. tumefaciens* GV2260 con las construcciones de plásmidos pB7W2D con los genes INF1 y Avr3a1, previamente obtenidas en nuestro grupo de investigación. Se infiltró *Agrobacterium* en hojas de plantas de 4 semanas de edad, y evaluamos la respuesta a la expresión a los 7 días. Los experimentos de infiltración los repetimos al menos tres veces en *S. americanum* y solo dos veces en *P. angulata*, por el limitado número de plantas adecuadas para la expresión. Primero, se revisaron todas las fotografías tomadas de los fenotipos de la expresión de INF1 y Avr3a1 en las hojas infiltradas (**Figura 8A**), con esto definimos una escala de HR del 0 al 6, donde 0 indica ausencia de HR y 6 indica el nivel más alto de HR como se observa en la **Figura 8B**.



**Figura 8.** Respuesta hipersensible por la expresión de INF1 y Avr3a1 en las solanáceas silvestres *S. americanum* y *P. angulata*. **(A)** Imágenes representativas de los fenotipos de referencia para la escala de HR, evaluados a los 7 días. **(B)** Nivel de HR determinado por el alcance de la muerte celular inducida en los sitios de infiltración en una escala de 0 (sin muerte celular visible) a 6 (mayor grado de muerte celular). **(C)** Observaciones macroscópicas de los fenotipos de HR en hojas infiltradas de *S. americanum* y *P. angulata*, bajo luz visible y luz UV. **(D)** Visualización de los datos de índice de HR para INF1 y Avr3a1, comparados con los controles EV y el buffer. El HR\_score representa el conteo del número de datos que corresponden a cada nivel de HR.

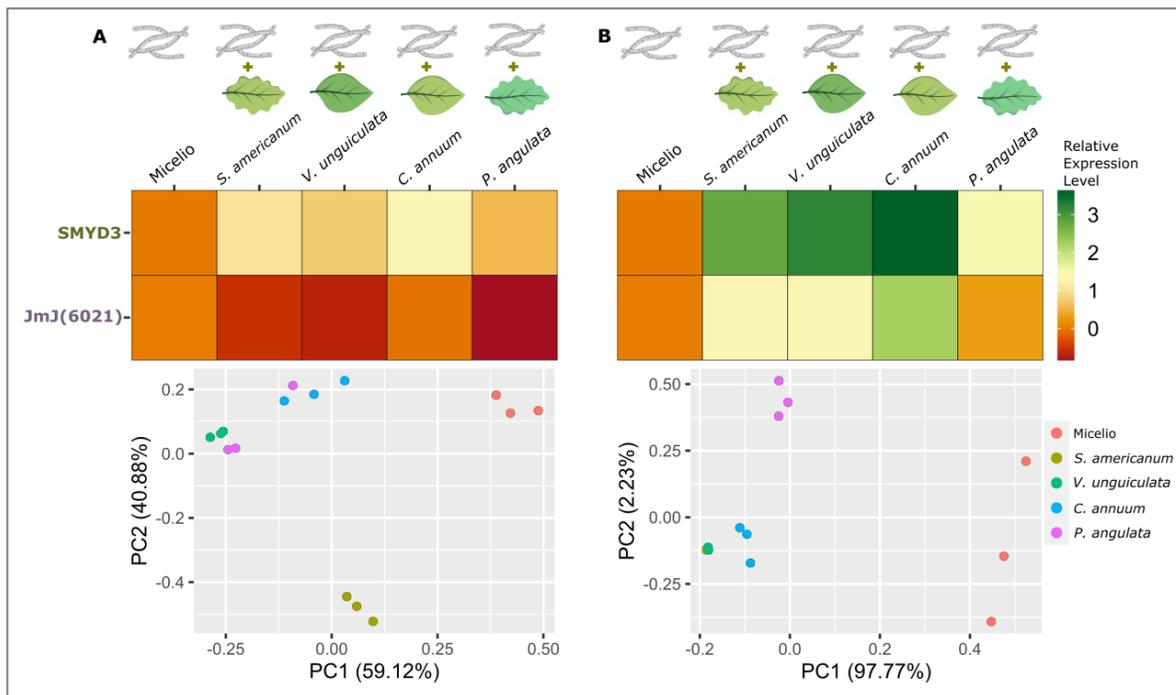
En la **Figura 8C**, se resaltan los fenotipos representativos del nivel de respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1 en *S. americanum* comparados con los de *P. angulata*. Los fenotipos observados mostraron que *S. americanum* tuvo una mayor respuesta a la expresión, tanto de INF1 como Avr3a1, puesto que la mayor parte de los datos indicaron respuestas con nivel de HR entre 2 y 6 de acuerdo con la escala diseñada, para ambos genes. Por el contrario, el nivel de respuesta observado en *P. angulata*, mostró valores mínimos o nula respuesta. La visualización de los datos de HR\_score se construyó con geompoint en ggplot2, haciendo un conteo del número de datos del nivel de HR que cae en cada score, lo que hace puntos pequeños o más grandes dependiendo del conteo (**Figura 8D**). Los controles incluidos fueron el “buffer” y el vector vacío, los cuales no mostraron respuesta en las hojas.

#### 8.6 Las interacciones planta-patógeno modulan los niveles de expresión de una metilasa y una desmetilasa de histonas

Exploramos la regulación epigenética de *P. capsici* para detectar diferencias que permitan comprender la relación entre las modificaciones epigenéticas en la cromatina y la regulación de la transcripción de genes durante el ciclo de infección. Determinamos por RT-qPCR, los niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021, una metilasa y una desmetilasa de histonas, respectivamente. Las cuales tienen como función regular el establecimiento de las trimetilaciones en la lisina 4 de la histona 3, conocida como marca epigenética H3K4me3. La expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021 de *P. capsici* la examinamos en cuatro interacciones con plantas y en el micelio.

Los datos de expresión relativa mostraron que, a las 48 hpi, SMYD3 se expresó más en todas las interacciones planta-patógeno, comparado con su expresión en el micelio. Entre las distintas interacciones se observó una mayor expresión de SMYD3 en *C. annuum* y una menor expresión en *P. angulata*, tanto a las 48 hpi como a las 72 hpi. Un comportamiento intrigante en los cambios en la expresión de SMYD3 fue que, a las 48 hpi se expresó más en *S. americanum* que en *V. unguiculata*, pero a las 72 hpi ocurrió lo contrario. Asimismo, el nivel de expresión de SMYD3 en *P. angulata* fue significativamente más bajo que en el resto de las interacciones.

En cuanto al nivel de expresión de JmJC6021, a las 48 hpi mostró menor expresión en las interacciones con *S. americanum*, *V. unguiculata* y *P. angulata*, comparado con el nivel de expresión en el micelio, sin embargo, en *C. annuum* mostró niveles de expresión similares que en el micelio. Por otra parte, a las 72 hpi, JmJC6021 se expresó más en todas las interacciones comparado con su expresión en el micelio. La mayor expresión de JmJC6021 se observó en *C. annuum* y la menor expresión en *P. angulata*, que fue incluso menor que en el micelio.



**Figura 9.** Niveles de expresión de SMYD3 y JmJC6021 de *P. capsici* en cuatro interacciones diferentes. (A) Niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021, a las 48 hpi, en las interacciones con *S. americanum*, *V. unguiculata*, *C. annuum* y *P. angulata*. (B), Niveles de expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021 a las 72 hpi. Los datos de fold change fueron transformados a  $\text{Log}_{10}$  para visualizar los niveles de expresión relativa en el mapa de calor. El PCA (abajo), muestra la variación de los datos de expresión relativa, para cada una de las muestras de interacción, representadas por puntos de diferente color dependiendo del hospedero en interacción con *P. capsici*.

De manera general, se observó que la regulación de la expresión de SMYD3 fue predominantemente alta en todas las interacciones planta-*P. capsici*, tanto a las 48 como a las 72 hpi. En cambio, la expresión de JmJC6021 estuvo regulada a la baja a las 48 hpi en todas las interacciones, pero no a las 72 hpi. Por lo tanto, la variación en los niveles de expresión relativa fue dependiente tanto del tiempo transcurrido como del tipo de interacción.

## 9 Discusión

Estudios previos han informado sobre lo complejas y dinámicas que son las interacciones de *P. capsici* con sus plantas hospederas, principalmente en las especies de cultivos. Sin embargo, del conocimiento previo sabemos que este fitopatógeno puede enfermar una amplia gama de hospederos causando daños graves (Erwin y Ribeiro, 1996; Hausbeck y Lamour, 2007; Granke *et al.*, 2012; Lamour *et al.*, 2012). En las plantas infectadas, el síntoma principal es el marchitamiento y la enfermedad puede progresar rápidamente hasta concluir en la muerte de la planta (Vega-Arreguín *et al.*, 2017). Pero pese a los esfuerzos realizados para detectar fuentes de resistencia genética en plantas de cultivo, estas son de limitadas a ausentes (Vega-Arreguín *et al.*, 2017).

Un enfoque poco explorado, al menos en *P. capsici*, es el estudio de la interacción con plantas silvestres relacionadas con los cultivos modernos, para tener un panorama más amplio en la comprensión de los mecanismos genéticos reguladores de la virulencia del patógeno, así como la resistencia genética a las enfermedades en especies poco estudiadas, que no están descritas o caracterizados completamente. En este estudio, nuestro objetivo fue analizar cuatro interacciones planta-*P. capsici* para explicar el comportamiento en la regulación de dos componentes de la virulencia del patógeno: i) la regulación de la expresión de efectores Avr, y ii) la regulación de dos genes que codifican para una metilasa y una desmetilasa de histona, implicadas en el establecimiento de modificaciones epigenéticas en la histona 3. Además, evaluamos las respuestas de defensa de la planta para detectar diferencias entre distintas interacciones. Nos planteamos la hipótesis de que las interacciones planta-patógeno constituyen distintos ambientes a los que *P. capsici* se tiene que adaptar para sobrevivir y completar su ciclo de vida, mediante la regulación de los componentes genéticos asociados con los mecanismos de virulencia y el control de la defensa de la planta. Esto determina características diferenciales en la regulación de la expresión de efectores y metilasas/desmetilasas de histonas, lo que se relaciona con los esfuerzos de *P. capsici* para prosperar en las plantas en las que se impone.

En los experimentos realizados evaluamos la evidencia obtenida para abordar las preguntas relacionadas con la hipótesis, primero, ¿Cómo se comporta la patogenicidad y virulencia de *P. capsici* en las cuatro especies de plantas?, ¿Cuáles características en el patógeno y en la respuesta de la planta difieren entre distintas interacciones? Luego, ¿Cómo el ambiente que constituye cada interacción modula la expresión génica del patógeno en el transcurso del tiempo?, y ¿Cómo distintos genotipos de plantas difieren en la respuesta de defensa?

Mediante la evaluación de la patogenicidad de *P. capsici* y los fenotipos de respuesta de las plantas, clasificamos las interacciones planta-patógeno según las categorías utilizadas por Maillot *et al.* (2022). Asignamos a *S. americanum* como una interacción compatible, al igual que *C. annuum*, porque ambas especies son susceptibles, aunque la respuesta inicial a la enfermedad en la planta parece ser fuerte. *V. unguiculata* y *P. angulata* como interacciones parcialmente incompatibles, ya que en estas especies *P. capsici* sobrevive, pero la infección no se desarrolla completamente o no progresa, esto quedó comprobado con el crecimiento micelial del tejido recuperado de las interacciones. En todos los casos creció micelio en los experimentos de morfología de colonia, con sus respectivas diferencias y modificaciones, pero, además las respuestas a la infección evaluadas con los ensayos de muerte celular y acumulación de ROS dan soporte a la clasificación (**Figura 4**). Estos resultados son consistentes con un estudio de Reis *et al.* (2018), dónde evaluaron la patogenicidad de *P. capsici* y obtuvieron que el genotipo de *S. americanum* que examinaron fue susceptible a 2 aislados y fue resistente otros 2. En el caso de *V. unguiculata*, ésta fue categorizada cómo no hospedero en los 4 aislados de *P. capsici* evaluados, en cambio, *P. angulata* fue no hospedero a 3 aislados y susceptible a solo 1 aislado.

Con las comparaciones de la virulencia de *P. capsici* mostradas en la **Figura 1** y la **Figura 2**, constatamos que el ambiente que constituye cada interacción influye en la patogenicidad, similar a lo que reportaron Lu *et al.* (2021) en interacciones con *P. infestans*. La interacción ejerce una presión que impacta en el crecimiento y desarrollo del patógeno, lo cual, se observó en la morfología de colonia y la producción de zoosporas.

Se detectó que la forma de la colonia micelial parece estar relacionada con el nivel de resistencia de la planta, ya que el espectro va de micelio estrellado en las interacciones con hospederos susceptibles a un micelio laxo sin forma estrellada en plantas más resistentes. El ambiente adverso en las plantas resistentes también impacta en la producción de zoosporas de *P. capsici*, lo que compromete la continuidad del ciclo de infección (**Figura 3C**). Lo que concuerda con lo reportado en la literatura, que el desarrollo y la morfología de *P. capsici* se comporta diferente dependiendo de los aislados o cepas, de los genotipos de plantas que infecta y de los tejidos de los que aísla (Gevens *et al.*, 2008; Quesada-Ocampo y Hausbeck, 2010; Lamour *et al.*, 2012; Rai *et al.*, 2020; Parada-Rojas *et al.*, 2021; Saltos *et al.*, 2021).

El análisis de expresión relativa de los genes efectores Avr exhibe una expresión diferencial entre las muestras de interacción y el tiempo transcurrido de la interacción. Los resultados muestran que, a las 48 horas, la expresión de Avr3a1 podría estar ligada a la virulencia del patógeno en hospederos compatibles y la susceptibilidad, dado que, se expresó más en la interacción con *C. annuum*. En *S. americanum* y *V. unguiculata* se determinaron niveles similares de Avr3a1 mayores al control y en *P. angulata* se expresó menos que en el micelio. En cambio, la expresión de Avr1 fue baja en todas las interacciones, comparadas con el micelio, lo cual sugiere que al menos a las 48 horas este gen no tiene una función esencial en la infección, aunque sigue el mismo patrón que Avr3a1 que se expresa más en las interacciones compatibles que en las parcialmente incompatibles (**Figura 5**). En contraste con la expresión relativa de Avr1b a las 48 horas, que se expresa mayormente en las dos interacciones parcialmente incompatibles (*V. unguiculata* y *P. angulata*), pero en menor nivel en los hospederos susceptibles (*S. americanum* y *C. annuum*), lo que sugiere que Avr1b se regula para contribuir a los esfuerzos de la actividad efectora en interacciones con no hospederos.

También mostramos que, a las 72 horas, la regulación de los efectores experimentó un cambio dramático en los niveles de expresión en algunos hospederos, pero no en otros. La expresión de Avr3a1 incrementó en *C. annuum*, y en el resto de las interacciones se expresó en niveles similares, menos que en *C. annuum*, pero más que en el micelio.

Nuevamente, a las 72 horas, Avr1 al igual que Avr3a1 se expresó más en *C. annuum*, pero no en las otras interacciones. En cambio, Avr1b mostró niveles de expresión mayores en *V. unguiculata*. Con esto, se puede inferir lo siguiente: primero, que la expresión de Avr3a1 incrementa con el transcurso del tiempo de interacción y que juega un rol esencial en la infección, durante todo el proceso de desarrollo de la enfermedad principalmente en hospederos susceptibles, pero no exclusivamente, esto concuerda con los resultados que informaron Vega-Arreguín *et al.* (2014). Segundo, que Avr1 parece no tener una función esencial a las 48 hpi, pero sí a las 72 hpi, específicamente en *C. annuum*, un hospedero susceptible, posiblemente para favorecer la necrotrofia (**Figura 6**). Y tercero, que la expresión de Avr1b está asociada a la actividad efectora en interacciones parcialmente incompatibles o no hospederas, que de cierto modo contribuye a los esfuerzos de *P. capsici* para sobrevivir.

Ahora, desde el contexto de las respuestas de defensa de la planta, evaluamos la expresión de INF1, un PAMP que activa la respuesta inmunitaria de tipo PTI en algunos genotipos de plantas (Kamoun *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2015; Derevnina *et al.*, 2016). Así como la expresión de Avr3a1, un efector de tipo Avr que es capaz de desencadenar la respuesta de defensa por HR probablemente por la vía de inmunidad ETI al ser reconocido por el gen R3a de la planta, esto está reportado en la interacción *P. infestans*-*N. benthamiana* (Armstrong *et al.*, 2005; Bos *et al.*, 2010). Con la expresión de estos genes, obtuvimos que *S. americanum* mostró una respuesta similar a HR, con niveles similares en la expresión de INF1 y Avr3a1 de *P. capsici* (**Figura 8C**), pero en *P. angulata* no se observó respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1. Este análisis reveló que es posible que *S. americanum* pueda reconocer INF1 y Avr3a1 y, en consecuencia, activa una respuesta inmunitaria fuerte expresada como un fenotipo similar a HR. Las características de la HR en los sitios de infiltración de INF1 y Avr3a1 indican que por la confluencia del fenotipo es más probable que se deba al reconocimiento inmunitario que a la toxicidad del efector. Sin embargo, otra posibilidad es la suma de un sistema inmune fuerte más la presencia de componentes de la resistencia basal o receptores inmunes que pueden reconocer INF1 y Avr3a1. Lo cual tiene mayor soporte por los niveles similares de HR en INF1 y Avr3a1, los datos muestran que en *S. americanum* la PTI puede ser tan fuerte como la ETI.

En cambio, en *P. angulata* no hubo respuesta a la expresión de INF1 y Avr3a1, posiblemente, se debe al tipo de interacción parcialmente incompatible, ya que la planta puede tener mecanismos de activación de PTI y ETI, diferentes del reconocimiento de INF1 y Avr3a1. Ya sea porque no posee los receptores requeridos para el reconocimiento inmunitario, tal vez porque se trata de interacciones poco comunes en la naturaleza o porque tiene componentes genéticos de la resistencia basal fuertes, o simplemente el patógeno no está adaptado al hospedero.

Además, que *S. americanum* puede reconocer componentes moleculares de *P. capsici*, lo que es un indicador de que no se trata de una interacción poco común como en muchas solanáceas. Estudios en *S. americanum*, informaron que algunos NLR conservados de esta planta pueden reconocer efectores de patógenos confiriendo resistencia a las enfermedades (Lin *et al.*, 2021; Witek *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022; Lin, Olave-Achury, *et al.*, 2022). Otros estudios resaltan que *S. americanum* es un reservorio de fuentes naturales valiosas de resistencia genética a enfermedades causadas por *P. infestans* y *Ralstonia solanacearum* (Moon *et al.*, 2021; Witek *et al.*, 2021). Cabe señalar, que la fuerte activación de la respuesta inmune en *S. americanum* contrasta con la susceptibilidad a *P. capsici* descrita aquí, ya que se esperaría que por tener un sistema inmune fuerte para combatir al patógeno no desarrollaría la enfermedad. Por ello, aquí proponemos que el patógeno encontró un nicho de oportunidad en una planta relacionada con sus hospederos preferidos como el chile, y aprovecha que sabe moverse hacia los componentes de susceptibilidad que no le son para nada desconocidos, desactivando la respuesta de defensa de la planta que consecuentemente revierte la resistencia a susceptibilidad.

Al igual que como se describe en una serie de informes sobre la investigación de *S. americanum*, el espectro de inmunidad difiere dependiendo de la cepa y especie de *Phytophthora*, así como de los genotipos evaluados (Witek *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2022; Lin *et al.*, 2022). Las fuentes genéticas de resistencia de *S. americanum* están mejor caracterizadas en *P. infestans*, y hay informes escasos sobre la interacción con *P. capsici*.

En este estudio, describimos la interacción compatible entre *P. capsici* y *S. americanum*, exponemos evidencias de una fuerte respuesta de defensa, pero una reversión de la resistencia a susceptibilidad. Además, establecemos que *S. americanum* y *P. angulata* pueden ser excelentes modelos de estudio de inmunidad de las plantas y la interacción planta-*Phytophthora*.

La rápida adaptación a una especie silvestre como *S. americanum* puede explicarse por una afinidad por las plantas de la familia de las solanáceas emparentadas con el chile. Pero además, indica que en las plantas silvestres de este tipo, los patógenos pueden sobrevivir utilizándolos como hospederos intermedios hasta instalarse en plantas de cultivo, teniendo en cuenta que las malezas prevalecen por más tiempo en las poblaciones naturales (Deahl *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2018). Por otra parte, en las especies silvestres relacionadas con los cultivos modernos, como la fabácea *V. unguiculata* y las solanáceas *C. annuum* var *Glabriusculum*, *P. angulata* y *S. americanum* pueden ser útiles para identificar fuentes genéticas novedosas de resistencia que puedan transferirse a las plantas de cultivo, como lo plantearon Lin *et al.* (2021). Esto aportaría al desarrollo de estrategias más eficaces para hacer frente a las enfermedades de las plantas.

Adicionalmente, en este trabajo analizamos la regulación epigenética de *P. capsici*, partimos de la idea de que una metilasa y una desmetilasa de histonas podrían estar relacionadas con el establecimiento de la marca epigenética H3K4me3. Esta marca epigenética consiste en trimetilación en la lisina 4 de la histona 3, y se asocia con activación transcripcional de ciertas regiones genómicas. Para este análisis determinamos la expresión relativa de JmJC6021 y SMYD3 que codifican enzimas modificadoras de cola de histona para H3K4me3. Los resultados muestran que los niveles de expresión relativa de la metilasa SMYD3 contrasta con la expresión de la desmetilasa JmJC6021, en todas las interacciones planta-patógeno, tanto a las 48 horas (**Figura 9A**), como a las 72 hpi (**Figura 9B**) del transcurso de la interacción.

Inferimos que los niveles de expresión relativa son indicadores del nivel de transcripción de SMYD3 y JmJC6021, que se traducirán a enzimas modificadoras, y que en ese mismo patrón relativo se establece H3K4me3 sobre los genes en los que ejerce acción activadora de la transcripción. Obtuvimos que, tanto a las 48 hpi como a las 72 hpi se observó el mismo patrón de expresión, la mayor expresión relativa de SMYD3 y JmJC6021 se determinó en la interacción de *P. capsici* con *C. annuum*, mientras que *V. unguiculata* y *S. americanum* mostraron niveles similares de expresión de SMYD3 y JmJC6021. Los niveles más bajos de expresión de ambos genes se observaron en la interacción con *P. angulata* comparado con el resto de las interacciones. También, los niveles de expresión de SMYD3 fueron significativamente mayores a las 72 hpi comparado con las 48 hpi.

De manera general, resulta interesante que los niveles de regulación epigenética en *C. annuum* son significativamente mayores. Al parecer, esto se correlaciona con la compatibilidad de la interacción, pero también con la etapa de infección. Ya que la activación de los genes que están bajo influencia de la marca H3K4me3 posiblemente requieren activarse más a las 72 hpi, cuando ya está establecida la necrotrofia. Lo que ocurre diferente en *P. angulata*, que mantiene niveles bajos de SMYD3 y JmJC6021, probablemente porque en una interacción parcialmente incompatible más restrictiva para *P. capsici* no se requiere la activación sino el silenciamiento de genes con una marca epigenética de represión para no ser detectado y escapar al reconocimiento. Como ocurre naturalmente con la regulación epigenética de Avr1b de *P. sojae* bajo la marca de represión H3K27me3 (Wang *et al.*, 2020). Otro ejemplo, es la marca epigenética H3K36me3 que se asocia con la activación de la expresión del efector PsKMT3 de *P. sojae* (Chen *et al.*, 2023).

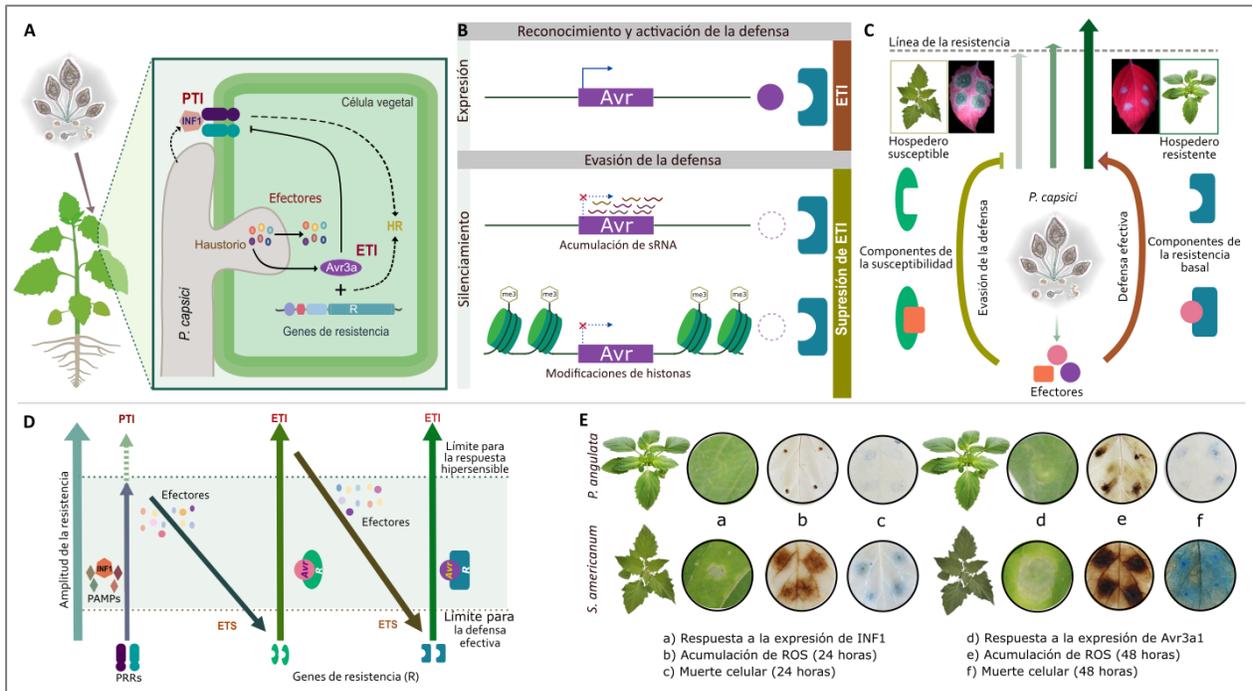
Este estudio sugiere que una marca de activación H3K36me3 de dominio SET guía la activación de un efector, algo como lo que se exploró superficialmente en este estudio, en busca de implicaciones en el proceso de establecimiento de modificaciones epigenéticas que se superponen a la regulación efectora. Lo que resulta interesante es que la metilasa SMYD3 explorada en este estudio, cuenta con un dominio SET y, también se relacionó con la activación transcripcional (Rojas-Rojas y Vega-Arreguín, 2021).

Por lo que, aún queda por determinar qué genes están bajo regulación de la marca epigenética H3K4me3 establecida por la actividad de SMYD3 en *P. capsici*. El comportamiento diferencial en la regulación de la virulencia de *P. capsici*, modulada por el ambiente que impone cada hospedero, resulta útil para estudiar la regulación efectora y la regulación epigenética del patógeno en la adaptación al hospedero y para detectar posibles mecanismos que regulen la adaptación del patógeno y posiblemente la expansión del rango de hospederos. Queda por examinar la relación de la marca epigenética H3K4me3 sobre la regulación efectora cuando *P. capsici* interactúa con plantas que no se reconocen como hospederos preferidos, ya que esta marca epigenética se ha relacionado con la regulación de la virulencia de diferentes patógenos filamentosos.

Existen varios estudios en los cuales se examinaron las modificaciones epigenéticas mediadas por metilasas y desmetilasas de histonas relacionadas con la marca epigenética H3K4 en hongos fitopatógenos. En *Magnaporthe oryzae*, *Penicillium expansum*, *Colletotrichum higginsianum*, *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium graminearum*, está reportado que la eliminación de metilación por enzimas con dominio SET generó defectos en el crecimiento micelial, la formación de estructuras reproductivas y de infección, así como efectos negativos en la colonización, la adaptación al estrés y, consecuentemente, en la patogenicidad y virulencia de los fitopatógenos (Pham *et al.*, 2015; Studt *et al.*, 2017; Dallery *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2023). Otros estudios sobre la desmetilación de H3K4me3 informaron que las desmetilasas de la misma familia que JmJC6021, regulan negativamente la transcripción de genes relacionados con el desarrollo y el metabolismo secundario (Gacek-Matthews *et al.*, 2016; Bachleitner *et al.*, 2019; Schumacher *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2020b). Lo que está estrechamente relacionado con la virulencia y los procesos de infección.

La interacción planta patógeno es una lucha constante, y es el escenario de presión selectiva para los componentes inmunitarios del hospedero en la carrera armamentista planta-patógeno y para los efectores del patógeno, ya que los ciclos continuos de interacción (enfermedad y resistencia) se favorecen por los efectores patógenos que promueven la enfermedad ETI-ETS (Dong y Ma, 2021).

Debido a esto, la ETI ejerce una presión selectiva sobre los patógenos para modificar o perder efectores reconocidos y así escapar del reconocimiento. Mientras que la ETS ejerce presión selectiva sobre la planta hospedera para reconocer nuevos efectores (Dong y Ma, 2021; Wang *et al.*, 2022).



**Figura 10.** Modelos de los principales mecanismos para la resistencia y susceptibilidad en la interacción planta-patógeno. **(A)** Un diagrama ilustrativo de la interacción molecular planta-*P. capsici*. **(B)** Diagrama de algunos mecanismos del patógeno para evadir la respuesta de defensa de la planta y promover la enfermedad por *P. capsici*. **(C)** Un posible modelo sobre cómo funciona el mecanismo de defensa en un hospedero susceptible y otro resistente. **(D)** Modelo "zigzag" de Jones y Dangl, que representa los principios involucrados en los mecanismos de virulencia de los patógenos y la inmunidad de las plantas. **(E)** Evidencia de rasgos fenotípicos examinados en dos genotipos de solanáceas silvestres, *P. angulata* (arriba) y *S. americanum* (abajo). La figura fue creada con ayuda de Biorender.com e Inkscape.

En la **Figura 10** resumimos nuestros resultados. En diferentes interacciones el patógeno se autorregula y hace uso de sus mecanismos moleculares para infectar a las plantas (**Figura 10A**). Luego, sabemos que existen mecanismos como las modificaciones epigenéticas de las histonas que favorecen el escape de patógeno a la defensa de la planta (**Figura 10B**), pero esto depende del tipo de interacción. En la **Figura 10C** se muestran los distintos tipos de interacción con flechas de diferentes colores y la línea punteada en la parte superior representa el límite para la resistencia.

Los hospederos susceptibles no son capaces de pasar la línea para la resistencia, los parcialmente incompatibles algunos, pasan la línea y pueden sobrevivir dependiendo de la fuerza de los componentes de la inmunidad basal. En cambio, las interacciones incompatibles logran la resistencia completa, apoyado por el modelo “zig-zag” de la respuesta inmune de Jones y Dangl (2006) de la planta (**Figura 10D**). Y en la **Figura 10E** se resaltan algunas evidencias de diferentes niveles de respuesta a la interacción con *P. capsici* de dos especies de plantas solanáceas, propuestas con base en nuestros resultados, para futuros estudios de los componentes genéticos de la resistencia hospedera y no hospedera.

## 10 Conclusiones

En este estudio, constatamos que las cuatro interacciones analizadas constituyen distintos ambientes, unos más restrictivos que otros, lo que determina los esfuerzos de *P. capsici* para prosperar en las plantas en las que se impone. En su mayoría, nuestros experimentos representan una evaluación cuantitativa que nos permitió identificar cambios tanto en la regulación del patógeno como en los procesos del hospedero en el transcurso de la interacción. El planteamiento de evaluar los reguladores de la virulencia (efectores) y la regulación epigenética nos permitió examinar en el transcurso de la interacción los patrones de expresión génica del patógeno.

Dada la importancia de comprender los mecanismos que usa *P. capsici* para ganar patogenicidad en las plantas hospederas y no hospederas, los aportes de este trabajo, resultan relevantes para el estudio de este patógeno, de modo que, estos sean útiles para ampliar el conocimiento de la regulación molecular de la virulencia en la interacción planta-patógeno y explicar la rápida adaptación a sus hospederos y a los cambios ambientales.

En las especies de cultivos domesticados raras veces se encuentran fuentes genéticas de resistencia a patógenos, de hecho, pocas plantas dentro de la familia de las solanáceas se han encontrado que sean resistentes a *P. capsici*, en este trabajo presentamos evidencias de que *P. angulata* posee una defensa efectiva para resistir a la infección del patógeno. Por ello, ampliamos la búsqueda en especies silvestres relacionadas con los cultivos modernos como fuentes de resistencia. Mediante la disección de los componentes de la resistencia hospedera y no hospedera en respuesta a la interacción de *P. capsici* con diferentes especies de plantas silvestres, aprovechando la resistencia y el acervo de variación natural de las plantas no-hospederas.

*S. americanum* se considera una especie no hospedera de *P. infestans* y en estudios previos ha sido propuesta como un sistema modelo interesante para estudiar la inmunidad de las plantas. Se ha determinado el reconocimiento exitoso de efectores de avirulencia de *Phytophthora* por parte de genes Rpi-amr de resistencia, lo que culmina en una resistencia completa. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que a pesar

del sistema inmune robusto que posee *S. americanum*, durante la interacción con *P. capsici* D3 este logra vencerlo y se abre paso para desarrollar la infección.

A pesar del rompimiento de la resistencia, consideramos que *S. americanum* colectada localmente y crecida en el laboratorio, puede ser una planta modelo potencialmente útil para estudiar los componentes de la inmunidad hospedera y no hospedera a *P. capsici*, y en otras especies de *Phytophthora*. Para comprender cómo se da la adaptación del patógeno a nuevos hospederos, al mismo tiempo que se investiga la sobrevivencia en hospederos intermedios antes de establecerse la enfermedad en los cultivos agrícolas.

Queda por explorar entre la lista de efectores de avirulencia de *P. capsici* diferentes a Avr3a1 caracterizados o candidatos, para evaluar si son capaces de activar la respuesta inmune e inducir HR. Así como, abordar las nuevas preguntas que surgen, por ejemplo, si Avr1b tiene una función crucial en la regulación efectora en las especies de plantas no hospederas.

## 11 Referencias

- Armstrong, M. R., *et al.* (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *PNAS*, *102*(21), 7766–7771. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500113102>.
- Bachleitner, S., Sørensen, J. L., Gacek-Matthews, A., Sulyok, M., Studt, L., and Strauss, J. (2019). Evidence of a demethylase-independent role for the H3K4-specific histone demethylases in *Aspergillus nidulans* and *Fusarium graminearum* secondary metabolism. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1759. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01759>
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., and Bosland, P. W. (2018). Challenges and Strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, *0*, 628. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00628>
- Białas, A., *et al.* (2018). Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *31*(1), 34–45. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-17-0196-FI>.
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S. C., Kamoun, S., and Birch, P. R. J. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *PNAS*, *107*(21), 9909–9914. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914408107>.
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Banfield, M. J., and Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(4), 483–492. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2012.03.008>.
- Chen, H., Fang, Y., Song, W., Shu, H., Li, X., Ye, W., Wang, Y., and Dong, S. (2023). The SET domain protein PsKMT3 regulates histone H3K36 trimethylation and modulates effector gene expression in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/MPP.13301>.

- Chen, H., Raffaele, S., and Dong, S. (2021). Silent control: microbial plant pathogens evade host immunity without coding sequence changes. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4). <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAB002>.
- Chen, J., Zhao, Y., Luo, X., Hong, H., Yang, T., Huang, S., Wang, C., Chen, H., Qian, X., Feng, M., Chen, Z., Dong, Y., Ma, Z., Li, J., Zhu, M., He, S. Y., Dinesh-Kumar, S. P., and Tao, X. (2022). NLR surveillance of pathogen interference with hormone receptors induces immunity. *Nature*, 613:7942, 613(7942), 145–152. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05529-9>.
- Corwin, J. A., and Kliebenstein, D. J. (2017). Quantitative resistance: more than just perception of a pathogen. *The Plant Cell*, 29(4), 655–665. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00915>.
- Couto, D., and Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16:9, 16(9), 537–552. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>.
- Cowger, C., and Brown, J. K. M. (2019). Durability of quantitative resistance in crops: greater than we know? *Annual Review of Phytopathology*, 57, 253–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100016>.
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 487–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>.
- D’Arcy. (2001). Illustrated Glossary of Plant Pathology. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2001-0219-01>
- Dallery, J.-F., Adelin, É., Goff, G. Le, Pigné, S., Auger, A., Ouazzani, J., and O’Connell, R. J. (2019). H3K4 trimethylation by CclA regulates pathogenicity and the production of three families of terpenoid secondary metabolites in *Colletotrichum higginsianum*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 831–842. <https://doi.org/10.1111/MPP.12795>.

- Daudi, A., and O'Brien, J. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in Arabidopsis Leaves. *BIO-PROTOCOL*, 2(18). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.263>.
- De La Torre S., J. F., González S., R., Cruz G., E. J., Pichardo G., J. M., Quintana C., M., Contreras T., A. R., and Cadena I., J. (2018). Crop wild relatives in Mexico: An overview of richness, importance, and conservation status. *North American Crop Wild Relatives: Conservation Strategies*, 1, 63–96. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95101-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95101-0_3).
- Deahl, K. L., Shaw, D. S., and Cooke, L. R. (2004). Natural occurrence of *Phytophthora infestans* on Black Nightshade ( *Solanum nigrum* ) in Wales . *Plant Disease*, 88(7), 771–771. <https://doi.org/10.1094/pdis.2004.88.7.771a>.
- Derevnina, L., Dagdas, Y. F., De la Concepcion, J. C., Bialas, A., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Du, J., Wu, C. H., Lin, X., Aguilera-Galvez, C., Cruz-Mireles, N., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Kamoun, S. (2016). Nine things to know about elicitors. *New Phytologist*, 212(4), 888–895. <https://doi.org/10.1111/NPH.14137>.
- Dong, S., and Ma, W. (2021). How to win a tug-of-war: the adaptive evolution of Phytophthora effectors. *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 62, p. 102027). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102027>.
- Du, J., et al. (2015). Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature Plants*, 1(4), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.34>.
- Dubey, A., and Jeon, J. (2017). Epigenetic regulation of development and pathogenesis in fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 18(6), 887–898. <https://doi.org/10.1111/MPP.12499>.
- Dunn, A. R., and Smart, C. D. (2015). Interactions of *Phytophthora capsici* with resistant and susceptible pepper roots and stems. *Phytopathology*, 105(10), 1355–1361. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0045-R>.

- Ekanayake, G., Gohmann, R., and Mackey, D. (2022). A method for quantitation of apoplast hydration in Arabidopsis leaves reveals water-soaking activity of effectors of *Pseudomonas syringae* during biotrophy. *Scientific Reports* 2022 12:1, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22472-x>.
- Erwin, D. C. (Donald C. ., and Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora diseases worldwide*. 562.
- Fan, G., Yang, Y., Li, T., Lu, W., Du, Y., Qiang, X., Wen, Q., and Shan, W. (2018). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits a plant PPlase to suppress endoplasmic reticulum-mediated immunity. *Molecular Plant*, 11(8), 1067–1083. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2018.05.009>.
- Fawke, S., Doumane, M., and Schornack, S. (2015). Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263–280. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-15>.
- Fernández-Bautista, N., Domínguez-Núñez, J., Moreno, M. M., and Berrocal-Lobo, M. (2016). Plant tissue Trypan Blue staining during phytopathogen infection. *BIO-PROTOCOL*, 6(24). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.2078>.
- French-Monar, R. D., Jones, J. B., and Roberts, P. D. (2006). Characterization of *Phytophthora capsici* associated with roots of weeds on Florida vegetable farms. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0345>.
- Gacek-Matthews, A., Berger, H., Sasaki, T., Wittstein, K., Gruber, C., Lewis, Z. A., and 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. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006222>.
- Gevens, A. J., Donahoo, R. S., Lamour, K. H., and Hausbeck, M. K. (2008). Characterization of *Phytophthora capsici* causing foliar and pod blight of snap bean in Michigan. *Plant Disease*, 92(2), 201–209. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0201>.

- Goettsch, B., *et al.* (2021). Extinction risk of Mesoamerican crop wild relatives. *Plants, People, Planet*, 3(6), 775–795. <https://doi.org/10.1002/PPP3.10225>.
- Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M. A., and Rivero, A. (2012). Epigenetics of host–pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLOS Pathogens*, 8(11), e1003007. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003007>.
- Goss, E. M., Press, C. M., and Grünwald, N. J. (2013). Evolution of RXLR-class effectors in the oomycete plant pathogen *Phytophthora ramorum*. *PLOS ONE*, 8(11), e79347. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079347>.
- Granke, L. L., Quesada-Ocampo, L., Lamour, K., and Hausbeck, M. K. (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. *Plant Disease*, 96(11), 1588–1600. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0211-FE>.
- Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307–321. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYQ010>.
- Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. (2007). *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant disease*, 88(12), 1292–1303. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1292>.
- Hogenhout, S. A., Van Der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R., and Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(2), 115–122. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>.
- Hou, J., Feng, H.-Q., Chang, H.-W., Liu, Y., Li, G.-H., Yang, S., Sun, C.-H., Zhang, M.-Z., Yuan, Y., Sun, J., Zhu-Salzman, K., Zhang, H., and Qin, Q.-M. (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. <https://doi.org/10.1111/NPH.16200>.

- Hu, Y., Ding, Y., Cai, B., Qin, X., Wu, J., Yuan, M., Wan, S., Zhao, Y., and Xin, X. F. (2022). Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast. *Cell Host y Microbe*, 30(4), 518-529.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2022.02.002>.
- Huang, J., Gu, L., Zhang, Y., Yan, T., Kong, G., Kong, L., Guo, B., Qiu, M., Wang, Y., Jing, M., Xing, W., Ye, W., Wu, Z., Zhang, Z., Zheng, X., Gijzen, M., Wang, Y., and Dong, S. (2017). An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/S41467-017-02233-5>.
- Janevska, S., Güldener, U., Sulyok, M., Tudzynski, B., and 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. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14339>.
- Jiang, R. H. Y., Tripathy, S., Govers, F., and Tyler, B. M. (2008). RXLR effector reservoir in two Phytophthora species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *PNAS*, 105(12), 4874–4879. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709303105>.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:7117, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/NATURE05286>.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A. J. M., Morris, J. A., Zhang, R., Hedley, P. E., and 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. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r63>.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 41–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>.
- Kamoun, S., et al. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413–434. <https://doi.org/10.1111/MPP.12190>.

- Kamoun, S., Van West, P., Vleeshouwers, V. G. A. A., De Groot, K. E., and Govers, F. (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *The Plant Cell*, *10*(9), 1413–1425. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.9.1413>.
- Lajeunesse, G., Roussin-Léveillé, C., Boutin, S., Fortin, É., Laforest-Lapointe, I., and Moffett, P. (2023). Light prevents pathogen-induced aqueous microenvironments via potentiation of salicylic acid signaling. *Nature Communications*, *2023 14:1*, *14*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36382-7>.
- Lamour, K. H., 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0028-R>.
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., and Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>.
- Lefort, V., Longueville, J. E., and Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(9), 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX149>.
- Lemmon, Z. H., Reem, N. T., Dalrymple, J., Soyk, S., Swartwood, K. E., Rodriguez-Leal, D., Van Eck, J., and Lippman, Z. B. (2018). Rapid improvement of domestication traits in an orphan crop by genome editing. *Nature Plants*, *4:10*, *4*(10), 766–770. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0259-x>.
- Leonian, L. H. (1922). Stem and fruit blight of Peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. *Phytopathology*, *12:9* 401-408.
- Li, Q., Chen, Y., Wang, J., Zou, F., Jia, Y., Shen, D., Zhang, Q., Jing, M., Dou, D., and Zhang, M. (2019). A *Phytophthora capsici* virulence effector associates with NPR1 and suppresses plant immune responses. *Phytopathology Research 2019 1:1*, *1*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S42483-019-0013-Y>.

- Li, Q., Wang, J., Bai, T., Zhang, M., Jia, Y., Shen, D., Zhang, M., and Dou, D. (2020). A *Phytophthora capsici* effector suppresses plant immunity via interaction with EDS1. *Molecular Plant Pathology*, 21(4), 502–511. <https://doi.org/10.1111/MPP.12912>.
- Liang, X., Bao, Y., Zhang, M., Du, D., Rao, S., Li, Y., Wang, X., Xu, G., Zhou, Z., Shen, D., Chang, Q., Duan, W., Ai, G., Lu, J., Zhou, J., and Dou, D. (2021). A *Phytophthora capsici* RXLR effector targets and inhibits the central immune kinases to suppress plant immunity. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.17573>.
- Lin, X., *et al.* (2022). The *Solanum americanum* pangenome and effectoromics reveal new resistance genes against potato late blight. *BioRxiv*, 2022.08.11.503608. <https://doi.org/10.1101/2022.08.11.503608>.
- Lin, X., Olave-Achury, A., Heal, R., Pais, M., Witek, K., Ahn, H. K., Zhao, H., Bhanvadia, S., Karki, H. S., Song, T., Wu, C. hang, Adachi, H., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Jones, J. D. G. (2022). A potato late blight resistance gene protects against multiple *Phytophthora* species by recognizing a broadly conserved RXLR-WY effector. *Molecular Plant*, 15(9), 1457–1469. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2022.07.012>.
- Lin, X., Olave-Achury, A., Heal, R., Witek, K., Karki, H. S., Song, T., 1#, C.-H. W., 1#, H. A., Kamoun, S., Vleeshouwers, V. G. A. A., and Jones, J. D. G. (2021). Rpi-amr3 confers resistance to multiple *Phytophthora* species by recognizing a conserved RXLR effector. *BioRxiv*, 2021.06.10.447899. <https://doi.org/10.1101/2021.06.10.447899>
- Lu, J., Liu, T., Zhang, X., Li, J., Wang, X., Liang, X., Xu, G., Jing, M., Li, Z., Hein, I., Dou, D., Zhang, Y., and Wang, X. (2021). Comparison of the distinct, host-specific response of three Solanaceae hosts induced by *Phytophthora infestans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11000. <https://doi.org/10.3390/IJMS222011000/S1>.
- Lu, Y., and Tsuda, K. (2020). Intimate association of PRR- and NLR-mediated signaling in plant immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34(1), 3–14. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0239-IA>.

- Maillot, G., Szadkowski, E., Massire, A., Brunaud, V., Rigail, G., Caromel, B., Chadœuf, J., Bachellez, A., Touhami, N., Hein, I., Lamour, K., Balzergue, S., and Lefebvre, V. (2022). Strive or thrive: Trends in *Phytophthora capsici* gene expression in partially resistant pepper. *Frontiers in Plant Science*, 13, 4432. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.980587/BIBTEX>
- Martel, A., Ruiz-Bedoya, T., Breit-McNally, C., Laflamme, B., Desveaux, D., and Guttman, D. S. (2021). The ETS-ETI cycle: evolutionary processes and metapopulation dynamics driving the diversification of pathogen effectors and host immune factors. *Current Opinion in Plant Biology*, 62, 102011. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2021.102011>.
- Martínez, M., Vargas-Ponce, O., and Zamora-Tavares, P. (2023). Taxonomic revision of *Physalis* in Mexico. *Frontiers in Genetics*, 14, 379. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2023.1080176>.
- Moon, H., Pandey, A., Yoon, H., Choi, S., Jeon, H., Prokchorchik, M., Jung, G., Witek, K., Valls, M., McCann, H. C., Kim, M. S., Jones, J. D. G., Segonzac, C., and Sohn, K. H. (2021). Identification of RipAZ1 as an avirulence determinant of *Ralstonia solanacearum* in *Solanum americanum*. *Molecular Plant Pathology*, 22(3), 317–333. <https://doi.org/10.1111/MPP.13030>.
- Na, R., and Gijzen, M. (2016). Escaping host immunity: new tricks for plant pathogens. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005631. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005631>.
- Ngou, B. P. M., Ahn, H.-K., Ding, P., and Jones, J. D. G. (2021). Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature*, 592:7852, 592(7852), 110–115. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03315-7>.
- Oyatomi, O., Fatokun, C., Boukar, O., Abberton, M., and Ilori, C. (2016). Screening wild *Vigna* species and cowpea ( *Vigna unguiculata* ) landraces for sources of resistance to *Striga gesnerioides*. *Enhancing Crop Genepool Use: Capturing Wild Relative and Landrace Diversity for Crop Improvement*, 27–31. <https://doi.org/10.1079/9781780646138.0027>.

- Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, 183(1), 190–199. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2009.02827.X>.
- Panstruga, R., and Moscou, M. J. (2020). What is the molecular basis of nonhost resistance? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(11), 1253–1264. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-20-0161-CR>.
- Parada-Rojas, C. H., Granke, L. L., Naegele, R. P., Hansen, Z., Hausbeck, M. K., Kousik, C. S., McGrath, M. T., Smart, C. D., and Quesada-Ocampo, L. M. (2021). A diagnostic guide for *Phytophthora capsici* infecting vegetable crops. *Plant Health Progress*, 22(3), 1–11. <https://doi.org/10.1094/PHP-02-21-0027-FI>.
- Peng, Y., Van Wersch, R., and Zhang, Y. (2018). Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(4), 403–409. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0145-CR>
- Petre, B., Contreras, M. P., Bozkurt, T. O., Schattat, M. H., Sklenar, J., Schornack, S., Abd-El-Halim, A., Castells-Graells, R., Lozano-Durán, R., Dagdas, Y. F., Menke, F. L. H., Jones, A. M. E., Vossen, J. H., Robatzek, S., Kamoun, S., and Win, J. (2021). Host-interactor screens of *Phytophthora infestans* RXLR proteins reveal vesicle trafficking as a major effector-targeted process. *The Plant Cell*, 33(5), 1447–1471. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab069>.
- Pham, K. T. M., Inoue, Y., Vu, B. Van, Nguyen, H. H., Nakayashiki, T., Ikeda, K., and Nakayashiki, H. (2015). MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. *PLOS Genetics*, 11(7), e1005385. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1005385>.
- Pruitt, R. N., Gust, A. A., and Nürnberger, T. (2021). Plant immunity unified. *Nature Plants*, 7:4, 7(4), 382–383. <https://doi.org/10.1038/S41477-021-00903-3>.

- Quesada-Ocampo, L. M., and Hausbeck, M. K. (2010). Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 100(6), 619–627. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0619>.
- Qutob, D., Patrick Chapman, B., and Gijzen, M. (2013). Transgenerational gene silencing causes gain of virulence in a plant pathogen. *Nature Communications* 2013 4:1, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS2354>.
- Rai, G. S., Liew, E. C. Y., and Guest, D. I. (2020). Survey, identification and genetic diversity of *Phytophthora capsici* causing wilt of chilli (*Capsicum annum* L.) in Bhutan. *European Journal of Plant Pathology*, 158(3), 655–665. <https://doi.org/10.1007/S10658-020-02108-4>.
- Reis, A., Paz-Lima, M. L., Moita, A. W., Aguiar, F. M., de Noronha Fonseca, M. E., Café-Filho, A. C., and Boiteux, L. S. (2018). A reappraisal of the natural and experimental host range of Neotropical *Phytophthora capsici* isolates from Solanaceae, Cucurbitaceae, Rosaceae, and Fabaceae. *Journal of Plant Pathology* 2018 100:2, 100(2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/S42161-018-0069-Z>.
- Reyes-Tena, A., Huguet-Tapia, J. C., Lamour, K. H., Goss, E. M., Rodríguez-Alvarado, G., Vázquez-Marrufo, G., Santillán-Mendoza, R., and Fernández-Pavía, S. P. (2019). Genome sequence data of six isolates of *Phytophthora capsici* from Mexico. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(10), 1267–1269. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-19-0014-A>.
- Rojas-Rojas, F. U., and 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. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12954>.
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology*, 15(5), 427–432. <https://doi.org/10.1111/MPP.12138>.

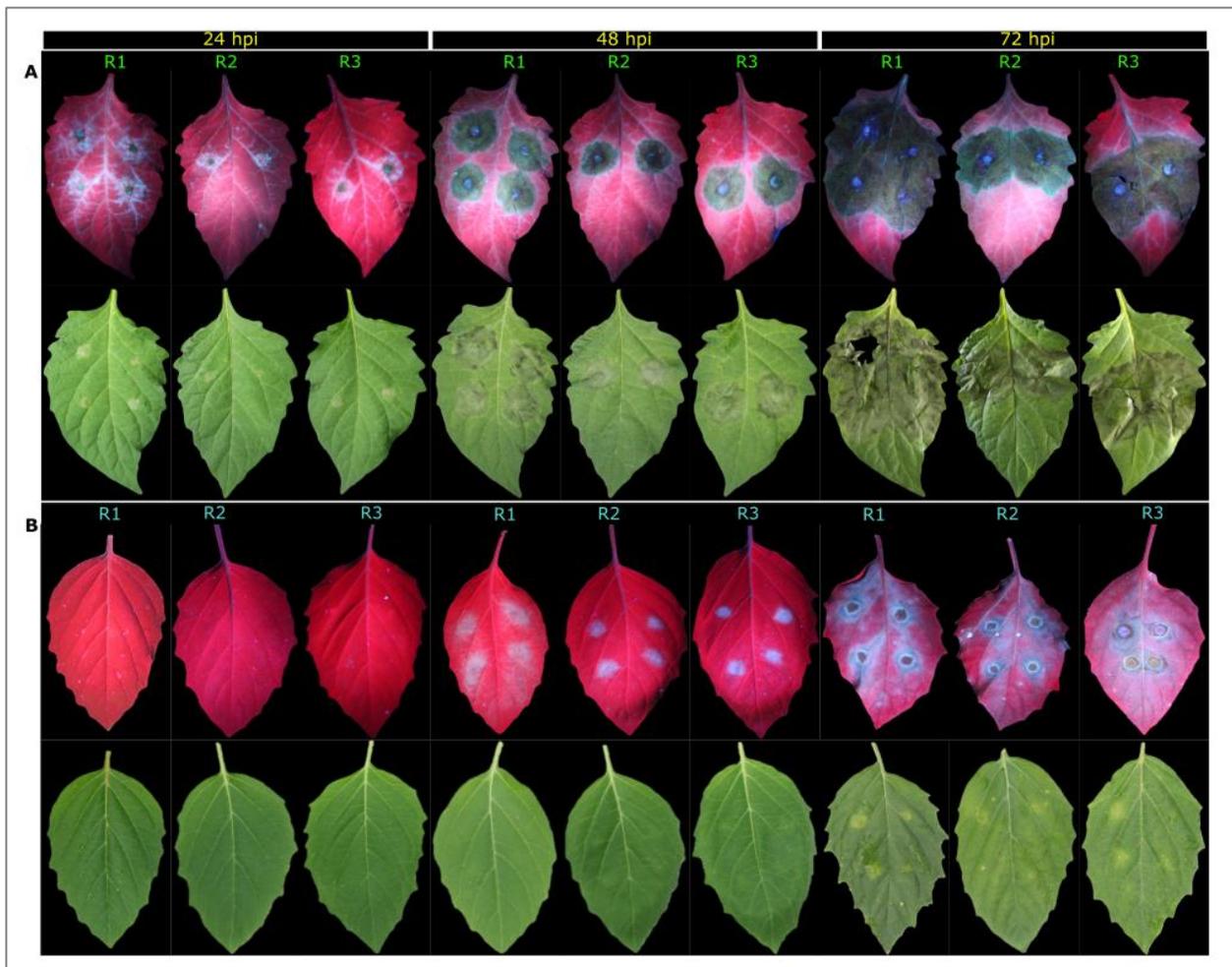
- Sacristan, S., Goss, E. M., and Eves-Van Den Akker, S. (2021). How do pathogens evolve novel virulence activities? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(6). <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-20-0258-IA>.
- Saltos, L. A., Corozo-Quiñones, L., Pacheco-Coello, R., Santos-Ordóñez, E., Monteros-Altamirano, Á., and Garcés-Fiallos, F. R. (2021). Tissue specific colonization of *Phytophthora capsici* in *Capsicum spp.*: molecular insights over plant-pathogen interaction. *Phytoparasitica*, 49(1), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s12600-020-00864-x>.
- Saur, I. M. L., Panstruga, R., and Schulze-Lefert, P. (2020). NOD-like receptor-mediated plant immunity: from structure to cell death. *Nature Reviews Immunology*, 21:5, 21(5), 305–318. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00473-z>
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L. M., Bozkurt, T. O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M. E., Bos, J., Haas, B. J., Zody, M. C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., and Kamoun, S. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 795–803. <https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2009.00593.X>.
- Schumacher, J., Studt, L., and Tudzynski, P. (2019). The putative H3K36 demethylase BcKDM1 affects virulence, stress responses and photomorphogenesis in *Botrytis cinerea*. *Fungal Genetics and Biology*, 123, 14–24. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2018.11.003>.
- Song, W., Forderer, A., Yu, D., and Chai, J. (2021). Structural biology of plant defence. *New Phytologist*, 229(2), 692–711. <https://doi.org/10.1111/NPH.16906>.
- Sperschneider, J., Dodds, P. N., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Singh, K. B., and Taylor, J. M. (2015). Advances and challenges in computational prediction of effectors from plant pathogenic fungi. *PLOS Pathogens*, 11(5), e1004806. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004806>.
- Spoel, S. H., and Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12:2, 12(2), 89–100. <https://doi.org/10.1038/NRI3141>.

- Stajich, J. E., Vu, A. L., Judelson, H. S., Vogel, G. M., Gore, M. A., Carlson, M. O., Devitt, N., Jacobi, J., Mudge, J., Lamour, K. H., and Smart, C. D. (2021). High-Quality Reference Genome Sequence for the Oomycete Vegetable Pathogen *Phytophthora capsici* Strain LT1534. *Microbiology Resource Announcements*, 10(21). <https://doi.org/10.1128/MRA.00295-21>.
- Studt, L., Janevska, S., Arndt, B., Boedi, S., Sulyok, M., Humpf, H. U., Tudzynski, B., and Strauss, J. (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(JAN), 2144. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.02144/BIBTEX>.
- Tadele, Z. (2019). Orphan crops: their importance and the urgency of improvement. *Planta*, 250(3), 677–694. <https://doi.org/10.1007/S00425-019-03210-6>.
- Tian, D., and Babadoost, M. (2007). Host Range of *Phytophthora capsici* from pumpkin and pathogenicity of isolates. *Plant disease*, 88(5), 485–489. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.485>.
- Tobón-Niedfeldt, W., et al. (2022). Incorporating evolutionary and threat processes into crop wild relatives conservation. *Nature Communications*, 13:1, 13(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33703-0>.
- Tyler, B. M., et al. (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, 313(5791), 1261–1266. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1128796>.
- Vega-Arreguín, J. C., Jalloh, A., Bos, J. I., and Moffett, P. (2014). Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(8), 770–780. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-14-0014-R>.
- Vega-Arreguín, J. C., Shimada-Beltrán, H., Sevillano-Serrano, J., and 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00205>.

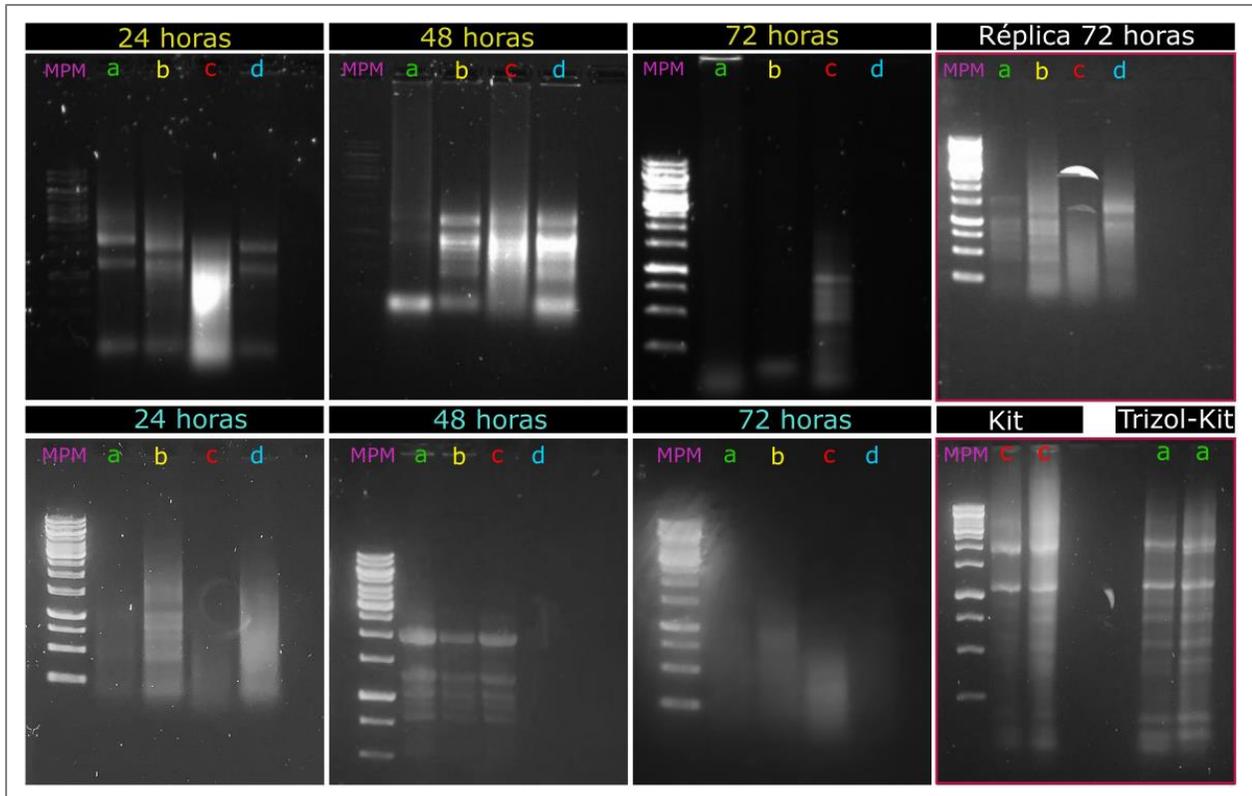
- Veneault-Fourrey, C., and Rep, M. (2021). Quantitative resistance linked to late effectors. *New Phytologist*, 231(4), 1301–1303. <https://doi.org/10.1111/NPH.17462>.
- Wang, L., Chen, H., Li, J., Shu, H., Zhang, X., Wang, Y., Tyler, B. M., and Dong, S. (2020). Effector gene silencing mediated by histone methylation underpins host adaptation in an oomycete plant pathogen. *Nucleic Acids Research*, 48(4), 1790–1799. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ1160>.
- Wang, W., Liu, X., Han, T., Li, K., Qu, Y., and Gao, Z. (2020). Differential potential of *Phytophthora capsici* resistance mechanisms to the fungicide metalaxyl in peppers. *Microorganisms*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020278>.
- Wang, X.-W., Guo, L.-Y., Han, M., and Shan, K. (2016). Diversity, evolution and expression profiles of histone acetyltransferases and deacetylases in oomycetes. *BMC Genomics* 2016 17:1, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-016-3285-Y>.
- Wang, Y., Pruitt, R. N., Nürnberger, T., and Wang, Y. (2022). Evasion of plant immunity by microbial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00710-3>.
- Wang, Y., Tyler, B. M., and Wang, Y. (2019). Defense and counterdefense during plant-pathogenic oomycete infection. *Annual Review of Microbiology* , 73, 667–696. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-MICRO-020518-120022>.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., West, P. van, Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L., and Birch, P. R. J. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450:7166, 450(7166), 115–118. <https://doi.org/10.1038/NATURE06203>.
- Witek, K., Jupe, F., Witek, A. I., Baker, D., Clark, M. D., and Jones, J. D. G. (2016). Accelerated cloning of a potato late blight–resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing. *Nature Biotechnology*, 34:6, 34(6), 656–660. <https://doi.org/10.1038/NBT.3540>.

- Witek, K., *et al.* (2021). A complex resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector. *Nature Plants*, 7:2, 7(2), 198–208. <https://doi.org/10.1038/S41477-021-00854-9>.
- Xu, X., Chen, Y., Li, B., and Tian, S. (2023). Histone H3K4 methyltransferase PeSet1 regulates colonization, patulin biosynthesis, and stress responses of *Penicillium expansum*. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.03545-22>.
- Yuan, M., Jiang, Z., Bi, G., Nomura, K., Liu, M., Wang, Y., Cai, B., Zhou, J.-M., He, S. Y., and Xin, X.-F. (2021). Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature*, 592:7852, 592(7852), 105–109. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03316-6>
- Yuan, M., Ngou, B. P. M., Ding, P., and Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. In *Current Opinion in Plant Biology* (Vol. 62, p. 102030). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>.
- Zhao, Y., Li, Y., Qiu, M., Ma, W., and Wang, Y. (2018). Generating gene silenced mutants in *Phytophthora sojae*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1848, pp. 275–286). Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8724-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8724-5_18).
- Zhou, J. M., and Zhang, Y. (2020). Plant immunity: danger perception and signaling. *Cell*, 181(5), 978–989. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.04.028>.
- Zhou, S., Liu, X., Sun, W., Zhang, M., Yin, Y., Pan, S., He, D., Shen, M., Yang, J., Zheng, Q., and Wang, W. (2021). The COMPASS-like complex modulates fungal development and pathogenesis by regulating H3K4me3-mediated targeted gene expression in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 22(4), 422–439. <https://doi.org/10.1111/MPP.13035>.

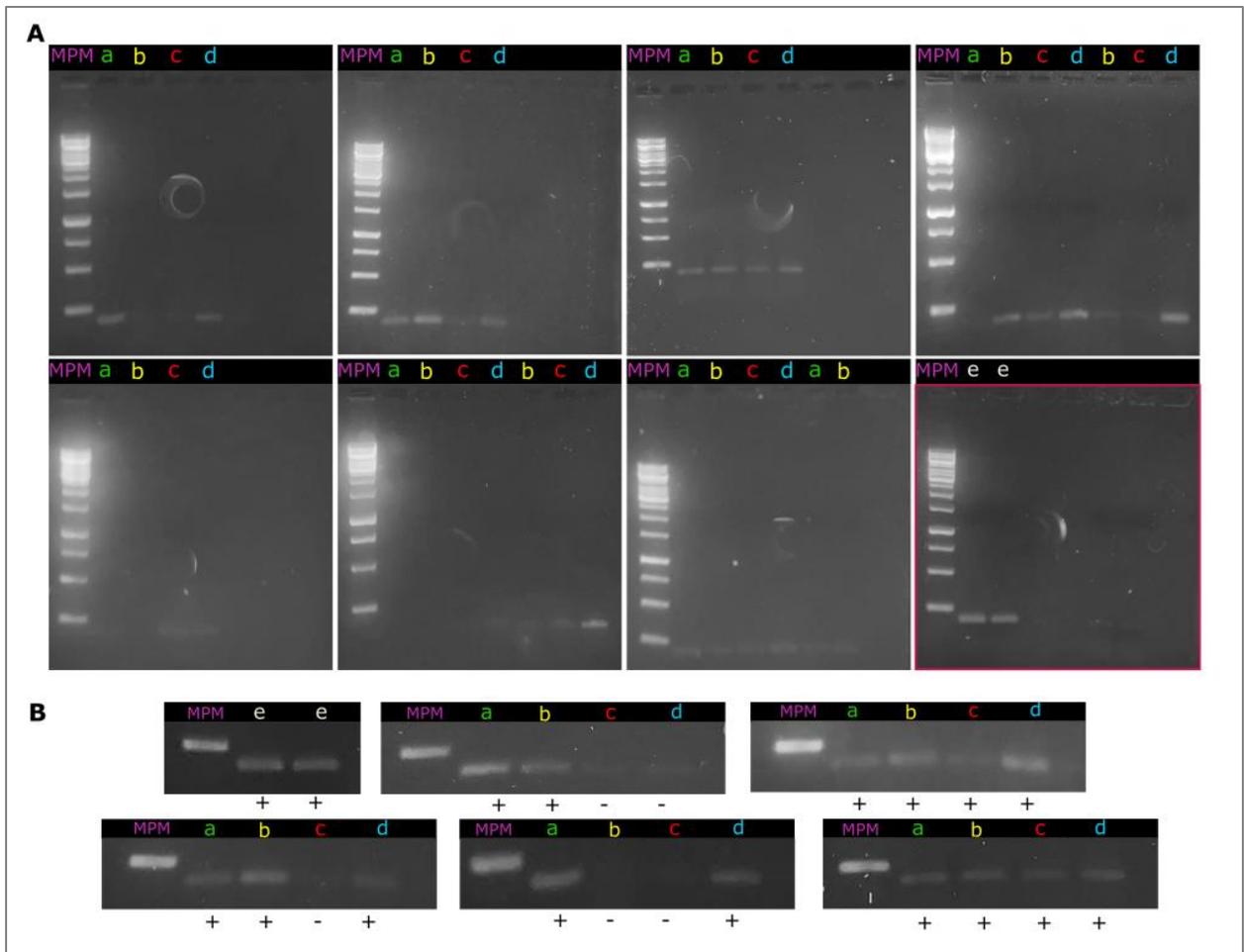
## 12 Material suplementario



**Figura 11.** Comparación de la interacción planta-*P. capsici*. **(A)** Evaluación de la respuesta a la infección con discos de micelio de *P. capsici* en hojas desprendidas de *S. americanum*, y **(B)** la reacción a la inoculación en hojas de *P. angulata*. Se muestran tres réplicas tomadas de tres experimentos independientes y evaluadas a las 24, 48 y 72 horas postinoculación.



**Figura 12.** Electroforesis de RNA en gel de Agarosa. (A) Geles de las extracciones de RNA total de muestras de interacción planta patógeno. (MPM) Marcador de peso molecular, (a) *S. americanum*, (b) *V. unguiculata*, (c) *C. annuum* v.g., (d) *P. angulata* y (e) micelio. Los duplicados de muestras en cada tiempo indican repeticiones en la extracción, el gel marcado con un recuadro arriba a la derecha indica un gel con las 4 muestras con RNA. El gel marcado abajo a la derecha muestra una comparación de dos métodos de extracción, la extracción con kit completamente y una combinación de la extracción con Trizol algunos componentes del kit.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de las PCR de las muestras de cDNA. La síntesis de cDNA se comprobó mediante electroforesis con la amplificación del factor de elongación EF1. **(A)** Los geles observados en un mini-fotodocumentador muestran la presencia o ausencia EF1 en las muestras correspondientes, (MPM) Marcador de peso molecular, (a) *S. americanum*, (b) *V. unguiculata*, (c) *C. annuum* v.g., (d) *P. angulata* y (e) micelio. **(B)** Un acercamiento muestra la presencia (+) o ausencia (-) de cDNA en las muestras.

**Cuadro 4.** Secuencias de nucleótidos de los genes efectores Avr de este estudio.

<b>Avr3a1 ID: &gt;PcAVR3a1 E2_263_1_#3</b>
ATCGATGGTGCAGTCGCTCGATGCGCGACTCAACGGCCAAGCTGATGGCACAAGATTTCTTCGTGCACA CCACGAGAATGAAGAAGAATCCGACAGAGAGGAAAGGGGCTCACGGATTTGTTCAAGACCGAGAAGGC GGCAGTGAAGAAAATGGCCAAGGCCATCATGGCAGACCCAAGCAAGGCCGATGACGTATACCAGAAGTG GGCGGACAAGGGATATACTCTTACGCAACTGAGCGACTTCTTGAAGTCCAAGACCAGGGGGAAGTACGA TCGAGTCTACAACGGGTACGCGATCCACCTGGATTATTGAAAAGCTCTGCTGCTGTGCAAGCACAAAAA GTTTTAGAGTAACGTCAATGACAACCTCGGCGGCCGC
<b>Avr1 ID: &gt;Pcap_Avr1_Pcapsici LT1534 jgi Phyca11 129759 e_gw1.87.114.1</b>
ATGAAGTCAATCTATCGCGTCCTCCTGCTGACGGTGTTCGCCCTACTTTGTGGTCTCTCCAACGCTGTG AATTCAGGTGGAAGATTGTTGCGGGTAGTGGACTCAACCGACGAGAGGGGAGGATTTCCATCGTACCTC AAGGATTCATTAAGTGGAGAATCAACTCGAAGATCAAGTCTTGGGTCAAGAAGCAGAAGACGGAC GAATACGTTCTATCCAACTGGGTCTAAGCACCTGACAGGGAAAGACCTGGTGAAGGCCCCCAAATAC TCGCAATTCAGGATTTCAAGGTCGGTATGTGGCTGAAAGAAGCGACACCTACAACGACAGTGTTC AAC ACTTTGGGACTGAATAAAGTGGAAAGGCGCAGTGGAGAAAGCAGACGACTTCGGCACTTACGTGAAATAT GTAATGGCCCTCGGGGAAAAGGCAGACGACTACCCTCTTGTACGTTGGCGGAAGCTCTTCGGAGGAGGA TCTCTTGAACAACCTGGAGCTAAAACGAAAGATCCTTCTTCTAGTGAAGAGAGACGAGATCGATATCAGC GTCATGCTGGGGTAG
<b>Avr1b ID: &gt;Pcap_Avr1b_Pcapsici LT1534 jgi Phyca11 567591 estExt2_Genewise1.C_PHYCAscaffold_250479</b>
ATGAACCTCAATGTACCGCGTCCTCCTGCTTACGGTGTTCGCCTTGCTTTGTGGATTCTCCAATGCTGCG AATTCAGGTGGGAGATTGTTGCGGGTCGTGGACTCCGCCGAAGAGAGGGGGGATTTACCTCGTACCTC ATGGACTCTTTCACTAAGTGGAGAATCAACTCAAAGATTA ACTCTTGGGTCAACAAGCAGAAGACGGAC GAATACGTTCTAGCCAACTGGGACTAAGCACACTGACAGGGAAAGAACTCGTGAAGGCCGCCAAATAT CCTCAATCCAAGATTTCAAGGTTGGCGTGTGGCTGAAAGAGGCGACACCTACAACGTCAGTGTTCAGC ACTTTGGGACTGGATAAAGTGGAAAGGCGCAGTGGAGAAAGCAGACGACTTCGGGACTTACGTGAAATAT GTAATGGCCCTCGGGGAAAAGGCAGACGACTACCCTATTACCAGGTGGCGGGAGCTTTTCGGGGGAGGA TCTCCTGAACAACCTGAAGCTAAAGCGACAACCTCTATTTCTAGCGAAGAGAAATGCAATCGACATCAGG ATCATGCTGGGT

**Cuadro 5.** Secuencias de nucleótidos de SMYD3 y JmJC6021.

<b>SMYD3 ID: &gt; jgi Phyca11 96394 e_gw1.1.416.1</b>
ATGACCATGTACCATGAAGTGTGCTGGACGATCGTAAGGGCCGATGCGCCGTGCGCTCCGTCGCTCTACGG GCCGGTTCCTGCGTATTACGCACAGCTGCTGTGTGCGCCGTGTCTGTTTCTTCATGTGGCTGGTGTTC ACGCCCCAAATCGCTCTCTCTCGGTGCACAGGCTGTCTGTAGCTCGGTACTGTTCCCGCAAGTGCCAA CAGCTCGATTGGGCTCAACATCGTCTCGAATGCTCGGCCTGGCGCAGCGTTCCAGCCGTTAAGACTTTG CCTACTGTTTTACTAGTTAGTCGTCTTGCTTTCAAGCTTTTTCTGAGCTCTGGAATCGATCAGGAAGAG AGAAACAGTGTACTGAAGTTACGACATCATTGGAGGACACCTCAACAGCTAAACGCCAGCAATTCCAA GAAATGACAGCGTTAGTGCTGCTGCTTCTGTCACGATATAAAGGAGACAAAAAGCTATTGATCCCGAGC TTGGAAAGTCTCCAGAGCGACGTGGAAGAAGAGATACTGAAGCTTTTTGGACGGGTCAACTGCAACGTC TTCTCGTTAGCGAACGACGTGACTAACGAGGCCGTTGGGATCGGATTGTTCCCGAACGGAGCACTGTTC AATCATGACTGTGACCCGAAGTGTGTCGTGAGCTTTAAGGGACGAGAGATGCAGGTTACAGTGGTGAAG GACGTCCAAGAAGGTCAAGAGCTCACGGTCTCGTATATTGAGCTGCTTCAGTCTACAACGTCGAGACAA GCGGAGCTAAAGGGCTCGTACTTCTTCGACTGTGAATGTACACGATGCCAAGCAGCTACAACAGACGAC TGGTATTTGGATGGGCTCATGTGTAGCAACAAGGAGTGTCAAGGTTTCGTTGAGCTTGCGAGGCATGAG GAGGAGCTGAAGGCTATCAGTGCTTTACCGTCTTCTTCGGATCTAAAGACGTGGGAGAAGTATCAGAAG ATGTGGACAATTGCAACGCAGCAAGTACGACTCCATCCACGAAATGCTCGGGTAGCTGTGATGGCTCGT GAGATCGGGAATTTTCTCTTAAGTGCATCTGAGCAGTTGCAGCATCACGCGCTCCCTTTTTGTCTGGCA GAGCTGCACGCAACAGAGTGGCTACTCCCGAAGACTCCACTGCCTTCCCGAGGTCTTCTGCGATTCCAA ATAGGAAAAATCCTGTTTGAACAAGCAGCGAGTGTGAACAGCTCCAAAAAGCTGCGGAATATCTCCAA CAAGCTCTCTCAGTGTACGTATCAATGGTCTGACTGGATTTCGTTTTGAATTGA
<b>JmJC6021 ID: &gt; jgi Phyca11 60217 gw1.62.208.1</b>
ATGGACTGGGACCCGAAGAACAGCGACTGTGATGGCTACATCTGTCCGCCATGCCAGTGTCTACCCC ACGGCCGAAGAGTTCCAGCACCCACTGAAATATATTTCCAGTATCCGCCACATCGGTATGCAAGCTGGT ATTTGTAAAATTGTTCCCTCCCAAGGGCTGGCGTCTCCATTTGCCATCAACGAGAAGACCTTCCGTTTC CGGACTCGAGTGCAGCAGCTCAACTGTATCGAAGGCCATTTCCCGTGGCGAGGGCCAGTTTCGTGGAGGCT CTGAGACTCTTCTCTACCAGCGTGGAGAACCTATGAAGGAGCTCCCACGTGCTGACGGACAGCTCGTG AATCTCCACTTACTGTACAAGACGGTGGTCTCTTTTCGGCGGTTTTGGTGCAGTTTGTGCCAGTGGCAGG TGGGAGAATGTTCGTACGTGAGTTGGACGCACAAAAGGCGCGACAGAGCCGTCCGAAGAGCTCTGTGAA GTTTTATAAGAGACATTACGAGATGTTGTTGCTTGCTTACGAGAAGGAACAACGGAGTAAAGACAGTAAC AATAGCAATAGAGAAGCAGAAGTCAAGATGAAGATTGAGGACGTACAAGCTACACCTTCTGGAGGAAAT TCGACTGGGAATACCAAAGCGACACCGTCTCCAAGCCCCGTACGCTCAGTGAAGGAAACGTCCAGCC TCAGTACATGAAGAAGAAGACGACGCAGATGAAGAACAGTCCCCTGTAAAGCGCACCTTGTCTCTGAT GGAGAACACACTAGCAGCGAAGAGAATGAGAGCCATCCAACGACGCCACCGAAGCTTGGGAGACGGTTA AAGGATCACCAGAGAAGTATCAATCAGCTGGACCTCGAACCTGAAGCTCTTAAACCGTCAGAAACCCGC AAGGAGAGGCTTGGAGCTCCAGAGATTCGTACAGGACAGAAGTTCTACCGTTTTTCCAGAAGCAGGG GCTGTTTTGACAGAAGTGAAGCGGTATTTGGAGGAAAAGCCGCACGTTGCCGTGCGATACGTGGAG GACGGCTCGAACGACGACGTGGAGCTGTCCACCATGGAGATCTGATCGCCAATGGCTGGGACGCAGAC GCCGCGGAGCTGGCGTTTTAACAGCGAGATCTGCCAGGTTTTGTCTGCGTGGCGATTGCTGGGACCGGATG CTGCTGTGCGATGGCTGCAACAGTGGCCAGCACATCTTCTGCTTGGACGAACCGCTGGACGTGGTGGCC ACTGGGGACTGGTACTGCAACGACTGTGTGCAGGACCGGATGGATCCGAGTAAAAGCAAGGAAAACCCA AAGTTCGGCTTCGATATGGGCGCGGAGATCAGTCTCATGGACTACAAGGAGCGTGCAGATGCTTGGAAA CGTGAGTACTTTTTCTTGTCTCGTGGAGATTCATCCGGACGAAGCTGTGAGTGATCGGGAGCTGGAGAGC GAGTACTGGCGATTACTGAGCATTCCAATGCACGAGCAGCGCTGGAAGTCCAGTATGGCAGCGACGCTG GACACTGGCGCCAACGGCAGCGCTTTCCCTCGTCAGGATCTTTACGCCAAGAGTCTTCGTACTGTGAAA AAGCGCTGGAAGAATCTGACTGCAAAGGCCAAGAGCGAACACGTTTCGTCAATTGAGCGAATTCTTCTCC CACGGACTTCGTGATGGTCTAGCAACAACAGCTGGAGGAGACAATGTGGATACAATAGCAGCCAAATCA CTAGAGGAACTACTGGAGCGGTACGCTCAGGACGACTGGAACCTGAACAATATGCCGAACTACCTGGT TCCGTGCTCCAGTACTTGGATGAAGATATCAAGGGCATTATGGTCCCGTGGTTGTACGCTGGAATGTGC TTCTCCACTTTTTGTTGGCACGTGGAGGACCATAATTTCTACAGCACAGTTACTTGCAGTGTGGCGCT CCCAAGACTTGGTACGGTATCCCTTGTGCCAGTGCCGAGCTCTTTGAACGGACGATGAAGGAATTAACC

---

CCCGAATTGTTCCGGGAGTCAACCCGGATCTCCACATGCAACTGGTCACGATGTTCTCGCCGAAAACGCTG  
CGAGATCATGGCGTTCCCTGTGTACCGAGCTACACACCGTCCGAACGAGTTCATCGTCACGTTCCCGTCC  
GCTTATCATGCAGGCTTCAACAACGGCTTCAATTGTGCTGAAGCCGTGAATTTGCCACGATGGATTGG  
TTGCCGTGGGGTGCCAAGTCTCTGCTGAAGTACCGTCAATTCCAGAAGCTCCCAGTCTTCTGCCACGAA  
GCTCTGGTCTGTACTTTGGCTGAGACTCTCGTGGATGGGAACGCCTTTGACTTCAATCATGCCCAGACG  
TCTCTACTCCCAGCAGTGGAGCAGTTGCTACAGGAGTATCAGGAGTTCCAACGTCGTGTGGATGACAGC  
GAGATGCCTGTGGAGAAGCGGGAGCTTATGGCTGAGTATGAGAAGCACGGGGCAGTTGCTGATCCGGAA  
GCGACGTCAACAACACTACAGGACGGCGGAGTATGGTGGCTCGAACATGTAACAGGTGCTCGAAGATGGCT  
GTTAGCCTACCCGATAGGGGGTCTAAGATGAAGATGGAGACGATGCGACCTACCCGGATGGTACTGTGG  
GCAGGGCGTTCCGGCAAGAATGAAGGTCTCCGTTGTGTACGTCACGTGCAAGCAGTACTGCTATCTCCAGGCT  
GTGGTTTTGTACGAGATGTCTGCCAGCAGGGAAGCAGCACTGTTGGCTGCGTTGAGCACTACCCGACC  
ATGTGCAAGTGCAGAAATCCAGAGAACTTCGTGTATCTGTATCGATATGAAATTACCAAGCTTGAAGAG  
ATGATCAGCAGCTTACAGGGGCGATTGAAAGCGTTCAAGACTGGAACAGGGAATGTGACGTTGTGATG  
GAGTATACTGGAGGACGAAAGCCGACGGTTCTCGAATTGAAGCAGCTCTTATCACGTGGTAAATCCAGT  
GGAGGTGCTGATGTGAAGCGTTTGGATGCCTTGGAGTTCGCGATTTTCCAGATGCTAAAAGCTGGGATTCT  
CGTGTGAACAACACTGCTGGCAAAGGATAAACGCTCGTACTTGACCATCGCAGCGTTTGGAGCGCTGTTA  
GCTGAAGGTGAGAACTGCTCGTTGAGTCTGCAGTCATTTGGGGATTTACGCAAAGACGTGGAGGAATGG  
CGATCCATTCATGCGGACGCTTTGAAGCTCTTAAACTCCATACAAGCGATTGCCAACCAAGAGATCGCG  
AAAGCTCAGCCCAGAGCTTCTGCTGATGTGTCTATTTCTCCAGTCCATGGGCGCTCCTAACGTCTTG  
CTGCATGGCAACGTCCATTTCCGGCCACCTTTGCAATTCGATACACGACGTGAGTGATCGTCTACGAGCG  
AAACAAGAGAGCAACGCAGACGGGAGCTTCCTCAGTCAACTGGTACGAGGCCAGCGGTATCTGGAAGTG  
CTCTGTAAAGTGAACGTCCTGGCTGCCACCATAATAGACCGCGTTTCATGGCAGCACCGTGATGGGGACT  
CCTACCCAAGGTCAAGTGGAGCGTGTACTGGGCGAAGTGGACGAGTTGCAGCTGCAAAAATCCCCATTTCG  
ATAGTGAACGCTGAGGCCCTTGAGGAACTGTTAGCAGCAACAGAAGCAGAGGCCGAGAGGTGGAGGAA  
GCGCTGGGTGATCGCTCGAAAAGTACCGAAGAGCTGGAAGTTCTGCTTCGACGAGCAGTAGCAATGCCC  
ATTCCTCCCGGAATACTCTGGAGCTCAAGGACCGTCTCGAGAAGTGCCGATTGTGGGAACGTCAAGCT  
CTGAAGCTCTTGAACGCTCCGGAATGGAGAAACGACCGTCACTGGACGACGTGAGCGCTTCTACGCC  
CAAGCGGACGCTCATTTCTGCTCAACTTCGTCCCTACTGTATCGACAAGTGCACCTCACGTCTTCAGGAC  
TGCCGTGCTGGTACGATGCTGTCCACGCGTTGTTCTTACGGCCATCCAACAGCCACCTCTCTCTCGGT  
CAGTTCTTGCAGACTGCACTGGATAAAAATGCCGCTGCAACACCACAAGCAGCTCCACTGCGTCTGTGAG  
CAGGTCTCAGTGAACGTGCTCAGGTGCTGACGTGCCAGAGTTGTCAGTCTACTTCCATCCGAGTGT  
GTACCGGAGTTGATGCCTCAACGTTCTCGAGACGTTTTCTATGTGGGTCTTGCCGTCCGCAACGTAAG  
AAAGCAGGGAATCGACGAACTCCCGACGCTCCGATCTTCTGCGTCTGCCGTGGCGTCCGAGCATTCCGCT  
ATGATCTGCTGTGACTTCTGTGACGAATGGTATCACGCTGTGTGTGGATCTCTCGCCTCTGGAGCTG  
GATAAAGTGGACGCTTTCCGTTGTTTCGCGTTGTTCTCGTCCGCGAGAATTTATACTACATGGACAAGAAG  
CTTTTACGACGTGAATGTATGGGGCGGAGGCCCTTCGCTCTCGCGTGTGGAAAGTTTCTGACTCAAATG  
CAGACTCACTTGGTTGCTTTCCACCTGGAGCTCAAGAACTCTTGGCTTATGTCCATGCAGTGAAGAAG  
GTGAACAGCGATGTAGAGACATTCGCTCGGACTTCGCTCTACGGCCGTTCTCTCCTACCGTCTACGCT  
ACACCCGAGTACGTGCAGATCCAAGAAGCGGCTGTATTGGAGCTCATGGAGCGTGAACACTGGGCTTGAA  
GTAGGGCTGGAGCTGGCCAGACCCAGTTAGGAGCTGTCCACTGGTGTTTAAGAGCGTGCCAACCTCGTT  
CTGGGCCCGAATTCTCGAGCTCCACGGTACGCCACCTTGTTCATTGCTCCAAGACGTCAAGAGTCAA  
GAGCCAGGGTTTGCCTTCCCTCGAGAGGAGTACCGACTCATGCAGTTGACCATTGTAGAGCGAGTGAAC  
AAGGCTGCGCAGTGGCTTCGAGCTACGAAGACGTTGGAGGTGGAAGAGTGGAAATATCGAGAAGGCACAA  
CGTCTACAGCGCAGTCCGAGGAACTCAGTGCATCTTGGAGCTGCCAGCGACCGAGTTGGAACCTTGT  
CAGAAGATTTTAGCTAATCAGCAAGAGGAACCCGGACAGTCCGAGCGCCATCGCCTGGAAGAGACAGCGA  
CACTGGTAG

---