



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Aislamiento e identificación de genes de chile
(*Capsicum annuum*) inducidos durante la
interacción con el hongo *Rhizoctonia solani*.**

Tesis que presenta

Telma Liliana Ramos Lomas

Para obtener el grado de

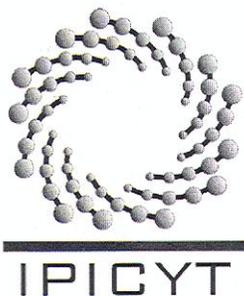
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Dr. Raúl Rodríguez Guerra

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2007



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “Aislamiento e identificación de genes de chile (*Capsicum annuum*) inducidos en la interacción con *Rhizoctonia solani*” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Telma Liliana Ramos Lomas** y aprobada el **31 de agosto de 2007** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Codirector de la tesis)

Dr. Raúl Rodríguez Guerra
(Codirector de la tesis)

Dr. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)

Dra. Margarita Rodríguez Kessler
(Asesora de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los doctores Juan Francisco Jiménez Bremont y Raúl Rodríguez Guerra.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 202392 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 041 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de septiembre del año 2007, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Dominguez Kessler	Secretaria	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dr. Raúl Rodríguez Guerra	Sinodal externo	INIFAP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Telma Liliana Ramos Lomas

sobre la Tesis intitulada:

*Aislamiento e Identificación de Genes de Chile (*Capsicum annuum*) Inducidos Durante la Interacción con *Rhizoctonia solani*.*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Dr. Raúl Rodríguez Guerra (INIFAP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

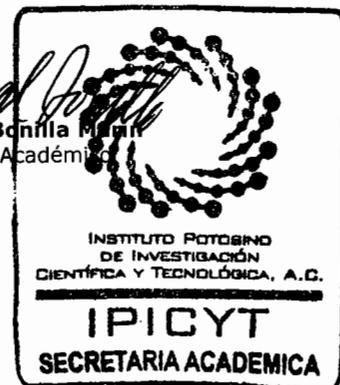
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes septiembre de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios, por darme esperanza.

A mi familia, porque siempre está ahí.

A las personas que pasan por mi vida, porque la enriquecen.

Agradecimientos

Agradezco especialmente al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, por las correcciones en el trabajo práctico y en el escrito, y sobre todo por sus consejos.

A la Dra. Margarita Rodríguez Kessler, por su apoyo constante y su asesoría durante esta investigación.

Al Dr. Raúl Rodríguez Guerra y al Dr. Sergio Casas Flores, por las invaluable correcciones al texto sugeridas para mejorar este escrito.

A la M.C. Alicia Becerra Flora por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

A todos los integrantes del Laboratorio 7 de Biología Molecular de Hongos y Plantas, por brindarme siempre su ayuda oportuna y desinteresada.

Y un agradecimiento especial al FOMIX del Gobierno del Estado de Guanajuato por el apoyo otorgado con el convenio Fomix-Gto 05-24-A-015.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
Introducción	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 Materiales	9
2.1.1 Material vegetal	9
2.1.1.1 Cultivo del material vegetal	9
2.1.2 Microorganismos	9
a) Hongos fitopatógenos y <i>Rhizoctonia</i> binucleada	9
b) <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.2.1 Cultivo	10
a) Hongos fitopatógenos y <i>Rhizoctonia</i> binucleada	10
b) <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.2.2 Medios de cultivo	10
a) Hongos fitopatógenos y <i>Rhizoctonia</i> binucleada	10
b) <i>Escherichia coli</i>	10
2.1.3 Plásmidos empleados	11
2.2 Interacción de <i>Capsicum annuum</i> tipo guajillo - <i>Rhizoctonia solani</i> .	11
2.3 Interacción de <i>Capsicum annuum</i> con <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Rhizoctonia</i> binucleada.	11
2.4 Tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento	12
2.5 Obtención de genoteca sustractiva	12
2.5.1 Extracción de RNA	12
2.5.2 Síntesis, amplificación y purificación de la población de cDNA	12
2.5.3 Construcción de la genoteca sustractiva	13
2.5.4 Secuenciación del DNA plasmídico	13
2.6 RT-PCR	14
a) Obtención del cDNA.	14
b) Amplificación por PCR	14
3. RESULTADOS	15
3.1 Identificación de genes inducidos en <i>Capsicum annuum</i> durante la interacción con el hongo necrotrófico <i>Rhizoctonia solani</i>	15
3.2 Análisis de la expresión de genes inducidos en <i>C. annuum</i> durante la interacción con <i>R. solani</i> .	17
3.3 Análisis de la expresión de los 16 genes obtenidos de la SSH de	19

chile durante la interacción con reguladores del crecimiento	
4. DISCUSIÓN	22
4.1 Alanina aminotransferasa (Unigen 6)	23
4.2 Esterasa (Unigen 41)	24
4.3 Proteína inducida por TMV (Unigen 48)	25
4.4 Esterol desaturasa (Unigen 200)	26
4.5 Proteína de choque térmico (Unigen 185)	26
4.6 S-adenosil metionina descarboxilasa (Unigen 79)	27
4.7 Factor de transcripción inducido por fosfatos-2 (Unigen 183)	28
4.8 ATPasa (Unigen 199)	29
4.9 Omega desaturasa (Unigen 8)	29
4.10 Epóxido hidrolasa (Unigen 135)	30
4.11 Subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa (Unigen 77)	30
4.12 Acetolactato sintasa (Unigen 126)	31
4.13 Inhibidor de disociación GDP (Unigen 85)	32
4.14 Factor de transcripción de la caja MADs (Unigen 131)	32
4.15 Lipoxigenasa (Unigen 186)	33
4.16 Caffeoil-CoA O-metiltransferasa (Unigen 57)	34
Referencias	36
Anexos	50

Lista de figuras

1. Respuestas inducidas de la planta por el reconocimiento del patógeno (adaptado de Buchanan <i>et al.</i> , 2002)	3
2. Sistema in vitro de crecimiento de plántulas de chile guajillo.	15

Abreviaturas

ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlaAT	Alanina aminotransferasa
Avr	Avirulencia
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EREBSs	Proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno
EST's	Secuencia expresada identificada
ET	Etileno
Eth	Ethephon
Fig.	Figura
GDP	Guanosin difosfato
HR	Respuesta hipersensible
IAA	Ácido indol acético
JA	Ácido jasmónico
LB	Lurian-Bertani
MAPK	Proteína quinasa activada por mitogeno
MJ	Metil jasmonato
MS	Murashige y Skoog
NADPH	Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato
PAs	Poliaminas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar dextrosa y papa
PR	Relacionada a patogénesis
Put	Putrescina
R	Resistencia
RLK	Receptores tipo quinasa
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosil metionina
SAMDC	S-adenosil metionina descarboxilasa
SAR	Respuesta sistémica adquirida

Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SSH	Genoteca por hibridación supresiva sustractiva
TMV	Virus del mosaico del tabaco
UTR's	Regiones no traducibles

Resumen

México es uno de los principales productores de chile en el mundo y destaca por tener la mayor variabilidad genética de *Capsicum annuum*. El chile junto con el maíz y el frijol son una importante fuente de alimentación para la población. Sin embargo, los problemas fitosanitarios limitan la producción de este cultivo en todo el mundo. La pudrición de la raíz y marchitez del chile es una de las principales enfermedades que afectan el desarrollo y la productividad de este cultivo, ocasionando pérdidas que van desde el 60 al 100% de la cosecha. La enfermedad es causada por los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium* ssp. Hasta el momento no se cuentan con variedades resistentes de chile contra estos hongos. De ellos se tiene interés en *R. solani*, que es un hongo necrotrófico, cuya forma infectiva es como micelio vegetativo, forma estructuras de resistencia llamados esclerocios, los cuales permanecen latentes por varios años en el suelo por lo cual es difícil de erradicar. La técnica de la hibridación supresiva substractiva (SSH) permite la identificación masiva de genes expresados diferencialmente durante una condición específica. Para el desarrollo de la SSH se emplearon cDNA de raíces de plántulas de chile inoculadas con *R. solani* (condición problema) y raíces de plántulas de chile (condición control), cosechadas a las 8 y 16 h. Los productos de la hibridación sustractiva fueron clonados, secuenciados y analizados obteniéndose un total de 200 unigenes, de 352 clonas secuenciadas. Los unigenes se clasificaron en diez categorías funcionales que incluyen: respuesta a estrés (9 %), defensa (9 %), mantenimiento y desarrollo celular (7 %), metabolismo (21 %), síntesis de proteínas (2 %), señalización (3 %), factores de transcripción (2 %), transporte (5 %), proteínas de función desconocida (16 %) y no reportadas (25 %). Se seleccionaron 16 unigenes para analizar la expresión transcripcional, los cuales codifican para: una alanina aminotransferasa, una esterasa de chile, una proteína inducida por TMV, una esterol desaturasa, una proteína de choque térmico, una S-adenosil metionina descarboxilasa, un factor de transcripción inducido por fosfatos, una ATPasa, una omega desaturasa, una epóxido hidrolasa, una subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa, una acetolactato sintasa, un inhibidor de la disociación de GDP, un factor de transcripción de la caja MADs, una lipoxigenasa y una cafeoil CoA O-metiltransferasa. La expresión diferencial de estos 16 unigenes fue evaluada por RT-PCR durante las interacciones compatibles con *R. solani*, *P. capsici*, y *F. oxysporum* y durante la interacción incompatible con el hongo *Rhizoctonia* binucleada, resultando en patrones de expresión interesantes entre los diferentes hongos. Se evaluó también la expresión de estos genes en respuesta a tratamientos con los reguladores del crecimiento implicados en la señalización durante estrés biótico, como son el metil jasmonato, el ácido salicílico y etileno;

además de otros reguladores del crecimiento que están involucrados en estrés abiótico como el ácido abscísico. Algunos de los genes analizados se inducen por ácido salicílico, metil jasmonato y etileno y se reprimen por ABA.

PALABRAS CLAVE. chile, patogénesis, pudrición de la raíz y marchitez, *Rhizoctonia solani*, SSH

Abstract

México is one of the main producers of chili pepper in the world, and excels having the major genetic variability of *Capsicum annuum*. Chili pepper in conjunction with maize and common bean, are an important source in human nutrition of the people diet. However, the production of this crop is worldwide limited by fungal threats.

Chili pepper root rot and damping off, constitute one of the most important diseases affecting the development and productivity of this crop, causing yield losses between 60 and 100%. This disease is caused by the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* and *Fusarium* ssp. Up to date, there are no reports of chili pepper resistant cultivars to these fungi. We are interested in *R. solani*, which is a necrotrophic fungi, that employs vegetative mycelia as its infective structure. It develops resistant structures called sclerotia, which remain many years in the field, being difficult to eradicate. Suppressive subtractive hybridization (SSH) technique, allows the massive identification of genes differentially expressed under a specific experimental condition. We developed an SSH library, using the cDNA obtained from roots inoculated with *R. solani* as tester and the cDNA from healthy chili pepper roots as driver, both collected at 8 and 16 h of interaction. PCR products obtained from the SSH were cloned, sequenced and analysed obtaining a total of 200 unigenes from 352 sequenced clones. These unigenes were classified into ten functional categories, including: stress responses (9%), defense (9%), cellular maintenance and development (7%), metabolism (21%), protein synthesis (2%), signaling (3%), transcription factors (2%), transport (5%), proteins of unknown function (16%) and non reported sequences (25%). We selected 16 unigenes for transcriptional profiling: an alanine aminotransferase, a pepper esterase, a TMV-induced protein, a sterol desaturase, a heat shock protein, an S-adenosylmethionine decarboxylase, a phosphate induced transcription factor, an ATPase, an omega desaturase, epoxide hydrolase, an E1 alpha subunit of pyruvate dehydrogenase, an acetolactate synthase, a GDP dissociation inhibitor, a Mads box transcription factor, a lipoxygenase and coffeoyl-CoA O methyltransferase.

The expression of these 16 unigenes was analysed by RT-PCR during the compatible interaction of chili with *R. solani*, *P. capsici*, *F. oxysporum*; and also during the incompatible interaction with binucleate *Rhizoctonia*, obtaining interesting expression patterns across the analysed interactions. We also evaluated the expression of the selected genes in response to treatments with plant growth regulators involved in biotic stress signalling such as methyl jasmonate, salicylic acid, and ethylene, and also with other regulators involved in abiotic stress such as abscisic acid. Some genes were induced by methyl jasmonate, salicylic acid, and ethylene but repressed by abscisic acid.

Keywords: chili pepper, pathogenesis, root rot and damping off, *Rhizoctonia solani*, SSH.

1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es un producto hortícola de gran importancia económica, cuyo consumo se ha extendido a nivel mundial, integrándose en la alimentación diaria de diversos países. El cultivo del chile también ha sido adoptado por muchos países como una parte primordial de su agricultura. En México está considerado dentro de las principales actividades hortícolas junto con el tomate y la papa, por la superficie de siembra que se les dedica (Velásquez-Valle *et al.*, 2004). A nivel mundial, México es el segundo productor más importante, después de China, en una producción anual con 1, 853, 610 toneladas (FAOSTAT, 2006). Sin embargo, el rendimiento que presenta China es de 20.45 t ha⁻¹ en comparación a las 13.17 de México; sin considerar a países como España que tienen un rendimiento de 42.36 ton/ha (FAOSTAT, 2006).

Los problemas fitosanitarios limitan la producción del cultivo del chile en todo el mundo. Entre estos destacan las enfermedades conocidas como pudrición de la raíz y marchitez del chile, causadas por *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* ssp. y *Pythium* spp. (González-Chavira *et al.*, 2002; González-Pérez *et al.*, 2004; Guerrero-Aguilar *et al.*, 2004; Velásquez-Valle *et al.*, 2004; Guillén-Cruz *et al.*, 2005), un complejo de patógenos habitantes del suelo. Estas enfermedades han ocasionado pérdidas de hasta el 100% de la cosecha por muerte prematura de las plantas (Virgen *et al.*, 1997; González-Chavira *et al.*, 2002).

R. solani es un hongo basidiomiceto necrotrófico de suelo que ataca numerosas especies de plantas (Ogoshi, 1996). Su estado infectivo es como micelio (anamorfo), que está conformado por una gran cantidad de hifas septadas, que se ramifican en ángulo recto. Sus células son multinucleadas, presentando más de tres núcleos por célula, distinguiéndose de las especies binucleadas que poseen uno o dos núcleos. *R. solani* puede permanecer por varios años en el suelo en forma de esclerocios, hasta que se den las condiciones climáticas ideales para su germinación, por lo que es muy difícil erradicarla de los campos. El mecanismo de ataque de este organismo consiste en penetrar la raíz de la planta por medio de una hifa, con la ayuda de presión y enzimas degradativas de la pared celular (Mendgen *et al.*, 1996). La enfermedad que ocasiona en la planta se

conoce como chancro del tallo, ya que necrosa la zona entre el tallo y la raíz, en forma de un anillo, por lo que evita el aporte de nutrientes de la raíz al resto de la planta provocando su debilitamiento y muerte (Liu *et al.*, 2003).

Para la planta se han propuesto mecanismos contra el ataque de patógenos como las barreras estructurales preformadas que impiden o retardan la entrada del patógeno y la posterior colonización de la planta, o bien mediante la síntesis de sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento del patógeno (Hutchenson, 1998; Glazebrook, 2005). Incluso las plantas como organismos sésiles, son dinámicos y contrarrestan la invasión de los patógenos con avanzadas estrategias de defensa, que incluyen las preformadas y el sistema inducible de defensa (Heath, 2000). Las defensas inducibles (Fig. 1) involucran una red compleja de percepción, amplificación y transducción de señales, que incluyen el reconocimiento de la invasión del patógeno por una señal inicial, cascadas de fosforilación de proteínas, flujo de iones, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generación de señales secundarias (vías de etileno, ácido salicílico y ácido jasmónico), activación de varios genes de defensa y reforzamiento de la pared celular (Dixon y Lamb, 1990; Dixon *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997; Song y Goodman, 2001).

La respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno y/o endógeno casi siempre es el resultado de la activación de varias rutas de señalización hormonal, como consecuencia de una red compleja de interacciones entre ellas. Distintos estímulos provocan una activación asimétrica de esas redes señalizadoras complejas y el balance final de interacciones entre las mismas determina las respuestas específicas al estímulo inicial (Solano y Lorenzo, 2005).

La percepción de la invasión de un patógeno ocurre por el reconocimiento de moléculas derivadas del patógeno, llamadas elicitores (Montesano *et al.*, 2003). La percepción de estos elicitores se realiza por receptores (Receptores tipo quinasa – RLK) localizados en la superficie de la célula o dentro de ella (Dardick y Ronald, 2006). La respuesta de señalización se realiza de acuerdo al tipo de elicitador, ya sea específico o general, que reconozca la planta. Se ha reportado que la inducción de los genes de defensa es más rápida y elevada en respuesta a elicitores específicos (Tao *et al.*, 2003).

Al reconocer el elicitador se desencadena una serie de respuestas iniciales (Fig. 1) como la fosforilación y desfosforilación de proteínas de la membrana plasmática, el incremento en la concentración de Ca^{+2} citosólico, cambios rápidos en el flujo de iones, activación de Proteínas Cinasas Activadas por Mitógeno (MAPK) y de NADPH oxidasas, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhao *et al.*, 2005).

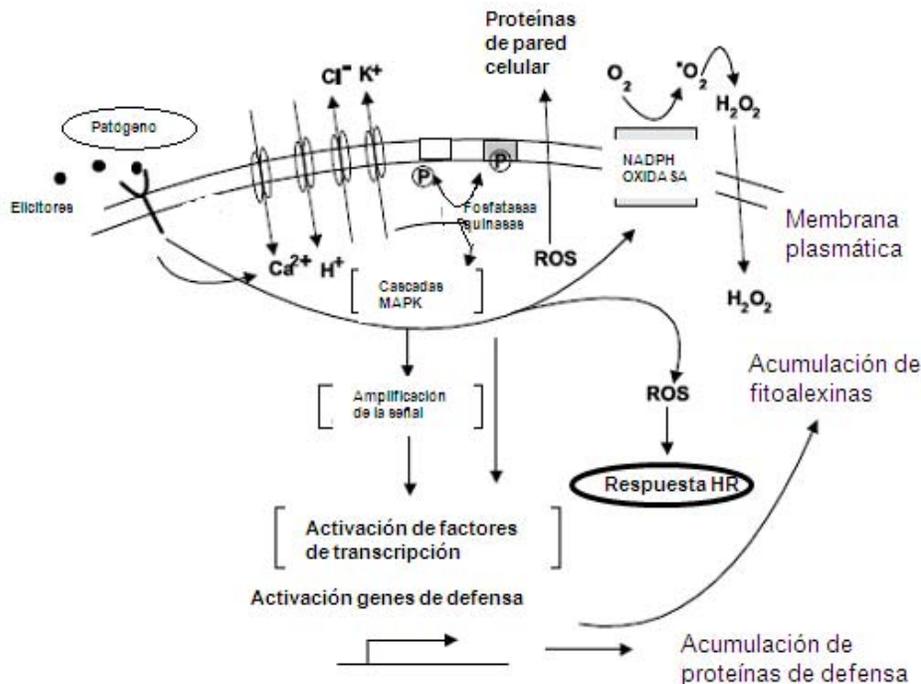


Figura 1. Respuestas de la planta inducidas por el reconocimiento del patógeno (adaptado de Buchanan *et al.*, 2002).

Una cadena de señales de alarma se transmite intracelularmente y comienza la acumulación de fitoalexinas y la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PR). Todo lo anterior es una respuesta basal de defensa, independientemente del tipo de elicitador que se detecte (Zhao *et al.*, 2005). Por ejemplo, los “elicitores generales” incluyen flagelinas, glucanos, quitinas y lipopolisacáridos, entre otros, y son generalmente parte indispensable del estilo de vida de los patógenos (Smith *et al.*, 2003). Mientras que los elicitores específicos, son proteínas que produce el patógeno con la finalidad de interferir, manipular o

suprimir la señalización de la infección, elevando las posibilidades del patógeno de infectar a la planta y desarrollar la enfermedad (Nürnberger *et al.*, 2004). Los elicitores específicos inducen el sistema de resistencia contra la enfermedad, basado en el modelo gen por gen. En éste, el patógeno sintetiza proteínas de avirulencia denominadas Avr, que pueden corresponder a alguna proteína de resistencia denominada R sintetizada por la planta. Cuando existe un acoplamiento entre ellas, la planta desencadena una respuesta de defensa específica, que da lugar a una respuesta hipersensible (HR), la cual finaliza con la muerte de las células infectadas de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1997; Bonas y Lahaye, 2002) y la enfermedad no prospera (interacción incompatible).

El reconocimiento del patógeno y la etapa inicial de la infección, disparan la producción de reguladores del crecimiento endógenos de señalización, como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET). Estos operan las principales rutas de defensa en plantas estudiadas hasta el momento: una dependiente de SA y la otra dependiente de JA y ET (Thomma *et al.*, 1998).

El SA media la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés). La SAR está asociada con la acumulación de componentes de defensa como las proteínas PR, y es efectiva contra un amplio rango de patógenos (Ryals *et al.*, 1996; Durrant y Dong, 2004; Glazebrook, 2005). En una interacción incompatible se desencadena la resistencia gen por gen, la respuesta hipersensible (HR), y finalmente la SAR (Glazebrook, 2005), comportándose la planta como resistente.

Los jasmonatos, especialmente el regulador de crecimiento JA y su éster, el metil jasmonato (MJ), regulan procesos de desarrollo, incluyendo la embriogénesis, el desarrollo del polen y la semilla, y el crecimiento de la raíz (Creelman y Mullet 1997; Farmer *et al.*, 2003; Liechti *et al.*, 2006). Además, el JA media la señalización de resistencia contra insectos, patógenos microbianos y la respuesta a estrés abiótico en daño por herida y por ozono (Farmer *et al.*, 2003). Las moléculas que dan lugar a la producción de jasmonatos son ácidos grasos oxigenados conocidos como oxilipinas (Farmer *et al.*, 2003). La respuesta mediada por JA es generalmente considerada efectiva en la defensa contra

patógenos necrotróficos, los cuales matan a las células de las plantas para obtener sus nutrientes (Turner *et al.*, 2002). La producción de JA por la planta eventualmente induce muchos genes, algunos relacionados con defensa y también genes que regulan su propia biosíntesis (Devoto y Turner, 2003).

El etileno (ET), es un regulador de crecimiento vegetal volátil, involucrado en varios procesos fisiológicos, incluyendo la germinación de semillas, la senescencia de órganos, la abscisión de hojas, la maduración de frutos y en las respuestas morfológicas de órganos de la planta (Bleecker y Kende, 2000). Además, el ET regula la respuesta de la planta al estrés abiótico, incluyendo aquella inducida por inundaciones o sequía, y también para el estrés biótico, como el ataque de patógenos (O'Donnell *et al.*, 2003). Entre la respuesta que involucra la acumulación de ET, está la inducción de genes de defensa como PR1, β -1,3-glucanasa y quitinasa básica (Thomma *et al.*, 1998). La cascada transcripcional que involucra al ET, se realiza por una serie de proteínas que activan finalmente a proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno (EREBPs, por sus siglas en inglés) (Wang *et al.*, 2002).

Recientemente, se han descrito otros reguladores de crecimiento implicados en el estrés biótico, los cuales han sido principalmente involucrados y caracterizados bajo estrés abiótico en plantas. Entre ellos encontramos al ácido abscísico (ABA), las auxinas y las poliaminas.

El papel del ácido abscísico (ABA) en la señalización del estrés abiótico, ha sido ampliamente estudiado, pero su importancia en la respuesta al estrés biótico apenas recientemente comienza a conocerse (Mauch-Mani y Mauch, 2005). El ABA es un regulador de crecimiento derivado de carotenoides que tiene un amplio rango de funciones esenciales en el crecimiento y el desarrollo de la planta (Finkelstein y Gibson, 2002). Entre ellas se incluye la estimulación del cierre de estomas (bajo estrés hídrico), la promoción del desarrollo de la raíz, la inhibición del desarrollo de brotes e induce la síntesis de proteínas de almacenaje en semillas (Milborrow, 2001). Un incremento endógeno de ABA ha sido observado en respuesta a infección por virus, bacterias y hongos (Kettner y Dörfling, 1995). El ABA parece influenciar la respuesta al estrés biótico bloqueando con la

señalización regulada por SA, JA y ET, pero también a través de componentes comunes de señalización de estrés (Mauch-Mani y Mauch 2005). Sin embargo, investigaciones recientes mostraron que el ABA puede también elevar la resistencia de la planta hacia los patógenos, a través de un efecto positivo en la deposición de callosa formada por β -1-3-glucanos (Ton y Mauch-Mani, 2004). La callosa es el principal constituyente de una papila localizada en la superficie interna de la pared celular en la epidermis del apoplasto (Thomma *et al.*, 1998).

Las auxinas son reguladores de crecimiento críticos de las plantas, que modulan diversos procesos como respuestas trópicas a la luz y a la gravedad, la arquitectura general de la raíz y el tallo y el desarrollo vascular; además son utilizadas en el desarrollo de cultivo de tejidos (Davies, 2004; Woodward y Bartel, 2005). En el caso de ataque de patógenos, se conoce poco sobre la red de señalización que involucra al ácido indol acético (IAA, por sus siglas en inglés). Aunque existen evidencias que muestran que el pretratamiento de plantas con IAA, puede retardar la invasión de algunos hongos, e incluso el desarrollo de la enfermedad (dependiente de la dosis de IAA aplicada); sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan el proceso no se han elucidado (Martínez *et al.*, 2001).

Las poliaminas (PAs), principalmente putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), son compuestos policatiónicos de bajo peso molecular, que están presentes en todos los organismos vivos (Tiburcio *et al.*, 1997). Han sido propuestos como una nueva categoría de reguladores del crecimiento en plantas, por estar involucrados en un amplio espectro de procesos fisiológicos, como la embriogénesis, la división celular, la morfogénesis y el desarrollo (Liu *et al.*, 2006). La Spm se ha propuesto que juega un papel durante la respuesta a estrés biótico (Yoda *et al.*, 2003). Ésta se acumula dramáticamente en una respuesta específica de gen por gen en el apoplasto de plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), debido a la inducción de genes involucrados en la biosíntesis de Spm (Yamakawa *et al.*, 1998, Yoda *et al.*, 2003). Las poliaminas acumuladas son subsecuentemente degradadas en el apoplasto por la enzima poliamino oxidasa, generando H_2O_2 que pudiera contribuir a la respuesta de

defensa de la planta (Yoda *et al.*, 2003).

Algunos genes relacionados con la defensa de las plantas han sido aislados y caracterizados, entre ellos se encuentran factores de transcripción, MAPKs, transportadores de iones, proteínas relacionadas a patogénesis (PR) y fitoalexinas (Xiong *et al.*, 2001). Una aproximación para lograr la identificación masiva de genes diferencialmente expresados durante el ataque de un patógeno a una planta, es mediante la obtención de genotecas por hibridación supresiva sustractiva (SSH) (Degenhardt *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2001).

Degenhardt y colaboradores (2005), reportaron la construcción de una SSH empleando ácido ribonucleico (RNA) de hojas de dos variedades de manzana, una resistente y otra susceptible a la infección del hongo *Venturia inaequalis*. De este estudio se obtuvieron 262 unigenes preferencialmente expresados en la variedad resistente. Muchos de estos transcritos codifican para proteínas relacionadas con defensa, como proteínas PR que pueden brindar la protección a la variedad resistente contra la infección con *V. inaequalis*.

En el 2004, Han *et al.*, identificaron 26 genes de arroz inducidos en una variedad resistente al ataque del hongo *Magnaporthe grisea*, mediante SSH. Dentro de estos, encontraron genes que codifican para proteínas homólogas a PR5, para proteínas inhibidoras de proteinasas y también para algunas proteínas involucradas en la regulación y la transducción de señales.

Fernández *et al.* (2004), identificaron 527 EST's (Expressed Sequence Tag's) expresados en las etapas tempranas de la interacción incompatible de hojas de café (*Coffea arabica* L.) con el hongo *Hemileia vastatrix*. Observaron que más de la cuarta parte de los genes aislados, codifican proteínas de defensa, relacionadas al estrés, y también componentes de las vías de transducción de señales.

Los estudios realizados con interacciones planta – patógeno, mediante la técnica de SSH, nos dan información general sobre la respuesta de defensa molecular de una planta en el proceso infectivo de un patógeno. Respecto a la respuesta de defensa de *Capsicum annuum* contra el ataque de *Rhizoctonia*

solani, no existen reportes a nivel molecular de los genes expresados durante esta interacción.

En México, se ha realizado la búsqueda de fuentes de resistencia en Chile a *R. solani* y algunas colectas han resultado sobresalientes por tener bajos niveles de daño causados por este hongo (Sánchez-García *et al.*, 2006, Sánchez-García *et al.*, 2005). Sin embargo, aun no se conocen variedades mejoradas de Chile que posean elevada resistencia contra el patógeno. Se ha intentado hasta la fecha el control químico, el cual es dañino para el ambiente, y no es efectivo en la erradicación de los patógenos causantes de la pudrición de la raíz y marchitez del Chile. Por ello el empleo de herramientas moleculares, como la obtención masiva de genes mediante la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH), permitirá obtener información muy útil de la respuesta molecular específica de la planta de Chile durante la interacción con *R. solani*. Por un lado, la información recabada permitirá enriquecer el conocimiento que se tiene sobre el transcriptoma de Chile y por otro, permitiría seleccionar genes candidatos para la transformación de plantas y la generación de especies resistentes a la enfermedad.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar genes de *C. annuum* tipo Guajillo, que se inducen durante la etapa inicial de la interacción con *Rhizoctonia solani*. Con la construcción de la genoteca sustractiva (SSH), se aislaron 500 clonas, y se secuenciaron 352 fragmentos. Se analizó el perfil de expresión de 16 genes de Chile obtenidos de la SSH, tanto en la interacción con *R. solani* como en la interacción con otros dos patógenos causantes de la enfermedad. Además, se analizó la expresión de estos genes en la interacción con *Rhizoctonia* binucleada, que es usada como agente de biocontrol de organismos fitopatógenos. Por último, se realizaron tratamientos con reguladores del crecimiento en la raíz de plántulas de Chile, y se analizó el perfil de expresión de los 16 genes seleccionados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Material vegetal

En el presente estudio se emplearon semillas de chile de un criollo tipo Guajillo de *C. annuum* L, proporcionadas gentilmente por el Dr. Saúl Fraire Velázquez de la Universidad de Zacatecas. Este criollo es susceptible (interacción compatible) a la infección con *R. solani* multinucleada.

2.1.1.1 Cultivo del material vegetal

Las semillas de chile fueron tratadas con hipoclorito de sodio al 1%, y lavadas dos veces con agua destilada estéril. Las semillas se germinaron en placas de agar-agua al 2.0%. Cuando la raíz de las plántulas alcanzó un tamaño de 1 cm de largo, las plántulas fueron transplantadas a cajas Petri con MS 0.5X (Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron en este medio hasta cumplir tres semanas de edad. Las cajas Petri se mantuvieron en posición vertical para lograr que la raíz de las plántulas creciera sobre la superficie del MS. Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas con una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad.

2.1.2 Microorganismos

a) Hongos fitopatógenos y *Rhizoctonia binucleada*

Se emplearon las cepas ZAC9-P3 de *R. solani*, PCT-17 de *P. capsici* Leo, CHP4F1 de *F. oxysporum* y Gto19-S2 de *R. binucleada*, aisladas de campos de cultivo de los estados de Guanajuato y Zacatecas. Estas cepas fueron conservadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con glicerol al 50 %.

b) *Escherichia coli*

Para la transformación y amplificación del ADN (ácido desoxirribonucleico) recombinante se empleó la cepa de *E. coli* One Shot® electrocompetente (Invitrogen). La cepa se conservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales de glicerol al 50 %. Se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio LB (Lurian-Bertani) sólido por cuatro meses aproximadamente.

2.1.2.1 Cultivo

a) Hongos fitopatógenos y *Rhizoctonia binucleada*

Los hongos fueron propagados en medio PDA (agar dextrosa y papa) a partir de un fragmento de micelio, crecido a 28 °C durante 3 días como inóculo para las interacciones planta patógeno que se describen más adelante. Además, se emplearon cultivos de *R. solani* de 3 días de edad como controles para la genoteca como se describe en la sección 2.5.3.

b) *Escherichia coli*

Las células *E. coli* que se sometieron a transformación se sembraron en cajas Petri con LB sin antibiótico y se incubaron por 16 horas a 37 °C. Las colonias de *E. coli* transformadas se tomaron con un palillo estéril, se rayaron en placas de LB con kanamicina y el palillo se introdujo en un tubo de ensayo con 3 ml de LB líquido con kanamicina, se mantuvieron a 37 °C por 12 horas con agitación constante (200- 250 revoluciones por minuto).

2.1.2.2 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua destilada. En los casos en que fue necesario se añadió kanamicina esterilizada por filtración, a una concentración de 50 µg/ml. Para la preparación de medios sólidos se empleó agar (MOBIO) al 1.5 %.

a) Hongos fitopatógenos y *Rhizoctonia binucleada*

El PDA se preparó con 39 g de medio de cultivo agar dextrosa y papa de la marca Bioxon en 1 litro de agua, se esterilizó y vació en placas Petri.

b) *Escherichia coli*

El medio LB líquido se preparó agregando a 1 L de agua destilada, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura (Becton Dickinson), 5 g de NaCl (Fermont) y 1 ml de NaOH 1 N (CTR scientific). Se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y cuando la temperatura del medio bajó a menos de 40 °C se agregaron 500 µl de kanamicina (50 mg/ml).

2.1.3 Plásmidos empleados

El plásmido empleado para la clonación de los fragmentos aislados de la SSH, fue el pCR4-TOPO. Éste plásmido bacteriano es autoreplicativo, con un tamaño de 3.9 kb, empleado para clonar, secuenciar y expresar genes heterólogos. Contiene los genes que confieren resistencia a kanamicina y a ampicilina, el gen letal *ccdB* de *E. coli* fusionado al fragmento C-terminal del gen de la β -galactosidasa (*LacZ α*) y un sitio de clonación múltiple. La ligación del producto de PCR interrumpe la expresión de la fusión *ccdB-LacZ α* permitiendo así el crecimiento exclusivo de clonas recombinantes mientras que las clonas con ausencia de inserto mueren por la transcripción del gen letal *ccdB* (Invitrogen, USA).

2.2. Interacción de *Capsicum annuum* tipo guajillo – *Rhizoctonia solani*.

El sistema de interacción se realizó empleando plantas de chile de tres semanas de edad crecidas en placas Petri con medio MS 0.5X. La raíz de las plantas de chile fue inoculada con fragmentos de colonias del hongo (crecido por 3 días como se describe en la sección 2.1.2.1). Los fragmentos consistieron de secciones de aproximadamente 2 mm de ancho por 3 cm de largo; y se colocaron con la superficie de crecimiento micelial hacia la raíz de las plántulas de chile.

Durante la interacción, las cajas se mantuvieron en la cámara de crecimiento (como se describe en la sección 2.1.1.1). Se colectaron las raíces a las 8 y 16 h de interacción (tiempos en los que se observaron síntomas físicos iniciales de la enfermedad, como pequeños puntos de necrosis). Las raíces se congelaron con nitrógeno líquido, y se guardaron a -80 °C para posteriormente utilizarlas en la obtención del RNA.

2.3 Interacción de *Capsicum annuum* con *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia binucleada*.

Se realizaron interacciones como se describe en el apartado 2.2, con otros hongos fitopatógenos involucrados en la pudrición de la raíz y marchitez del chile, como

son *F. oxysporum* y *P. capsici* (interacciones compatibles), y con la cepa binucleada de *Rhizoctonia* que presenta una interacción incompatible con el chile (Poromarto *et al.*, 1998). El RNA obtenido de las raíces de chile de las interacciones, se utilizó para la obtención de cDNA y el análisis transcripcional como se describe más adelante en el apartado 2.6.

2.4 Tratamientos con diferentes reguladores de crecimiento

Se aplicaron tratamientos de reguladores de crecimiento a plántulas de chile Guajillo, de tres semanas de edad, crecidas en las mismas condiciones descritas anteriormente en la sección 2.1.1.1. Los tratamientos consistieron en aplicar en las raíces de chile 1 ml de cada regulador de crecimiento (Sigma Aldrich): ácido abscísico (ABA) 100 μ M, ethephon (Eth) 10 mM, ácido indol acético (IAA) 5.7 mM, una mezcla de poliaminas (PAs) (putrescina 1 mM, espermina 0.001 mM y espermidina 0.001 mM) y ácido salicílico (SA) 1 mM. En el caso del metil jasmonato (MJ), se aplicó un algodón con 15 μ l de MJ al 95% y se permitió que los vapores actuaran sobre las plantas. Como control se empleó agua destilada. Los tratamientos se mantuvieron por 16 h.

2.5 Obtención de genoteca substractiva

2.5.1 Extracción de RNA

El RNA total fue extraído de raíces de chile inoculadas con el hongo (condición problema) y de las raíces de chile sin inocular y del micelio del hongo (condición control) de ambos tiempos, de acuerdo al protocolo del manual RNeasy kit (Qiagen). Para verificar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en un gel de agarosa desnaturalizante al 1%.

2.5.2 Síntesis, amplificación y purificación de la población de cDNA.

Se empleó 1 μ g de RNA total de cada condición (mezclando ambos tiempos de interacción de 8 y 16 h) como molde para sintetizar el cDNA utilizando el kit SuperSMART™ PCR cDNA síntesis Kit (Clontech). Para purificar la población de

cDNA de primera cadena se empleó el Nucleo Spin Extraction II Kit (Macherey-Nigel) y las columnas CHROMA-SPIN 1000 después de la síntesis de la segunda cadena.

2.5.3 Construcción de la genoteca sustractiva

La SSH forward se realizó de acuerdo al protocolo PCR-Select™ cDNA subtraction kit (Clontech). El cDNA obtenido de la interacción de la raíz de chile-*R. solani* se empleó como problema; mientras que el cDNA obtenido de la raíz de chile Guajillo y de *R. solani* sin interaccionar se utilizó como control, tanto problema como control contenían ambos tiempos de cosecha. Ambos cDNAs fueron digeridos con la enzima *RsaI*, y al cDNA problema se le ligaron los adaptadores 1 y 2R (Diatchenko *et al.*, 1996). Para normalizar y enriquecer los cDNAs expresados diferencialmente se realizaron dos rondas sucesivas de hibridación y amplificación por PCR.

Los productos del segundo PCR fueron clonados en el vector TOPO PCR 4 (Invitrogen) y los productos de la ligación fueron utilizados para transformar células de *E. coli* One Shot® electrocompetentes (Invitrogen). Las células transformadas fueron sembradas en cajas Petri con LB/kanamicina y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias transformantes fueron cultivadas individualmente en medio LB/kanamicina con agitación a 37°C toda la noche. El DNA plasmídico fue obtenido por el método de Birnboim modificado (Kotchoni, 2003). La presencia de insertos y el tamaño de los mismos fue determinada por análisis de restricción con la enzima *EcoRI*. Las clonas fueron almacenadas a -80 °C en stock de glicerol al 50% (v/v).

2.5.4 Secuenciación del DNA plasmídico

Los productos clonados fueron secuenciados siguiendo la técnica descrita por Sanger *et al.*, (1977). Como DNA molde se utilizó cada plásmido y como oligonucleótidos se emplearon el iniciador universal de M13 y el reverso. La secuenciación la realizó el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV Campus Irapuato.

2.6 RT-PCR

a) Obtención del cDNA

Para obtener el perfil de expresión de algunos de los genes aislados de la genoteca de Chile - *R. solani*, se sintetizó el cDNA de doble cadena para la condición control y la condición problema empleando el kit SuperSmart (Clontech) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. En el caso de las interacciones de las plántulas de Chile con otros fitopatógenos (*F. oxysporum* y *P. capsici*) y la cepa binucleada de *Rhizoctonia*, también se sintetizó cDNA de doble cadena, igual que lo descrito en la interacción con *R. solani*.

Para obtener el RNA total de las raíces tratadas con reguladores de crecimiento, se utilizó la técnica de Plant RNA Purification Reagent Concert (Invitrogen). Se verificó su integridad en una electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante al 1%; y se utilizaron 2 µg de RNA para sintetizar el cDNA con el kit de SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen).

b) Amplificación por PCR

Se seleccionaron arbitrariamente dieciséis genes obtenidos en la genoteca para determinar su perfil de expresión. El diseño de oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos genes, se realizó en base a las secuencias EST's obtenidos de la SSH. En la Tabla 1 se muestra la secuencia de dichos oligonucleótidos, así como el tamaño del amplicón obtenido. Se empleó como un control de carga el gen que codifica para la actina de *C. annuum*. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 50 µl, empleando 1µl de cDNA como molde. Se realizaron amplificaciones de 30 a 35 ciclos de PCR dependiendo de cada transcrito. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2.0% y la intensidad de señal se cuantificó usando el software de Doc-it (UVP, Inc.), normalizándose en base al gen de actina.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación de genes inducidos en *Capsicum annuum* durante la interacción con el hongo necrotrófico *Rhizoctonia solani*.

Para aislar e identificar genes inducidos de raíz de chile Guajillo (*C. annuum*) durante la interacción con el hongo patógeno *R. solani*, se construyó una genoteca sustractiva (SSH). Se utilizó un sistema *in vitro* para el crecimiento de las plantas de chile, consistente en cajas Petri con medio MS 0.5X (Fig. 2A). Las plántulas se inocularon con el hongo a las tres semanas de edad (Fig. 2B), y se cosecharon a las 8 y 16 h de interacción.

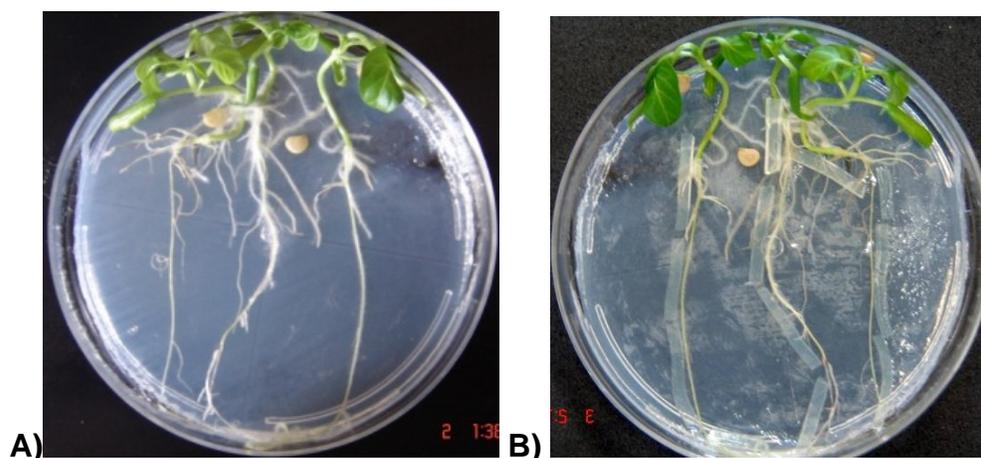


Figura 2. Sistema *in vitro* de crecimiento de plántulas de chile Guajillo. A) Plántulas control. B) Plántulas en interacción con *R. solani*.

Para la condición problema de la SSH, se utilizó el RNA obtenido de la raíz de las interacciones a las 8 y 16 h, en una relación uno a uno. Por otro lado, para la condición control, se realizó una mezcla del RNA de la raíz de chile sin interacción y del RNA del hongo propagado en medio PDA, la relación utilizada fue de dos partes de RNA de planta y una parte de RNA de hongo, también utilizando el RNA obtenido a las 8 y 16 h. La relación dos a uno del control se obtuvo por

medio de un Dot Blot (datos no mostrados), utilizando en la membrana diferentes concentraciones (2 μg — 0.2 μg) de DNA, obtenido de la raíz de chile y también DNA del hongo, y se hibridó contra cDNA obtenido de la interacción raíz—hongo, el cual estaba marcado con un sustrato quimioluminiscente.

Durante la interacción entre el hongo *R. solani* y la raíz de las plántulas de chile Guajillo, no se observó ninguna evidencia física de daño en la raíz a las 8 h, sin embargo; a las 16 h empezaron a observarse pequeños puntos cafés espaciados a lo largo de la raíz, característicos de necrosis.

Los fragmentos amplificados de la SSH, se clonaron en el vector Topo-PCR4. De alrededor de 500 clonas se seleccionaron 352 que tenían un tamaño de inserto de entre 200 y 1000 pb, esto se realizó por análisis de restricción con la endonucleasa *EcoRI*. Los fragmentos se secuenciaron con el primer universal.

Posteriormente, se realizó un análisis *in silico* de las secuencias con el programa Edit Seq II (DNASTar Inc.), eliminando el vector y los oligos. Se ensamblaron todas las secuencias, obteniendo un total de 235 agrupamientos o “contigs”, con el programa Seqman II (DNASTar Inc.). Estos EST’s se analizaron utilizando como herramienta el programa Blast para DNA y proteínas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Como resultado se obtuvo un total de 200 unigenes, los cuales están conformados por uno o varios contigs, que a su vez están constituidos por varias secuencias y por último secuencias únicas (Tabla 2). De los unigenes reportados en la Tabla 2, los fragmentos únicos (un EST) tienen un tamaño promedio aproximado de “350” pb, los contigs de “450” pb y los unigenes de “800” pb. De estos agrupamientos, el 74% está formado por un sólo EST, el 21% se conforma de un sólo contig, que a su vez está formado de hasta 5 EST y el 5% restante se conforma de 2 a 7 posibles agrupamientos.

Los 200 unigenes se agruparon según la posible función biológica reportada en la base de datos del www.geneontology.org y su clasificación se muestra en la Figura 3. Según esta clasificación, un 21 % de los unigenes está destinado al metabolismo, un 9 % a la síntesis de proteínas relacionadas a defensa, un 9 %

relacionados con el estrés en general, y con porcentajes menores al 3 % encontramos unigenes involucrados en rutas de señalización, transducción de señales, síntesis de proteínas y muerte celular. Por otro lado, un porcentaje muy significativo, del 16 % de los unigenes, codifican para proteínas de función desconocida y un 25 % para secuencias no reportadas en la base de datos, éstas últimas pueden tratarse de secuencias que correspondan a regiones no traducibles (UTR's).

3.2 Análisis de la expresión de genes inducidos en *C. annuum* durante la interacción con *R. solani*.

Para confirmar la expresión diferencial de los genes de raíz de Chile durante la interacción con *R. solani*, se analizó un grupo de genes, utilizando las mismas muestras de raíces obtenidas para la SSH. De los 200 unigenes, seleccionamos 16 para determinar la acumulación de estos transcritos mediante experimentos de RT-PCR. Por otro lado, se evaluó la expresión de estos genes en respuesta al ataque de otros hongos patógenos de la raíz del Chile como *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*. También se analizó la interacción incompatible con una cepa de *Rhizoctonia binucleada*; la cual no es patógena de Chile, y se comporta como un agente de biocontrol contra los patógenos (Rodríguez-Guerra *et al.*, 2006; Poromarto *et al.*, 1998). Esto permitió observar el patrón de expresión de los genes de Chile obtenidos durante la interacción compatible con *R. solani*, en dos interacciones más y una interacción incompatible. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron optimizadas para no producir una saturación en la acumulación de los productos de PCR, manteniendo una relación lineal con los niveles originales del transcrito en todas las muestras. Para los 16 genes analizados, las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores obtenidos fueron estandarizados con el gen actina (Fig. 3-5), utilizando un número estándar de ciclos de PCR (entre 28 y 35, dependiendo de cada gen; datos no mostrados). El nivel de expresión del control en cada condición se normalizó al valor 1 (Fig. 4).

En la interacción de las raíces de Chile con *R. solani*, los genes que codifican para una esterasa y un factor de transcripción inducido por fosfatos (Phi-2), que se muestran en la Figura 4AII y 4BIV respectivamente, presentan el aumento más significativo en sus niveles de expresión, siendo 2 veces mayor respecto a raíces de Chile sin el patógeno (control). Los genes que codifican para una esteroles desaturasa (Fig. 4BI) y una S-adenosil metionina descarboxilasa (Fig. 4BIII), presentan una inducción en los niveles de expresión en un rango entre 1 y 2 veces más con respecto al control. El gen que codifica para una lipoxigenasa (Fig. 4DIV) no presenta cambios con respecto al control. Los demás genes analizados presentan una inducción de la expresión entre 0.5 y 1 vez más con respecto al control (Fig. 4).

Al comparar la expresión de los 16 genes entre las interacciones con *R. solani* y *Rhizoctonia* binucleada se observó que los genes que codifican para una acetolactato sintasa (Fig. 4DI), un inhibidor de la disociación de guanosa difosfato (GDP, por sus siglas en inglés) (Fig. 4DII) y una lipoxigenasa (Fig. 4DIV), presentan una inducción de entre 1 y 1.5 veces más en la interacción con *Rhizoctonia* binucleada en comparación con *R. solani*. El resto de los genes presentan una expresión con una diferencia máxima entre ambos de 0.5 veces (Fig. 4).

Respecto a las interacciones con los fitopatógenos *F. oxysporum* y *P. capsici*, se observaron cambios en la expresión de los genes, al ser comparados con la expresión observada en las interacciones con *R. solani* y *Rhizoctonia* binucleada. El gen que codifica para una acetolactato sintasa (Fig. 4DI) presenta una expresión similar a la del control, en las tres interacciones con los fitopatógenos, sin embargo en el caso con *Rhizoctonia* binucleada se observó una inducción en más de una vez. Por otro lado, el gen de cafeoil-CoA O-metiltransferasa (Fig. 4DV) presentó una expresión mayor en las interacciones con *F. oxysporum* y *P. capsici* que con cualquiera de las especies de *Rhizoctonia*.

En la interacción con *F. oxysporum*, casi todos los genes presentan una expresión menor, comparada con alguna de las especies de *Rhizoctonia*. Por

ejemplo, los genes que codifican para una lipoxigenasa (Fig. 4DIV), una proteína de choque térmico (Fig. 4BII) y un factor de transcripción de caja MADS (Fig. 4DIII), presentan una represión entre 50 al 70 % en sus niveles de expresión durante la interacción con *F. oxysporum* comparado con el control, aunque si se compara con las especies de *Rhizoctonia* la represión es aún mayor. Sin embargo, en el caso de los genes que codifican para una aminotransferasa de alanina (Fig. 4AI) y para una esterasa (Fig. 4BII) se presenta una expresión muy similar a la que se da en la interacción con el género de *Rhizoctonia*, el cual es de alrededor de 2 veces con respecto al control.

En la interacción con *P. capsici*, en la mayoría de los genes la expresión se mantiene en el mismo rango o es menor que con la interacción de alguna de las especies de *Rhizoctonia*, no obstante es una expresión mayor al control. Esto no ocurre con el gen que codifica para una ATPasa (Fig. 4CI) en el cual se reprimió la expresión en un 50 % respecto al control.

3.3 Análisis de la expresión de los 16 genes obtenidos de la SSH de Chile durante la interacción con reguladores de crecimiento.

Para elucidar si los 16 genes analizados de la SSH (en la interacción de raíces de Chile con *Rhizoctonia solani*) se regulan en respuesta a diversos reguladores de crecimiento, se planteó un experimento utilizando el mismo sistema de crecimiento de las plántulas de Chile, pero sustituyendo los hongos por los compuestos. Se aplicaron diversos tratamientos que consistieron en la aplicación en la raíz de 1 ml de ácido abscísico (ABA) 100 μ M, Ethephon (Eth) 10 mM, ácido indol acético (IAA) 5.7 mM, poliaminas (PAs): putrescina (1 mM), espermina 0.001 mM y espermidina 0.001 mM); ácido salicílico (SA) 1 mM, y metil jasmonato (MJ) 15 μ l al 95 % en un algodón y al control 1 ml de agua destilada estéril. En la Figura 5, se muestran los resultados de la expresión de los 16 genes de Chile en respuesta a los tratamientos con los reguladores de crecimiento durante 16 h. En los histogramas se muestra la normalización de la cuantificación de la expresión de cada gen

contra la expresión del gen de actina, considerando el control de cada gen normalizado al valor 1.

Con el tratamiento con SA, se observó una inducción de 5 veces, para el transcrito que codifica para una proteína inducida por el virus del mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) (Fig. 5C), en comparación con raíces sin tratamiento (control). También aumenta la expresión de los genes que codifican para el inhibidor de disociación GDP (Fig. 5M), el factor de transcripción inducido por fosfatos 2 (Fig. 5G) y la esterasa (Fig. 5B) pero en menor proporción, entre 0.4 y 0.6 veces más que el control.

En el caso de las plántulas tratadas con Eth, se observó un aumento de la expresión de 2 veces más en el gen que codifica para una proteína inducida por TMV (Fig. 5C) comparada con el control. El gen que codifica para una esterasa (Fig. 5B) aumentó su expresión 0.7 veces más comparado con el control. La expresión de los genes que codifican para el factor de transcripción de la caja MADS (Fig. 5N), para una omega desaturasa (Fig. 5I) y para un factor de transcripción inducida por fosfatos 2 (Fig. 5G), se reprimió un 30 % comparado con el control.

En el tratamiento con MJ, se observó un aumento en la expresión de 2.4 veces en los genes que codifican para una lipoxigenasa (Fig. 5O) y para una proteína inducida por TMV (Fig. 5C) con respecto al control. La expresión del gen que codifica para una esterasa (Fig. 5B) aumento 0.8 veces respecto al control. La expresión del gen que codifica para la subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa (Fig. 5K), se reprimió un 40% comparado con el control.

Cabe mencionar que con el tratamiento de ABA, se induce 1 vez más la expresión del gen que codifica para una proteína inducida por TMV comparada con el control (Fig. 5C). La expresión de los genes que codifican para una esterasa (Fig. 5B), para una lipoxigenasa (Fig. 5O) y para una esterol desaturasa (Fig. 5D) disminuyen hasta un 60% en relación al control.

En el tratamiento con IAA, se induce 1.7 veces más la expresión del gen que codifica para una proteína inducida por TMV (Fig. 5C) y 1.3 veces más el que codifica para una esterasa (Fig. 5B) comparadas con el control. Se reprime por completo la expresión de los genes que codifican para una lipoxigenasa (Fig. 5O) y para una proteína de choque térmico (Fig. 5E), y en un 20 % la de los genes que codifican para un factor de transcripción de la caja MADS (Fig. 5N) y para la subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa (Fig. 5K), comparados con el control.

Es interesante observar que con el tratamiento de PAs, se induce 2.6 veces más la expresión del gen que codifica para una proteína inducida por TMV (Fig. 5C) de acuerdo a la del control y 0.4 veces más la del gen que codifica para una esterasa (Fig. 5B). En el caso de todos los demás genes se reprime la expresión en rango 20 y 60 %, respecto al control.

4. DISCUSIÓN

La marchitez y pudrición del chile continúa siendo una de las enfermedades más severas a nivel nacional e internacional. Esto debido a que no se cuenta con variedades de chile con elevados niveles de resistencia contra los patógenos que la causan. Una aproximación interesante para estudiar molecularmente este fenómeno de interacción entre la raíz de chile con fitopatógenos y hongos benéficos, es la construcción de genotecas sustractivas para obtener una colección de EST's que se expresen durante esas interacciones. Por lo anterior, en el presente trabajo, se aislaron genes que se inducen en la raíz de chile tipo Guajillo en presencia del hongo *R. solani* en dos tiempos de la etapa inicial de interacción, 8 y 16 h. De los EST's aislados, se esperaba encontrar genes que posiblemente estuvieran involucrados en los mecanismos de defensa de la planta, genes que al aumentar su expresión indirectamente podrían estar auxiliando al patógeno para lograr la infección (genes de susceptibilidad) y otro grupo de genes que no estén involucrados en la defensa, y que su expresión dependa de los procesos que están sucediendo durante la interacción planta-patógeno. Como se va a discutir a continuación, nosotros identificamos genes que en otros sistemas vegetales están involucrados en la defensa de la planta contra patógenos, y otros de los cuales no se conoce su participación en la defensa de la planta contra microorganismos; aunque algunos están descritos en otro tipo de estrés, como abiótico. Este grupo de genes que representan el 16% de los unigenes obtenidos de la genoteca, es muy importante, ya que es información novedosa, en donde se puede caracterizar un nuevo gen involucrado en la defensa de la planta o alguno que favorezca al patógeno para el desarrollo de la enfermedad, como se describe para los genes de susceptibilidad.

Por otra parte, un punto importante de señalar, es que se esperaría que siendo un sistema compatible, en donde el hongo infecta a la planta, los genes que ya se han descrito en otros sistemas vegetales en los mecanismos de defensa y/o en estrés en general, no aparecieran en una proporción importante, pero son el 18 % de los unigenes identificados. Esto muestra que la planta activa sus sistemas de defensa por la participación de los unigenes involucrados en señalización (3 %), a

pesar de ser una interacción compatible. Sin embargo, el hongo continúa con el desarrollo de la enfermedad posiblemente utilizando los mismos mecanismos de virulencia que pueden llevar a la muerte de células o tejidos de la planta, o a que los genes de defensa expresados son una respuesta tardía de la planta a la presencia del patógeno. La expresión de estos genes de defensa involucra factores de transcripción, de los cuales correspondió al 2 % de los unigenes identificados. Además, todo el proceso, desde el reconocimiento del elicitor, hasta la transcripción de genes de defensa, involucra un aumento en el metabolismo de la planta, con su consecuente incremento de expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas (21%). Asimismo, debido a las lesiones ocasionadas por la penetración del patógeno, la planta necesita reparar el daño, y reforzar las defensas estructurales, lo que involucra la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas con el mantenimiento y desarrollo celular (7 %). A continuación se discute el posible papel de los unigenes analizados durante estrés biótico y el tratamiento con reguladores de crecimiento.

4.1 Alanina aminotransferasa (Unigen 6)

La alanina aminotransferasa (AlaAT), es una enzima clave en el metabolismo de carbono y nitrógeno en plantas, y cataliza una reacción de transaminación reversible en la cual la L-alanina y el ácido 2-oxoglutarico son convertidos en piruvato y glutamato. La inducción del gen que codifica para la AlaAT se ha reportado en plantas de Chile (*Capsicum annuum* L. cv. Bugang) en respuesta a hormonas como SA y Eth, y durante la interacción incompatible con virus y bacterias (Kim *et al.*, 2005). En nuestro estudio utilizando la variedad de Chile Guajillo, la mayor expresión del gen de la AlaAT se presenta en la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada, pero su expresión también se eleva durante la interacción con los hongos *R. solani* y *F. oxysporum*, que presentan una interacción compatible con nuestra variedad de Chile estudiada. Se encontró que con los tratamientos de SA y Eth, presenta una ligera inducción comparada con el control, mientras que con las hormonas IAA, ABA y MJ, la expresión del transcrito es más elevada, alcanzando 1.8 veces con IAA. Durante una interacción planta-

patógeno, se ha observado que la planta requiere grandes cantidades de ATP producidas a partir de piruvato, y sobre todo en condiciones limitantes de azúcar, esta generación de C3 por la reacción de AlaAT, limita la acumulación de acetaldehído, un componente tóxico para la planta. También, el incremento de alanina va acompañado de un incremento en ácido γ -amino butírico, ambos aminoácidos pudieran intervenir en la regulación del pH citosólico (Ricoult *et al.*, 2005). Esta vía de generación de energía al convertir la alanina en piruvato, puede facilitar los requerimientos energéticos de la planta durante la respuesta de defensa (Kim *et al.*, 2005). Posiblemente, la inducción de la AlaAT observada en las interacciones con los cuatro hongos juegue un papel similar.

4.2 Esterasa (Unigen 41)

Las esterases, catalizan la hidrólisis de compuestos que contienen un enlace éster, y se ha propuesto que participan en la síntesis o degradación de alguna molécula involucrada en la transducción de señales para la resistencia a enfermedades en plantas (Ko *et al.*, 2005, Stuhlfelder *et al.*, 2002). En los últimos años, se han identificado varias esterases involucradas en defensa, por ejemplo la hrs203J, que se ha visto involucrada en la respuesta hipersensible de plantas de tabaco contra la bacteria *Rastonia solanacearum* (Pontier *et al.*, 1994) y EDS1 en *Arabidopsis thaliana* en la resistencia mediada gen por gen (Falk *et al.*, 1999). Recientemente, se reportó la inducción de la expresión de una esterasa PepEST en frutos maduros de *C. annuum* durante la interacción incompatible con el hongo *Colletotrichum gloesporioides* (Ko *et al.*, 2005). La sobre-expresión del gen PepEST en *Arabidopsis thaliana* confirió resistencia contra el hongo *Alteranaria brassicicola* (Ko *et al.*, 2005). El EST que corresponde a la esterasa aislada en este trabajo, participa en la defensa de la planta de chile posiblemente al inhibir la formación de estructuras infectivas de hongos, por ejemplo los apresorios, como se sugirió previamente para *C. gloesporioides* (Kim *et al.*, 2001). Respecto al experimento de los tratamientos con las diferentes hormonas de crecimiento, el transcrito de la esterasa en raíces de chile, resultó estimulado con la aplicación de IAA, y en menor grado con Eth, MJ, PAs y SA. En un estudio reciente realizado en

frutos de Chile infectados con *C. gloeosporioides*, tratados con hormonas de crecimiento como MJ, SA, ABA y Eth, y por daño por herida, se observó que la expresión de la esterasa fue inducida en la interacción con el hongo, el daño por herida y con el MJ (Ko *et al.*, 2005). Los autores proponen que la principal función de la esterasa en el fruto, es mantener la integridad del fruto durante la maduración en casos de estrés, sobre todo aquel causado por daño mecánico.

4.3 Proteína inducida por TMV I (Unigen 48)

La proteína inducida por el virus del mosaico del tabaco (TMV), como su nombre lo indica, se encontró por primera vez inducida en una interacción con el TMV. En nuestro estudio, durante la interacción de las plántulas de Chile Guajillo con *R. solani*, la inducción de la expresión del gen que codifica para la proteína inducida por TMV I fue el doble de expresión comparada con el control. Takemoto *et al.* (2001), encontraron esta proteína diferencialmente expresada en hojas de tabaco tratadas con componentes de la pared celular de hifas de *P. infestans*, cuya interacción es compatible, mientras que durante la interacción incompatible con *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*, se encontró expresada en menor proporción. Sin embargo, aún se desconoce la función específica de dicha proteína. Por otro lado, Cornelissen *et al.* (1986), reportaron por primera vez la identificación de una proteína inducida por TMV en plantas de tabaco, años más tarde fue caracterizada como una proteína relacionada a patogénesis (PR), y nombrada como osmotina (PR-5). La proteína inducida por TMV, aislada en nuestro estudio, probablemente pudiera ser una proteína tipo PR, por su fuerte inducción con la mayoría de los patógenos estudiados. Encontramos que la inducción de la expresión del gen, se da con todos los reguladores de crecimiento empleados en el estudio, con una inducción de entre 2 a 6 veces comparados con el control. Con el SA su expresión fue muy fuerte, llegando hasta 6 veces de inducción y con el MJ hasta 3.5 veces comparados con el control. Un resultado similar fue obtenido por Takemoto *et al.* (2001), con una inducción notoria de la expresión en respuesta a tratamientos con SA a las 6 horas y por daño por herida a las 12 horas, en hojas de tabaco. Lo que nos sugiere que ésta proteína tiene una implicación importante en la respuesta al

estrés al ser inducida su expresión por varios reguladores de crecimiento y por ataque de patógenos.

4.4. Esterol desaturasa (Unigen 200)

Los esteroides son un grupo muy diverso de componentes policíclicos de carbón, con funciones diferentes; existen desde aquellos que influyen en la fluidez y permeabilidad de la membrana celular hasta aquellos como los brassinoesteroides que controlan procesos como la división celular, el alargamiento y la respuesta a estrés en plantas (Clouse y Sasse, 1998; Persson, 2003). La diferencia entre esteroides es el número de carbonos y de enlaces dobles (Valkonen *et al.*, 1996). En nuestro estudio, el gen que codifica la enzima esterol desaturasa se expresa fuertemente en la interacción con todos los microorganismos, excepto en *F. oxysporum* que se induce ligeramente más que el control.

Esta inducción del transcrito pudiera deberse a la importancia que tienen estos compuestos en la síntesis de metabolitos basados en esteroides, incluyendo algunos que están involucrados en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos (Benveniste, 2004). La α -tomatina, es uno de estos metabolitos, el cual es altamente tóxico para algunos hongos, y se sintetiza en la respuesta de defensa de plantas de tomate (Morrissey y Osbourn, 1999). Para contrarrestar el efecto antifúngico de la α -tomatina, el patógeno *F. oxysporum* lo convierte en tomatidina (Morrissey y Osbourn, 1999), a la cual la mayoría de los hongos patógenos de plantas Solanaceas son más tolerantes que los hongos no patógenos (Sandrock y VanEtten, 1998). Recientemente, se ha encontrado que la tomatidina suprime la respuesta de defensa inducida en células de tomate cultivadas en suspensión (Ito *et al.*, 2004). En nuestro sistema, la expresión de ésta esterol desaturasa se induce por IAA y se reprime fuertemente por ABA.

4.5 Proteína de choque térmico (Unigen 185)

Las proteínas de choque térmico son chaperonas que ayudan al plegamiento adecuado de cadenas polipeptídicas recién sintetizados, en el redoblamiento de

al., 2005). Nosotros observamos que el gen de la *samdc* de Chile fue inducido fuertemente en las interacciones con las cepas de *Rhizoctonia* y *P. capsici*. Según reportes, en la interacción compatible de plantas de trigo con el hongo *Blumeria graminis*, la expresión del gen de la *samdc* aumenta hasta dos veces con respecto al control a las 24 horas, y durante las siguientes 120 horas, fue disminuyendo lentamente su expresión hasta igualar al control (Liu, 2005). En la interacción de plántulas de maíz con el hongo biotrófico *Ustilago maydis*, se ha reportado un aumento en la expresión de los genes *samdc* (isoformas 1, 2 y 3) en hojas con síntomas de clorosis y tumores inducidos por el hongo (Rodríguez-Kessler, 2007). En los tratamientos realizados en nuestro estudio con los reguladores de crecimiento, observamos una inducción en la expresión del gen de la *samdc* con IAA. En el caso de la aplicación del tratamiento de PAs, observamos una inhibición en la expresión de *samdc*, estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan una inhibición por retroalimentación con la aplicación exógena de PAs (Hu *et al.*, 2005).

4.7 Factor de transcripción inducido por fosfatos-2 (Unigen 183)

El gen que codifica para una proteína inducida por fosfatos fue identificado de células BY-2 de tabaco cultivadas en ausencia de fosfato (Sano y Nagata, 2002). Esta proteína tiene una homología significativa con el grupo de proteínas básicas bZIP (“zipper” de leucina) involucradas en la ruta de señalización por ABA (Sano y Nagata, 2002). La expresión de las proteínas bZIP se han encontrado inducidas en respuesta a factores abióticos, como sequía y salinidad, así como, durante la maduración de la semilla y la latencia (Uno *et al.*, 2000). En nuestro estudio, el gen que codifica para este factor transcripcional (*Phi-2*), se encuentra inducido en la interacción compatible con *R. solani* y en la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada, comparados con el control sin patógenos. Finalmente, es importante mencionar que contrario a lo reportado por Sano y Nagata (2002) en plantas de tabaco, el gen *Phi-2* de Chile no se induce en respuesta a ABA. Además, nosotros observamos una inducción ligera por IAA y SA.

4.8 ATPasa (Unigen 199)

La ATPasa de H⁺, actúa como una bomba para el transporte de protones a través de la membrana plasmática. Esta enzima participa en procesos biológicos como absorción de nutrientes y crecimiento celular. Además, se le ha atribuido un papel importante en la activación diferencial de respuestas de defensa ante el ataque de patógenos y daño mecánico (Schaller y Oecking, 1999). Aparentemente, las vías de señalización de defensa son diferencialmente afectadas por cambios en el gradiente electroquímico de protones. Además, la ATPasa-H⁺ de la membrana plasmática tiene el potencial de actuar como un punto de control, activando la respuesta de defensa contra el patógeno o el daño por heridas (Vera-Estrella *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1996). Examinando la expresión del gen que codifica para la ATPasa en las diferentes interacciones estudiadas, solo en el caso de *R. solani* se presentó una ligera inducción del transcrito. Maleck *et al.* (2000), identificaron algunos canales iónicos regulados en respuesta a estrés biótico. En el caso de la ATPasa-H⁺ se observó la sobreexpresión de este gen, durante la interacción de plantas mutantes de tomate *cim*, las cuales se caracterizan por tener la ruta SAR constitutiva, con *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Maleck *et al.*, 2000). Por otro lado, en nuestro estudio, observamos que el transcrito de la ATPasa es regulado por ABA y IAA.

4.9 Omega desaturasa (Unigen 8)

La enzima omega desaturasa de ácidos grasos está involucrada en la conversión de ácido linoleico a ácido linolénico, para la biosíntesis de JA, mediante la formación de dobles enlaces (Davies, 2004, Li *et al.*, 2003). El metabolismo de ácidos grasos se regula transcripcionalmente en plantas durante la respuesta de defensa contra patógenos (Kirsh *et al.*, 1997). En nuestro estudio, observamos una leve inducción de la expresión del gen de una omega desaturasa de ácidos grasos, durante la interacción compatible con *R. solani*, con respecto al control. Kirsch *et al.* (1997), reportaron una fuerte inducción de la expresión de un gen que codifica para una ω desaturasa de ácidos grasos, durante una interacción incompatible entre plantas de perejil y elicitores de la pared celular del hongo *P.*

soj. En relación a los tratamientos con reguladores de crecimiento, se indujo ligeramente la expresión de este gen en respuesta a IAA y se reprimió con Eth. Nishiuchi *et al.* (1997), reportaron en *A. thaliana*, la inducción de la expresión del gen *FAD7* que codifica para una omega desaturasa en respuesta a daño por herida.

4.10 Epóxido hidrolasa (Unigen 135)

El papel de las epóxido hidrolasas parece diferir enormemente de organismo a organismo. Sin embargo, estas enzimas tienen tres funciones principales, detoxificación, catabolismo y regulación de moléculas de señalización. En plantas, ésta enzima parece ser importante en la formación de la cutícula en la respuesta al estrés y en la defensa contra patógenos (Guo *et al.*, 1998; Arahira *et al.*, 2000; Pinot *et al.*, 2000). En nuestro estudio, observamos una inducción de la expresión del gen que codifica para una epóxido hidrolasa en las interacciones compatibles con *R. solani* y con *P. capsici*, al compararse con el control. Además, en la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada, se apreció una inducción un poco menor que con *R. solani*. Gomi *et al.* (2003), han reportado la inducción diferencial del transcrito de una epóxido hidrolasa en hojas de limón durante la interacción incompatible con el hongo *Alternaria alternata*. Ellos también describen para dicho gen, una inducción de la expresión por tratamiento con MJ, y por daño por herida. Sin embargo, en nuestro caso, bajo los tratamientos con los reguladores de crecimiento, solo observamos una inducción de la expresión del gen de la epóxido hidrolasa, con el IAA y el ABA, respecto al control.

4.11 Subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa (Unigen 77)

La enzima piruvato deshidrogenasa se localiza en la mitocondria de las células vegetales y cataliza la descarboxilación oxidativa del piruvato para formar acetil—Coenzima A. Esta enzima es un complejo multienzimático formado por varias subunidades (E1, E2 y E3) que trabajan en conjunto para que la célula tenga carbono disponible. La subunidad E1 es un tetrámero que se compone de dos subunidades α y dos subunidades β (Thelen *et al.*, 1999). En nuestro estudio, sólo

con la interacción compatible con *R. solani* se observa una inducción en la expresión del gen de la subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa. Alignan *et al.* (2006), reportaron una inducción mayor en la expresión de este gen en la interacción compatible de plantas de girasol con el hongo *Phoma macdonaldii*, que durante la interacción incompatible con una variedad resistente de girasol. Thelen *et al.* (1999) reportaron la inducción de la expresión del gen que codifica para la subunidad α E1 de la piruvato deshidrogenasa durante estrés por sequía. Los autores proponen que este aumento en la expresión contribuye a incrementar los niveles bajos de ATP, causados por la reducción de la capacidad fotosintética de la planta al intentar adaptarse a la sequía. En el caso de un ataque de un patógeno, es posible que la planta requiera un aporte extra de energía para realizar todas las acciones de defensa y de reparación, aparte del mantenimiento normal de la célula. En nuestro estudio, no se observó una regulación positiva de la expresión del gen mediada por alguno de los reguladores de crecimiento. Sin embargo, el IAA y el MJ pudieran regularlo negativamente.

4.12 Acetolactato sintasa (Unigen 126)

La proteína acetolactato sintasa cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato en acetolactato, que es descarboxilado a cetoína (Ryu *et al.*, 2004). La sobreexpresión de este gen en plantas de *A. thaliana*, confiere resistencia contra el herbicida sulfonil-urea (Haughn *et al.*, 1988); sin embargo, no se ha reportado una expresión diferencial por ataque de patógenos. En nuestro estudio, la expresión es de aproximadamente 1.5 veces mayor que la del control en la interacción incompatible con la *Rhizoctonia* binucleada, aunque también presenta una inducción de 0.5 veces en las interacciones compatibles con los tres patógenos del Chile. La expresión de este gen en la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada muestra una diferencia importante, sugiriendo que la falta de inducción del gen que codifica la acetolactato sintasa en los sistemas compatibles permite el desarrollo de la enfermedad en las plantas. Por lo que este gen podría ser un candidato para la transformación de plantas de Chile y analizar su respuesta contra los patógenos responsables de la enfermedad de la pudrición

de la raíz y marchitez del chile. Por otro lado, este gen es regulado a nivel transcripcional por IAA y MJ.

4.13 Inhibidor de disociación GDP (Unigen 85)

El inhibidor de disociación GDP (GDI) es una de las proteínas regulatorias del ciclo de las GTPasas Rab, que están implicadas en la regulación del tráfico de vesículas que transportan metabolitos para su liberación (Pfeffer *et al.*, 1995; Ueda *et al.*, 1998). En nuestro estudio, este gen se expresó fuertemente en la interacción incompatible de *Rhizoctonia* binucleada y en la compatible con *P. capsici*, y en menor grado en las interacciones compatibles con *R. solani* y *F. oxysporum*. Se ha sugerido que las proteínas Rab - GDI están involucradas en el transporte de vesículas durante la defensa de las plantas (Bogdanove y Martin 2000; Collins *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2003). En arroz se encontraron dos genes GDI específicos de Rab, substancialmente inducidos después de tratamientos con un elicitador de *Magnaportha grisea* (Kim *et al.*, 1999), por lo que se ha sugerido que pudiera jugar un papel importante en la respuesta de la planta a infecciones por hongos. Jain *et al.* (2004), encontraron una fuerte inducción del gen que codifica para GDI en cebada por la inoculación de *B. graminis* f. sp *hordei*, y que su silenciamiento aumentó la susceptibilidad de las plantas al ataque de este patógeno. Lo anterior sugiere que el GDI pudiera ser un elemento involucrado en la resistencia al ataque de un patógeno. Respecto al tratamiento con hormonas, la expresión del gen *gdi* se observó moderadamente regulada sólo por IAA y ligeramente por SA; sin embargo, considerando que la ruta del SA no es muy eficiente contra hongos necrotróficos (Glazebrook, 2005), cuya finalidad es justamente destruir para alimentarse, esto podría apuntar al IAA como el regulador de la expresión de este gen en dicha interacción.

4.14 Factor de transcripción de la caja MADS (Unigen 131)

A los factores de transcripción de la caja MADS (MADS box), se les ha vinculado principalmente con el desarrollo de flores y frutos (Bolle, 2004; Gong *et al.*, 2004; Ng y Yanofsky, 2001). En nuestro estudio, se observó un ligero aumento en la

expresión del gen que codifica para una proteína MADS box, en las interacciones compatibles con *R. solani* y *P. capsici*, y en la incompatible con *Rhizoctonia* binucleada, al compararlos con el control. Recientemente, Gjetting *et al.* (2007), reportaron la represión de la expresión del gen de la proteína 3 de MADS box en cebada, durante la interacción con el hongo biotrófico *B. graminis* f. sp. *hordei*. Por otro lado, en el caso de los tratamientos con los reguladores de crecimiento, no observamos ninguna inducción en la expresión del gen que codifica para una proteína MADS box de Chile, aunque si una ligera represión con Eth, IAA y PAs.

4.15 Lipoxigenasa (Unigen 186)

El unigen 186 corresponde a un gen que codifica para una lipoxigenasa, la cual es una enzima clave del metabolismo oxidativo de ácidos grasos poli-insaturados. Está involucrada en la síntesis de oxilipinas, que son componentes biológicamente activos y juegan papeles importantes en la señalización, la degradación de membranas celulares, la reproducción y el desarrollo (Feussner *et al.*, 2001; Herman, 1998; Hörnsten *et al.*, 1999, 2002; Howe y Schillmiller, 2002). Nosotros observamos, que la expresión más significativa del gen que codifica para una lipoxigenasa, ocurre en la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada, y una expresión menor a ésta pero mayor a la del control ocurre con la interacción compatible con *P. capsici*. Mientras que durante las interacciones compatibles con *R. solani* y *F. oxysporum* el transcrito se mantiene y disminuye respectivamente al compararlos con el control. Se ha reportado que la expresión del gen de la lipoxigenasa durante la colonización por hongos, puede ser activada o reprimida, dependiendo de la especie de la planta y del hongo (Burow *et al.*, 2000; Tsitsigiannis *et al.*, 2005c; Wilson *et al.*, 2001). Respecto a los tratamientos con reguladores del crecimiento, encontramos que la expresión del gen de la lipoxigenasa se induce fuertemente con el tratamiento de MJ, y se reprime totalmente por el de ABA, el de IAA y el de PAs. Según lo reportado por Hammond-Kosack y Parker (2003), la resistencia a parásitos necrotróficos podría ser esencialmente regulada por la expresión de genes asociados con las rutas del ácido jasmónico y el etileno, principalmente por lipoxigenasas. Heitz *et al.* (1997),

encontraron que la expresión del gen que codifica para la lipoxigenasa en hojas de tomate, se induce por tratamientos con MJ y por daño por heridas.

4.16 Caffeoil-CoA O-metiltransferasa (Unigen 57)

La enzima caffeoil-Coenzima A O-metiltransferasa (CCoAoMT) transfiere grupos metilo de la S-adenosil-L-metionina al anillo aromático de monolignoles, para catalizar caffeoil CoA en feruluil-CoA (Hoffmann *et al.*, 2001). Es una enzima clave para la biosíntesis de lignina, que está involucrada en la reacción de defensa de la planta al sintetizar ácido ferúlico que se une a la pared celular, inhibiendo la penetración del patógeno (Schmitt *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1994; Busam *et al.*, 1997). En nuestro estudio, hubo una inducción de la expresión del gen que codifica para una CCoAoMT, durante la interacción con los hongos *R. solani* y *Rhizoctonia* binucleada, al compararlos con el control. Sin embargo, la expresión se incrementó de forma significativa en las interacción compatibles de *F. oxysporum* y *P. capsici*. Busam *et al.* (1997), reportaron un incremento en la expresión del gen que codifica para la CCoAoMT en plantas de uva, al tratarlas con elicitores bacterianos y de levadura. Además, se ha aislado e identificado el gen que codifica para una CCoAoMT en una librería de cDNA, obtenida a partir de hojas de planta de cacao tratadas con benzotiadiazol (BTH) (Verica *et al.*, 2004). Por otro lado, con los tratamientos con reguladores del crecimiento, observamos que la expresión del gen *CCoAoMT* se induce ligeramente durante los tratamientos con IAA y ABA.

Los resultados del presente estudio aportan las bases para establecer cuales genes están involucrados en las respuestas de la planta de chile (*Capsicum annum*) al estrés biótico causado por el ataque de los fitopatógenos *R. solani*, *F. oxysporum* y *P. capsici*. Así como, la respuesta de defensa durante la interacción incompatible con *Rhizoctonia* binucleada. Esto nos proporciona la oportunidad de ampliar el conocimiento sobre el proceso de esta respuesta. Además, algunos de los EST obtenidos podrían servir como marcadores moleculares de estrés. Incluso, la posibilidad de encontrar genes de

susceptibilidad o de resistencia, que pudieran ser empleados en ingeniería genética de plantas para la obtención de cultivares resistentes al ataque de patógenos, sería de gran relevancia.

Tablas

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados para amplificar genes obtenidos en la genoteca.

Gen	Oligonucleótido		Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)
	Nombre	Secuencia		
Acetolactato sintasa	Acet synt 5 <i>Sentido</i>	5'ACATCTGGGATTAGGAGCA3'	190	60
	Acet synt 3 <i>Antisentido</i>	5'CCAAGTGTTGATTATTCAGCAA3'		
Alanina aminotransferasa	AlaAT 5 <i>Sentido</i>	5'AGTGACATGCAATAGAGCAGA3'	400	59
	AlaAT 3 <i>antisentido</i>	5'GTCCTTACTGTTGCGACTATAGA3'		
ATPasa	SSHFOX43 5 <i>Sentido</i>	5'ATCCTCAAGATCCATGCTGC3'	282	58
	SSHFOX43 3 <i>Antisentido</i>	5'CATTGAATTTGGTCCATGGCC3'		
Caffeoil-CoA O-metiltransferasa	CCoAoMT5 <i>Sentido</i>	5'CAAGAGATTAATCGACTTAGTC3'	190	60
	CCoAoMT3 <i>Antisentido</i>	5'CTGGAAGCTGGCAAATTTCGA3'		
Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa	ER1PRINH5 <i>Sentido</i>	5'GCAAAGATGTCTATGGTGAAGTT3'	201	59
	ER1PRINH3 <i>Antisentido</i>	5'AGCGAACTTCGCTGGTGT3'		
Epoxido hidrolasa	Epoxhydr 5 <i>Sentido</i>	5'TACCTGGTTCCTGAAGAAGAT3'	192	59
	Epoxhydr 3 <i>antisentido</i>	5'GCTCTAATGCACCAAACCTTAAG3'		
Inhibidor de la disociación de GDP	GDI 5 <i>Sentido</i>	5'TGTCTCAACAGAGGCAGAAACT3'	195	60
	GDI 3 <i>antisentido</i>	5'ACATCGTCTACAGTCGACTCA3'		
Proteína de choque térmico	SSHFOX74 5 <i>Sentido</i>	5'GCTTGTCGACCCAATACCCAT3'	200	60
	SHFOX74 3 <i>Antisentido</i>	5'GTAGCTCATGAAGACCTTCTC3'		
Lipoxigenasa	LPX 5 <i>Sentido</i>	5'AGCTCTCACTGATGCTATTCCT3'	167	60
	LPX 3 <i>Antisentido</i>	5'TGATAGGATTAACCTCCAGCTA3'		
Factor de transcripción de la caja MADS	MADSbox5 <i>Sentido</i>	5'TAAGGAGATGGTGAGAGGGA3'	187	60
	MADSbox 3 <i>antisentido</i>	5'GAGCTGGCAAATTCATTGAGCT3'		

Gen	Oligonucleótido		Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)
	Nombre	Secuencia		
Omega desaturasa	Omedesat5 <i>Sentido</i>	5'AAGTCATCTGCAAAGAGTTCC3'	167	59
	Omedesat3 <i>antisentido</i>	5'AGTAAGTGGCTGCAATGTAAT3'		
Esterasa de chile	Esterase 5 <i>Sentido</i>	5'TGACACAATTGTACGTAAACCT3'	847	59
	Esterase 3 <i>antisentido</i>	5'CTCAATTGCATGATAACCATCT3'		
Factor de transcripción inducido por fosfatos-2	Phi-2 5 <i>Sentido</i>	5'GACCGATGAATATGGATGACTT3'	162	59
	Phi-2 3 <i>Antisentido</i>	5'CAGTCTCACTTACATCATTAGC3'		
S-adenosil metionina descarboxilasa	Samdc 5 <i>Sentido</i>	5'TAGCCTCTTTGTCTACTCTTAC3'	182	59
	Samdc 3 <i>antisentido</i>	5'AGAAGTGACGATGTGGGTATG3'		
Esterol desaturasa	Est Desat 5 <i>Sentido</i>	5'CACCTAACAACGCCACAATCGA3'	488	58
	Est Desat 3 <i>antisentido</i>	5'AAGCAACTTTAGACAAGCGATGG3'		
Proteína inducida por TMV- I	TMV Ind Prot 5 <i>Sentido</i>	5'CACAGCTTATGTCCGAACTG3'	353	60
	TMV Ind Prot 3 <i>Antisentido</i>	5'ACGGTGAACGATTGGTGCTAA3'		

Tabla 2. Comparación de las secuencias de SSH en el banco de datos del NCBI mediante Blast.

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value
Defensa	15	79 (26, 42)	473	Proteína LRR (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAM63268)	76%	1.00E-41
	41	147 (419, 466, 367, 80)	997	Esterasa de chile (<i>Capsicum annuum</i> , AF072533)	99%	0
	48	56 (94)	434	Proteína inducida por TMV - I (<i>Capsicum annuum</i> , AF242731)	83%	8.00E-55
	49	41 (142)	427	TMV-induced proteína I - 2 (<i>Capsicum annuum</i> , AF480414)	99%	2.00E-132
	57	226 (119)	657	Caffeoil-CoA O-metiltransferasa (<i>Solanum tuberosum</i> , AB061268)	91%	0
	65	37 (140)	491	Proteína similar a taumatina (<i>Capsicum annuum</i> , AF297646)	99%	7.00E-114
	66	154 (396, 422)	476	Proteína similar a osmotina (<i>Capsicum annuum</i> , AY262059.1)	98%	0
	117	195 (317)	476	Possible inhibidor de proteínasa II (<i>Atropa belladonna</i> , CAC40750.1)	57%	7.00E-14
	140	124 (290)	266	Inhibidor de proteínasa I (<i>Solanum lycopersicum</i> , J04099.1)	88%	7.00E-70
	140	203 (351)	317	Inhibidor de proteínasa I (<i>Solanum lycopersicum</i> , J04099.1)	88%	7.00E-70

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value
Factor de transcripción	157	180 (375)	302	Quitinasa de la clase I (<i>Solanum tuberosum</i> , AF043247)	87%	1.00E-40
	9	32 (11, 172)	357	Dioxigenasa (<i>Solanum chacoense</i> , AF104925)	89%	1.00E-46
	182	164 (428)	199	Quitinasa clase V (<i>Nicotiana tabacum</i> , X77110)	89%	3.00E-49
	73	127 (302) 151 (410)	1024	Citocromo P450 (<i>Solanum chacoense</i> , U48434) (<i>Nicotiana tabacum</i> , AF166332)	89%	1.00E-96
	79	27 (178, 216)	651	S-adenosilmetionina descarboxilasa (<i>Capsicum annuum</i> , AY496095)	99%	0
	120	194 (316)	926	Sesquiterpeno ciclasa (<i>Capsicum annuum</i> , AF061285)	98%	0
	133	135 (339)	174	Homólogo a 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa (<i>Solanum lycopersicum</i> , P10967)	82%	5.00E-20
	91	98 (231) 5 (63, 64, 88) 11 (170) 4 (387, 402, 406, 179, 185, 218) 3 (183, 213) 7 (199)	213	Proteína PhzC/PhzF de la biosíntesis de Fenazina (<i>Medicago truncatula</i> , ABE77453)	76%	3.00E-09
	36	178 (433)	778	Proteína Relacionada a patogénesis 10 PR-10 (<i>Capsicum chinense</i> , AJ879115)	98%	6.00E-147
	114	121 (280, 291)	564	N-hydroxycinnamoyl/benzoiltransferasa 6 (<i>Glycine max</i> , ABC47848)	59%	2.00E-58
	162	134 (381)	276	Factor de transcripción (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_192008)	94%	0.006
	183	161 (429)	422	Phi-2 (<i>Nicotiana tabacum</i> , AB063648)	91%	2.00E-83
	131	202 (332, 335)	300	Factor de transcripción de la caja Mads (<i>Nicotiana tabacum</i> , X76188)	88%	5.00E-46
	Función desconocida	18	89 (38)	285	Clona 133419F (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT014224)	88%
22		70 (48, 229, 233)	253	clona 114247F (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013010)	87%	3.00E-31
23		69 (49)	273	Proteína 19 inducida por ácido salicílico (<i>Capsicum annuum</i> , AY308828)	89%	1.00E-15
24		87 (50)	264	Proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_565036)	70%	5.00E-18
38		47 (66) 54 (93) 96 (242)	218	AT5g05480/MOP10_2 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAK32931)	71%	8.00E-20
47		156 (334, 420) 111 (260, 279)	306	clona: FC06DE11, HTC en fruta (<i>Lycopersicon esculentum</i> , AK224681), (<i>Solanum lycopersicum</i> , FC15CB05), (<i>S. lycopersicum</i> , FC19BH12) (<i>S. lycopersicum</i> , FC11DE11)	89%	1.00E-28
50		50 (95)	360	Posible proteína PRP39 expresada (<i>Oryza sativa</i> , ABF93921)	53%	7.00E-11
51		15 (96)	571	Clona 134196R (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013164)	86%	3.00E-95
58		227 (105, 122)	299	Proteína de función desconocida DUF689 (<i>Medicago truncatula</i> , ABE78163)	83%	8.00E-25
74		49 (152)	222	Clona 132794F (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013837)	95%	1.00E-95
76		23 (155, 156, 158)	403	Proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_187436)	71%	4.00E-48
90		110 (230)	534	Clona 132133F (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013472)	88%	2.00E-123
98		101 (244)	485	Clona C4 unknown (<i>Medicago sativa</i> , DQ122779)	85%	3.00E-45
103		106 (249)	300	Clona 113992R (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT012888.1)	90%	6.00E-98
113		118 (277, 287, 293)	311	Clona 134760R (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013251.1)	88%	3.00E-29
123		222 (320)	516	Clona 134125R (<i>Lycopersicon</i>	98%	2.00E-28

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value	
Mantenimiento y desarrollo celular				<i>esculentum</i> , BT014622.1)			
	129	120 (329, 347)	465	Clona 154B05, protein regulada por maduración DDTFR-10 (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ235167)	92%	2.00E-68	
	138	166 (348)	202	Proteína hipotética LOC336650 (<i>Danio rerio</i> , NP_998807)	67%	4.00E-05	
	141	204 (354)	510	Clona 133368R (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT014191)	93%	4.00E-54	
	151	183 (364)	313	Clona 172C11 hypothetical proteína (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ241827)	88%	6.00E-15	
	156	170 (374)	334	At3g62580/T12C14_280 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAN46755)	69%	4.00E-38	
	163	173 (382)	273	Proteína desconocida (<i>Brassica napus</i> , AAY63998)	80%	1.00E-09	
	166	210 (389)	560	Posible proteína (<i>Arabidopsis thaliana</i> , CAB43859)	71%	2.00E-15	
	167	221 (390)	635	Proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_567144)	73%	8.00E-90	
	172	150 (400)	410	Clona 132924F (<i>Lycopersicon esculentum</i> , BT013926)	84%	2.00E-46	
	177	143 (417)	508	Proteína hipotética (<i>Arabidopsis thaliana</i> , BAF00853)	71%	2.00E-41	
	179	160 (423)	268	Proteína desconocida (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_187245)	57%	2.00E-16	
	187	163 (438)	341	Proteína hipotética (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAL06795)	86%	4.00E-28	
	194	191 (453)	279	Clona FC04CC10 HCT en fruta (<i>Solanum lycopersicum</i> , AK224647)	92%	8.00E-48	
	19	88 (41)	335	Metaloenolpeptidasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NM_180169)	71%	1.00E-27	
	197	131 (459)	511	Posible convertasa dibásica de N-arginina (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAF63132)	51%	1.00E-08	
	143	196 (356)	356	Posible protein inducida por lesión (<i>Capsicum annum</i> , AY496120)	98%	8.00E-178	
		16	43 (33)	153	Proteína similar a una proteína nucleolar (<i>Oryza sativa</i> , BAD37677)	76%	1.00E-15
		53	57 (100)	228	Actina (<i>Nicotiana tabacum</i> , NTU60492)	95%	1.00E-67
		60	72 (165)	419	Factor 2 de despolimerización de actinas (<i>Gossypium hirsutum</i> , ABD63906)	91%	1.00E-21
		70	58 (147)	485	Histona 3 (<i>Malus domestica</i> , AAQ54510)	89%	5.00E-71
		78	153 (409)	559	(<i>Nicotiana tabacum</i> , AB032544)		
		148	1 (167, 173, 175, 176)	559	Polipéptido de 8.2 KDa, RNA polimerasa II (<i>Brassica Napus</i> , Q39290)	92%	1.00E-32
		148	139 (361)	212	Posible proteína Relacionada a maduración (<i>Vitis vinifera</i> , CAB85625)	72%	7.00E-09
		155	205 (373)	855	Posible subunidad PBC2 del proteosoma 20S (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAM62756)	89%	1.00E-60
		168	141 (391)	269	Reservorio de nutrientes (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_198731)	61%	9.00E-15
		175	155 (413)	513	Proteína de unión a GTP regulada en el desarrollo (<i>Pisum sativum</i> , AAB67829)	88%	2.00E-29
		99	104 (245, 288)	489	Sintasa de sacarosa de fruta (<i>Lycopersicon esculentum</i> , L19762.1)	93%	4.00E-66
		93	199 (223)	618	Factor 1 asociado a CRS2 (<i>Zea mays</i> , ABE81273)	70%	9.00E-67
		111	119 (273)	278	Proteína de union al ion zinc y ácido nucleico (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NM_103847.3)	82%	4.00E-06
		125	186 (323)	569	UDP-glucosa:proteína transglucosilasa (<i>Solanum tuberosum</i> , AJ223252.2)	89%	2.00E-108
		127	220 (326)	326	Subunidad pequeña de carbamoil fosfato sintasa (<i>Nicotiana tabacum</i> , AJ319873)	90%	3.00E-109

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value
Metabolismo	142	208 (355)	268	UDP-glucoronato descarboxilasa I (<i>Nicotiana tabacum</i> , AY619950.1)	89%	4.00E-80
	6	86 (6) 172 (372)	618	Alanina aminotransferasa (AlaAT) mRNA (<i>Capsicum annuum</i> , AY342007)	99%	0
	11	42 (15)	240	Gllcerofosforil diester fosfodiesterasa (<i>Oryza sativa</i> , ABB90904)	69%	5.00E-25
	14	18 (25)	417	Posible enoil CoA hidratasa (<i>Cicer arietinum</i> , CAB61740)	68%	5.00E-10
	17	81 (35)	560	Nitrito reductasa-3 (<i>Nicotiana tabacum</i> , X66147)	89%	2.00E-93
	21	22 (47, 52)	372	Malato deshidrogenasa (<i>Lycopersicon esculentum</i> , L27509)	91%	2.00E-15
	25	91 (51)	440	Parecida a una adenina fosforibosiltransferasa (<i>Solanum tuberosum</i> , ABB86271)	93%	1.00E-48
	44	55 (91, 110)	307	Isoforma 2S de la adenosina quinasa (<i>Nicotiana tabacum</i> , AY695053)	94%	2.00E-23
	45	31 (195, 200)	180	Isoforma 1S de la adenosina quinasa (<i>Nicotiana tabacum</i> , AY695052)	94%	6.00E-69
	52	53 (97)	417	NADP-isocitrato deshidrogenasa (<i>S. tuberosum</i> , X92486)	90%	6.00E-80
	54	35 (106)	358	6-fosfogluconato deshidrogenasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AK227160)	83%	4.00E-13
	59	228 (124) 230 (127) 114 (267, 275, 282, 299)	195	Posible alcohol deshidrogenasa (<i>Lycopersicon esculentum</i> , AJ277945)	93%	4.00E-45
	61	40 (157)	1268	aldosa 1-epimerasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_568301) (<i>Nicotiana tabacum</i> , AF032386)	79%	1.00E-62
	77	133 (399)	185	Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa (<i>Solanum tuberosum</i> , Z26949)	94%	6.00E-72
	171	142 (416)	233	Gene FEY Forever young oxidoreductasa (<i>Solanum tuberosum</i> , AF250031)	86%	5.00E-36
	176	177 (436)	773	Nectarina 5 (<i>Nicotiana langsdorffii</i> x <i>Nicotiana sanderae</i> , AAP30814)	81%	3.00E-06
	186	217 (450)	601	Lipoxigenasa (<i>Solanum tuberosum</i> , U60201)	92%	2.00E-105
	193	190 (458)	229	Posible acil-CoA sintetasa (<i>Capsicum annuum</i> , AF354454)	95%	4.00E-86
	196	213 (461)	496	Cinnamoil-CoA reductasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_180917)	58%	4.00E-23
	198	109 (256)	321	Proteína similar a transaldolasa (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ228353)	88%	6.00E-52
	105	174 (368)	543	Proteína de unión a ATP (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NM_127324)	79%	2.00E-34
	154	231 (132, 135, 136)	281	Complejo mitocondrial I de 76 kDa (<i>Solanum tuberosum</i> , NP_176758)	96%	6.00E-132
	62	46 (134)	369	Serina acetiltransferasa Sat4 (<i>Nicotiana tabacum</i> , NTA414052)	86%	1.00E-53
	63	34 (145)	653	Proteína parecida a fosfoglicerato deshidrogenasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , BAD94241)	P	3.00E-52
	68	59 (146, 431)	411	Acetoacetyl-CoA tiolasa citosólica (<i>Nicotiana tabacum</i> , AY748245)	93%	1.00E-62
	69	10 (151) 105 (247, 292, 297, 298)	332	Poliubiquitina (<i>Capsicum chinense</i> , AF088848, AJ879118)	96%	3.00E-97
	71	39 (153)	310	Citocromo oxidasa subunidad III (<i>Solanum tuberosum</i> , AF280607)	89%	3.00E-04
	72	68 (189)	408	Citocromo b5 (<i>Olea europaea</i> , CAA04703)	83%	9.00E-46
	75	29 (194, 212)	458	LEXYL2 (<i>Lycopersicon esculentum</i> , AB041812)	93%	0
	82	117 (272, 286)	423	Subunidad AC39 de ATP sintasa vacuolar (<i>Arabidopsis thaliana</i> , BAB02186)	94%	9.00E-72
	85		351	Inhibidor de la disociación de GDP (<i>Nicotiana tabacum</i> , AF012823)	95%	2.00E-150
	116		272	Endonucleasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_974648)	57%	7.00E-14

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value
Muerte celular No reportada	87	78 (198)	298	N-acetiltransferasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_196882)	86%	1.00E-41
	95	97 (227, 236)	913	Subunidad pequeña de ribonucleótido reductasa (<i>Glycine max</i> , AAD32302)	91%	2.00E-30
	159	223 (377)	362	IMP deshidrogenasa/GMP reductasa (<i>Medicago truncatula</i> , ABE93135)	92%	1.00E-20
	115	122 (284)	705	Proteína fosfatasa catalítica tipo 2C (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_564504)	86%	2.00E-88
	136	167 (343)	620	amino oxidasas/ oxidoreductasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_176759)	73%	2.00E-87
	165	215 (388)	368	Tirosina aminotransferasa (<i>Glycine max</i> , DQ006809)	76%	1.00E-52
	191	216 (444)	251	Proteína Relacionada a L-allo-treonina aldolasa (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ268843)	89%	5.00E-63
	8	61 (69) 6 (177, 215)	991	Omega-6 desaturasa (<i>Capsicum chinense</i> , AJ8879069)	98%	0
	135	169 (342)	486	Epoxido hidrolasa (<i>Nicotiana tabacum</i> , U57350)	85%	8.00E-114
	94	103 (224, 235)	472	Enzima E2 de conjugación de ubiquitina (<i>Capsicum annuum</i> , AY491500)	89%	1.00E-115
	178	158 (418)	270	Proteína 4 similar a extensina rica en cisteínas (<i>Nicotiana tabacum</i> , L13442)	89%	9.00E-26
	195	136 (454, 457)	314	Proteína similar a una helicasa RH-15 de caja de muerte (<i>Arabidopsis thaliana</i> , BAD93957)	96%	3.00E-06
	1	33 (1)	284	No se encontraron similitudes significativas		
	2	85 (2)	518	No se encontraron similitudes significativas		
	3	84 (3)	394	No se encontraron similitudes significativas		
	4	80 (4)	294	No se encontraron similitudes significativas		
	5	83 (5)	172	No se encontraron similitudes significativas		
	13	44 (19)	508	No se encontraron similitudes significativas		
	20	26 (45)	238	No se encontraron similitudes significativas		
	26	82 (53)	202	No se encontraron similitudes significativas		
	27	20 (32, 171, 210)	362	No se encontraron similitudes significativas		
	28	90 (56)	198	No se encontraron similitudes significativas		
	29	30 (62, 89)	269	No se encontraron similitudes significativas		
	30	52 (72)	237	No se encontraron similitudes significativas		
	31	63 (81)	471	No se encontraron similitudes significativas		
	32	14 (166, 180, 192, 203, 205)	158	No se encontraron similitudes significativas		
	33	73 (168)	368	No se encontraron similitudes significativas		
	34	66 (187)	194	No se encontraron similitudes significativas		
	35	21 (161, 220)	396	No se encontraron similitudes significativas		
	37	93 (65)	178	No se encontraron similitudes significativas		
	83	67 (190)	351	No se encontraron similitudes significativas		
	84	25 (193)	383	No se encontraron similitudes significativas		
	86	19 (197, 219)	519	No se encontraron similitudes significativas		
88	75 (206)	588	No se encontraron similitudes significativas			
100	232 (99)	367	No se encontraron similitudes significativas			
101	233 (112)	621	No se encontraron similitudes significativas			

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value
	102	234 (113)	345	No se encontraron similitudes significativas		
	106	112 (269)	154	No se encontraron similitudes significativas		
	107	113 (246, 263, 281)	237	No se encontraron similitudes significativas		
	108	107 (250)	340	No se encontraron similitudes significativas		
	109	115 (268)	252	No se encontraron similitudes significativas		
	110	235 (261, 271)	188	No se encontraron similitudes significativas		
	112	116 (276, 300)	288	No se encontraron similitudes significativas		
	119	125 (294)	434	No se encontraron similitudes significativas		
	121	198 (318)	359	No se encontraron similitudes significativas		
	122	219 (319)	454	No se encontraron similitudes significativas		
	124	184 (321)	294	No se encontraron similitudes significativas		
	130	138 (330, 371)	306	No se encontraron similitudes significativas		
	137	193 (345)	419	No se encontraron similitudes significativas		
	147	185 (360)	438	No se encontraron similitudes significativas		
	149	182 (362)	221	No se encontraron similitudes significativas		
	152	197 (365)	240	No se encontraron similitudes significativas		
	153	200 (366)	327	No se encontraron similitudes significativas		
	161	159 (380)	311	No se encontraron similitudes significativas		
	180	209 (424)	266	No se encontraron similitudes significativas		
	181	214 (426)	417	No se encontraron similitudes significativas		
	184	129 (432)	349	No se encontraron similitudes significativas		
	188	128 (440)	437	No se encontraron similitudes significativas		
	189	165 (441)	455	No se encontraron similitudes significativas		
	190	175 (442)	297	No se encontraron similitudes significativas		
	192	137 (449)	232	No se encontraron similitudes significativas		
Relacionada con el estrés	185	171 (434)	258	Proteína pequeña de choque térmico (<i>Lycopersicon esculentum</i> , X56138)	91%	1.00E-74
	10	48 (13) 62 (77) 36 (131) 76 (209) 224 (270, 283, 303) 201 (349, 357) 152 (407)	147	Canal de agua (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NM_117106)	83%	9.00E-18
	40	132 (430)	896	Peroxidasa (<i>Capsicum annuum</i> , AF442386)	99%	3.00E-134
	42	9 (82)	281	Proteína de estrés-maduración (<i>Capsicum annuum</i> , AY496130)	99%	5.00E-129
	46	2 (92, 111, 120)	265	Proteína DNAJ (<i>Glycine max</i> , AAM23263)	80%	5.00E-18
	55	176 (114, 447)	414	Extensina (N. plumbaginifolia, M34371)	90%	6.00E-68
	56	38 (116)	341	Gene de la nodulina temprana 40 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	95%	7.00E-30
	64	24 (139)	476	Posible nodulina temprana ENOD18 (<i>Oryza sativa</i> , XP_475357)	72%	4.00E-27
	158	206 (376)	350	Catalasa (<i>Capsicum annuum</i> , AF227952)	98%	0
	126	218 (325)	343	Acetolactato sintasa (<i>Solanum ptychanthum</i> ,	95%	4.00E-152

Función biológica	UNIGEN	No. de Contig (secuencias que lo conforman)	Tamaño (pb)	Mayor homología (número de acceso)	Identidad (%)	E-value	
Señalización				AF308650)			
		128	189 (327)	866	Chaperona similar a GroEL, ATPasa (<i>Medicago truncatula</i> , ABE79819)	78%	8.00E-36
		118	126 (301)	618	Esterol delta-7 reductasa DWF5 (<i>Gossypium hirsutum</i> , ABA01480)	81%	6.00E-98
		132	207 (337)	165	Esterol descarboxilasa (<i>Nicotiana banthamiana</i> , AM236597)	87%	5.00E-23
		200	236 (460)	540	Esterol desaturasa (<i>Medicago truncatula</i> , gij87162521)		1.00E-47
		134	168 (341)	298	DEA1 inducido por ácido araquidónico (<i>Capsicum chinense</i> , AJ879120)	98%	1.00E-55
		150	140 (363)	340	Subunidad epsilon 1 de la proteína del complejo -T (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i> , AF097668)	84%	2.00E-67
		7	8 (159)	267	Proteína similar a metalotioneina (<i>Capsicum chinense</i> , AJ879063)	97%	2.00E-48
		144	146 (358)	250	Glutation S-transferasa GST 10 (<i>Zea mays</i> , AAG34818)	50%	6.00E-16
		145	211 (455)	495	Glutation S-transferasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_176758)	67%	7.00E-38
		81	71 (188)	164	cis-trans peptidil-propil isomerasa (<i>Arabidopsis thaliana</i> , NP_171696)	93%	3.00E-17
		173	212 (404)	309	Proteína parcialmente similar a la familia de las proteína quinasa (<i>Solanum lycopersium</i> , AB211526)	90%	3.00E-38
		174	157 (405)	319	Proteína quinasa 4 dependiente de calcio (<i>Capsicum annuum</i> , AY904339)	100%	2.00E-175
	Síntesis de proteínas	67	16 (87, 143, 148, 448)	765	Proteína de pared celular (<i>Capsicum annuum</i> , AF242730)	98%	0
89		17 (211, 443)	669	Proteína U-Lim (<i>Capsicum annuum</i> , AY490175)	99%	0	
97		99 (241, 274)	557	Proteína 14-3-3 (<i>Lycopersicon esculentum</i> , X98864.2)	86%	2.00E-114	
39		12 (75, 109)	399	Proteína ribosomal L9 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , BAD95213)	91%	3.00E-16	
160		145 (378)	312	Proteína de unión al Poly(A) (<i>Nicotiana tabacum</i> , AF190655)	95%	2.00E-138	
170		188 (397)	379	Posible proteína de unión a RNA (<i>Nicotiana tabacum</i> , AF029351)	89%	2.00E-30	
199		235 (495)	461	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a (<i>Solanum tuberosum</i> , BAC23035)		2.00E-46	
12		28 (16, 17)	467	Proteína similar a la proteína transportadora SEC13 (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ294265)	93%	4.00E-100	
43		51 (86, 121)	586	Proteína de transferencia de lípidos (<i>Solanum tuberosum</i> , AB061266)	89%	3.00E-95	
80		65 (181)	179	Transportador de sacarosa (<i>Nicotiana tabacum</i> , X82276)	94%	2.00E-62	
Transporte	169	149 (393)	258	Posible proteína de membrana de transporte de secreción (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAG50798)	84%	7.00E-36	
	139	148 (350)	540	Posible proteína dirigente (<i>Arabidopsis thaliana</i> , AAG50769)	62%	3.00E-45	
	146	144 (358)	272	Proteína similar a acarreador de ubiquitina (<i>Solanum tuberosum</i> , DQ294271)	89%	2.00E-51	
	164	181 (385)	766	Transportador plastídico de ATP/ADP (<i>Solanum tuberosum</i> , Y10821)	86%	1.00E-51	
	92	192 (222, 226)	464	Hidroquinona glucosiltransferasa (<i>Rauvolfia serpentina</i> , Q9AR73)	63%	9.00E-36	
	96	102 (240)	117	Beta-isopropilmalato deshidrogenasa (<i>Solanum tuberosum</i> , BT014261)	95%	4.00E-44	
	104	108 (253)	219	Ubiquinona NADH oxidoreductasa (<i>Retama raetam</i> , AAL32032)	69%	4.00E-18	

Figuras

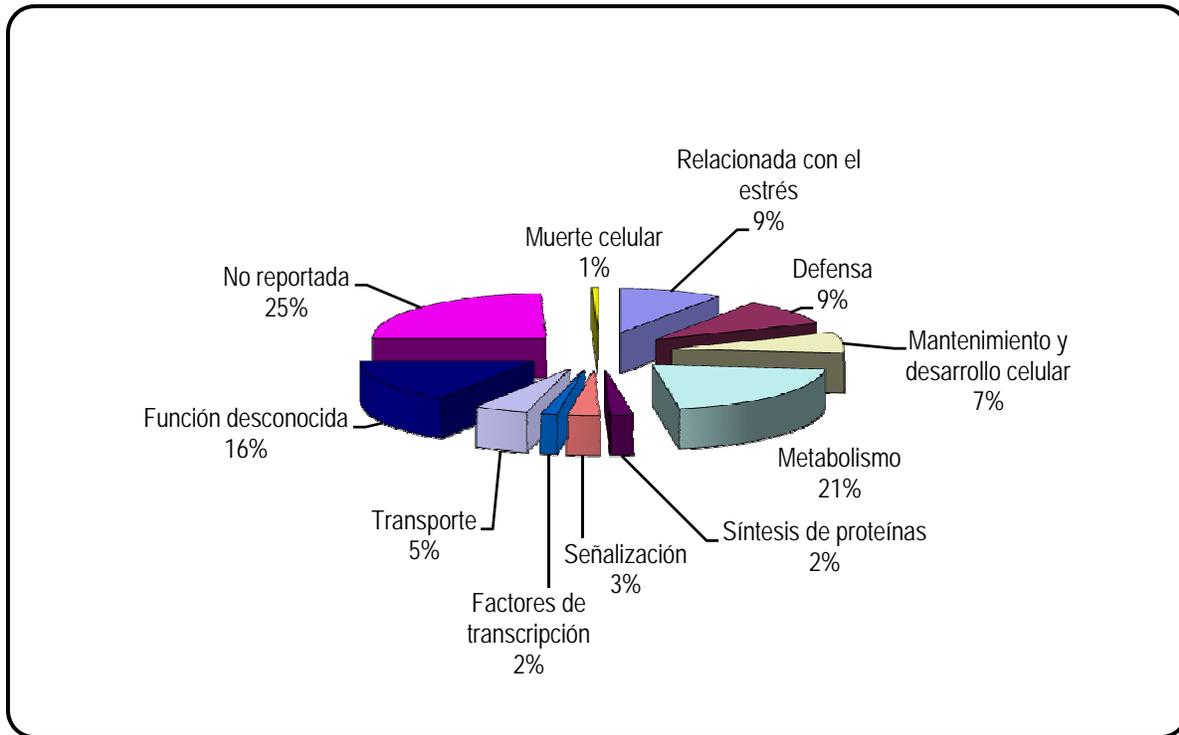


Figura 3. Clasificación de los EST's obtenidos de la genoteca sustractiva de chile con *Rhizoctonia solani* multinucleada de acuerdo a su posible función biológica, empleando la base de datos GeneOntology (www.geneontology.org).

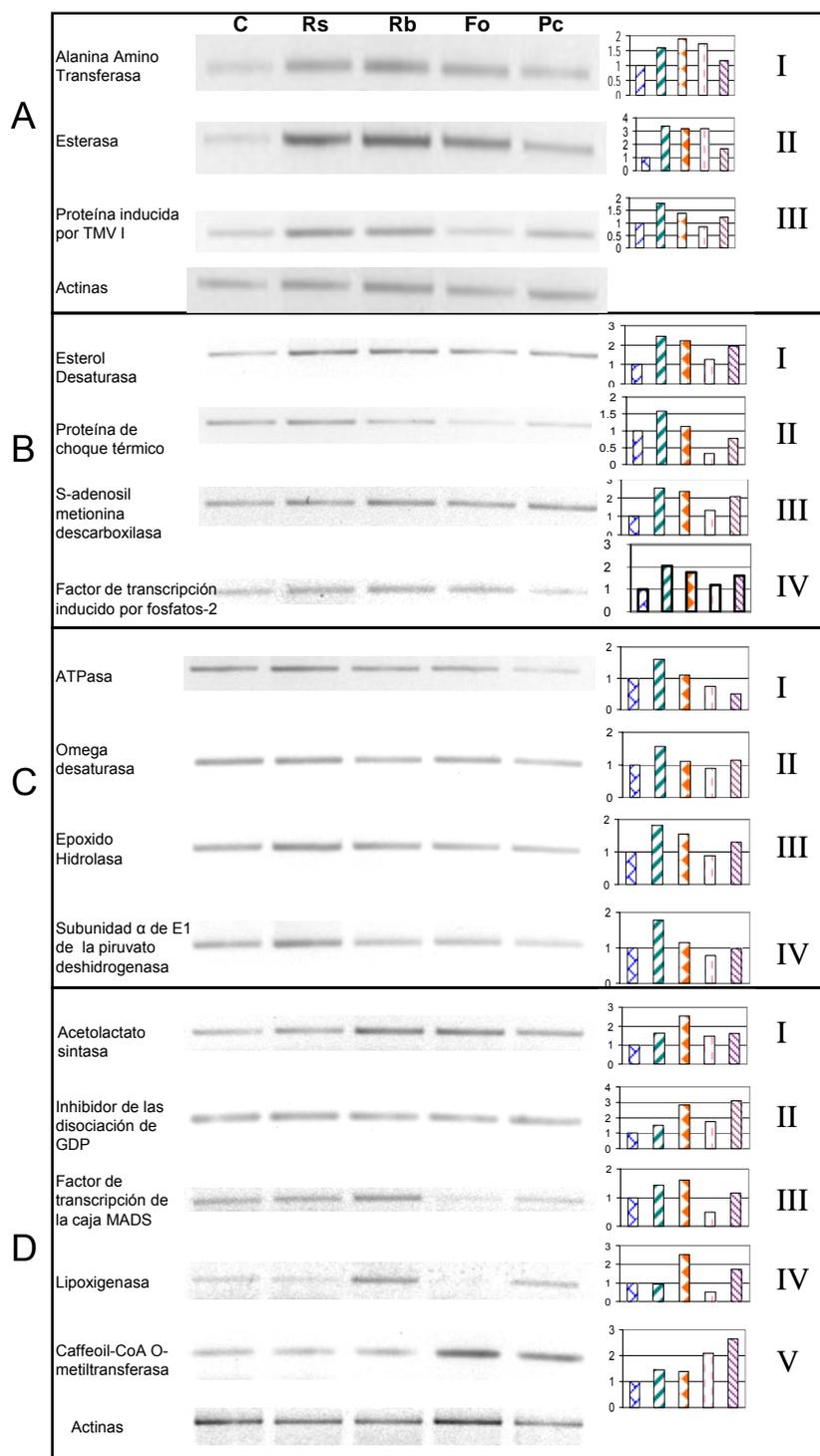


Figura 4. Expresión de genes de chile durante la interacción con el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Rs), *Rhizoctonia binucleada* (Rb), *Fusarium oxysporum* (Fo) y *Phytophthora capsici* (Pc). Las raíces del chile (tres semanas de edad) se cosecharon y congelaron a las 8 y 16 h. El RNA total fue aislado de cada interacción, incluyendo como control plantas sin inocular. Dos µg de cada RNA total de cada muestra fue empleado para la síntesis del cDNA. Veinte µL de cada producto de PCR fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% (w/v). Como control de carga se empleó el gen de actina. Los histogramas representan la intensidad relativa de cada mensajero normalizada con respecto a la actina.

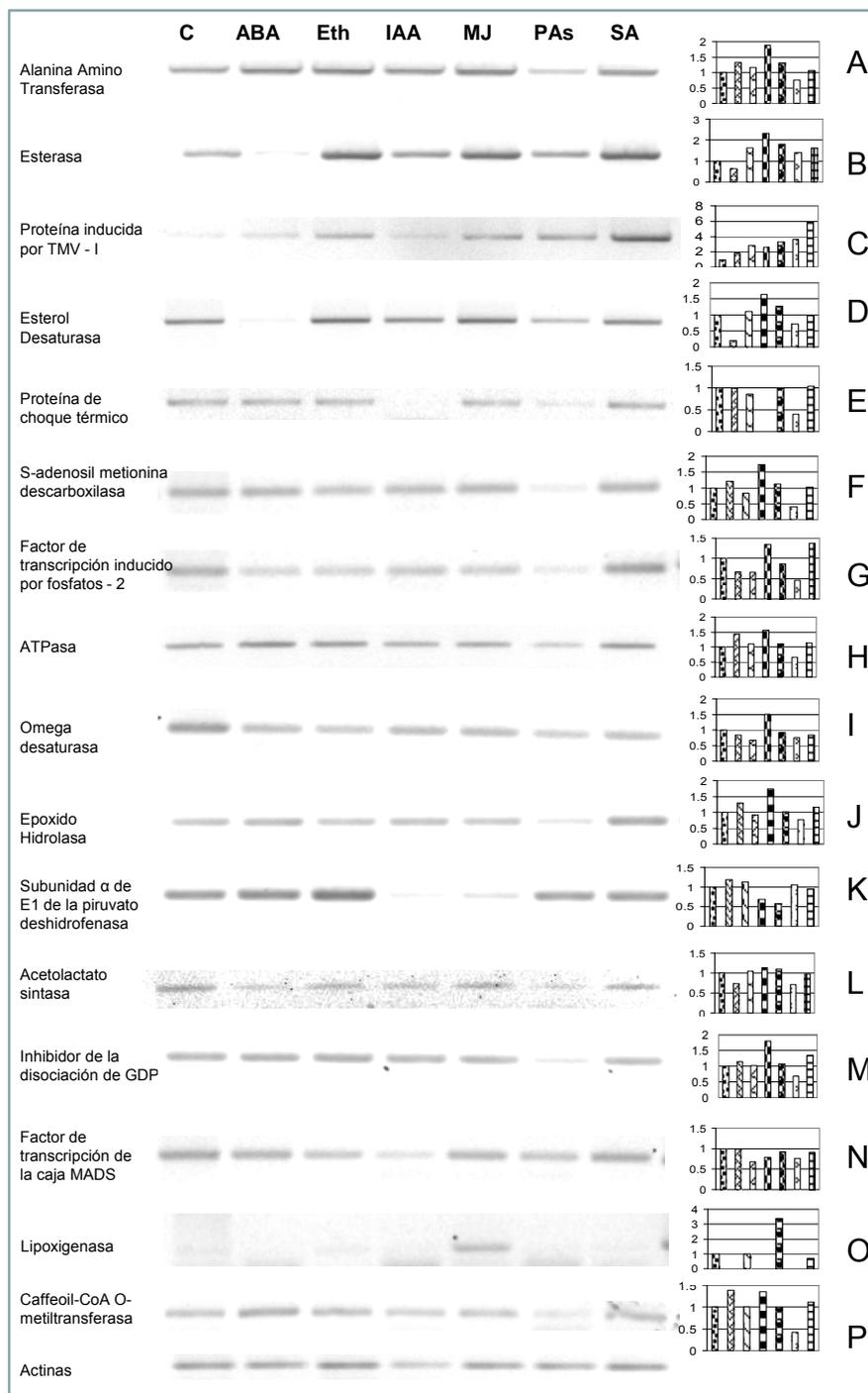


Figura 5. Expresión de genes de plántulas de Chile (3 semanas de edad) en respuesta al tratamiento con reguladores del crecimiento, como ácido abscísico (ABA) 100 μ M, ethephon 10 mM (Eth), ácido indol acético 5.7 mM (IAA), metil jasmonato (MJ) 15 μ l al 95% (en un algodón), una mezcla de poliaminas (putrescina 1 mM, espermina 0.001 mM y espermidina 0.001 mM) (PAs) y ácido salicílico (SA) 1 mM, y como control (C) plántulas sin tratamiento con la raíz bañada con agua destilada estéril. El RNA total fue purificado de raíces de Chile y 2 μ g de RNA total de cada tratamiento fue empleado para la síntesis del cDNA. Veinte μ L de cada producto de PCR fue separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% (w/v). Como control de carga se empleó el gen de actina. Los histogramas representan la intensidad relativa de cada mensajero normalizada con respecto a la actina.