

Cambios Morfológicos en Células de Chile CM334 Inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*

Morphological Changes in Cells of Chilli CM334 Inoculated with *Phytophthora capsici* and *Fusarium oxysporum*

Diana Sanzón Gómez, Guadalupe Valdovinos Ponce, Reyna Isabel Rojas Martínez, Emma Zavaleta Mejía, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados (IFIT-CP), km 36.5 Carr. México- Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **María Alejandra Mora Avilés,** INIFAP, Campo Experimental Bajío, km 6 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Gto., CP 38010, México; **Lorenzo Guevara Olvera,** Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Av. Tecnológico y Antonio García-Cubas S/N Col. FOVISSSTE, Celaya, Gto., CP 38010, México. Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

(Recibido: Octubre 17, 2011 Aceptado: Enero 12, 2012)

Sanzón GD, Valdovinos PG, Rojas MRI, Zavaleta ME, Mora AMA y Guevara OL. 2012. Cambios morfológicos en células de chile CM334 inoculado con *Phytophthora capsici* y con *Fusarium oxysporum*. Revista Mexicana de Fitopatología 30:66-71.

Resumen. El chile (*Capsicum annuum*) CM334 es resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*), tal resistencia se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH); sin embargo, este genotipo es susceptible a *Fusarium oxysporum* (*Fo*). En el presente trabajo se compararon los cambios celulares en la RH inducida por *Pc*, interacción incompatible (II), y la necrosis inducida por *Fo*, interacción compatible (IC). La necrosis y la colonización por el oomiceto en la II se confinó al sitio de la inoculación en el tallo; y en la IC, el patógeno colonizó todo el tallo y la necrosis se limitó a la zona de inoculación. La degradación de las paredes celulares en la IC fue evidente, en cambio en la II, solamente se observó el colapso de las células. En la II el 31% de los núcleos de las células corticales fueron rojos sugiriendo una RH y en la IC el 71% fueron globosos y de color gris claro sugiriendo muerte por necrosis.

Palabras clave adicionales: Interacción compatible, interacción incompatible, oomicetos, reacción de hipersensibilidad, muerte celular programada, necrosis.

El chile (*Capsicum annuum*) es un cultivo de gran importancia económica en México, y la enfermedad conocida como marchitez del chile inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*) causa grandes pérdidas en las zonas productoras. El chile criollo tipo serrano CM334 ha destacado por su alto grado de resistencia al oomiceto que se manifiesta por una reacción de hipersensibilidad (RH) (Bonnet *et al.*, 2007). Durante la RH, las células localizadas

Abstract. The chilli (*Capsicum annuum*) CM334 is resistant to oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*), such resistance is manifested by a hypersensitive reaction (HR); however, this genotype is susceptible to *Fusarium oxysporum* (*Fo*). In this study we compared the cellular changes in the HR-induced by *Pc*, incompatible interaction (II), and *Fo*-induced necrosis, compatible interaction (CI). The necrosis and colonization by the oomycete in II was confined to the site of inoculation in the stem, and in CI, the pathogen colonized the whole stem and the necrosis was limited to the site of inoculation. Cell wall degradation was evident in the CI, whereas in the II, only the collapse of the cells was observed. In the II, 31% of the nuclei of cortical cells were red suggesting a HR and in the CI 71% of the nuclei were globose and light gray suggesting a death by necrosis.

Additional keywords: Compatible interaction, incompatible interaction, oomycetes, hypersensitive reaction, programmed cell death, necrosis.

Résumé. Le piment (*Capsicum annuum*) CM334 est résistant à l'oomycète *Phytophthora capsici* (*Pc*), cette résistance se manifestant par une réaction d'hipersensibilité. Cependant, ce génotype présente une sensibilité à *Fusarium oxysporum* (*Fo*). Dans cette étude, nous avons comparé les changements cellulaires dans la réaction d'hipersensibilité induite par *Pc* (l'interaction incompatible), et la nécrose induite par *Fo* (l'interaction compatible). La nécrose et la colonisation occasionnées par l'oomycète dans l'interaction incompatible ont été limitées au site d'inoculation dans la tige. Dans l'interaction compatible, l'agent pathogène a colonisé toute la tige et la nécrose a été limitée au site d'inoculation. La dégradation des parois cellulaires était évidente dans l'interaction compatible, alors que dans l'interaction incompatible a été observé l'effondrement des

alrededor del sitio de penetración se “suicidan” lo que trae como resultado que la infección y el avance del patógeno se detenga. La RH ha sido considerada un tipo de muerte celular programada (MCP). En frutos de chile (*Capsicum baccatum*) resistente a *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), se observaron varias características citológicas típicas de la MCP, como lo son la separación de la membrana plasmática de la pared celular, la condensación del citoplasma, la dilatación del retículo endoplásmico, la presencia de numerosas vacuolas pequeñas, núcleos heterocromáticos y menos osmofílicos, y fragmentación del ADN. En contraste, en frutos susceptibles (*C. annuum*) hubo degradación de la pared celular, fragmentación de vacuolas, degradación del núcleo y citoplasma, y condensación del citoplasma (Kim *et al.*, 2004). Recientemente se observó que algunas plantas de CM334 murieron después de haber sido inoculadas con *Pc* (datos no publicados). La muerte de estas plantas pudo haber sido el resultado de la pérdida de resistencia o bien producto de una RH tan violenta y extensiva a nivel del cuello de las plantas que éstas terminaron por sucumbir. Dada la importancia del genotipo CM334, calificado como el resistente universal a *Pc* y que constituye una fuente potencial de resistencia al oomiceto (Glosier *et al.*, 2008), se consideró conveniente comparar los cambios morfológicos celulares de las plantas de chile CM334 en la interacción incompatible con *P. capsici*, con aquellos desarrollados en la interacción compatible con *Fusarium oxysporum* (*Fo*). Semillas germinadas de chile CM334 y Yolo Wonder (YW) (utilizado como control susceptible a *Pc*) se plantaron en vasos de plástico y se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 25±2 °C con 14 h de luz y 10 h de oscuridad.

Los patógenos *Pc* (cepa 6143) y *Fo* se cultivaron a temperatura ambiente en medio V8 y PDA, respectivamente. Plantas en etapa de 4-6 hojas verdaderas, se inocularon realizando una punción en el nudo de las hojas cotiledonarias y sobre esta área se colocó un disco de medio de cultivo de 0.5 cm de diámetro con micelio. Para las plantas de CM334 se tuvieron tres tratamientos: 1) inoculación con *Pc*, 2) inoculación con *Fo* y 3) testigo (con punción y disco de medio de cultivo sin micelio), y para YW se tuvieron sólo dos: 1) inoculación con *P. capsici*, y 2) testigo. En las inoculaciones con *Pc*, se consideraron los tiempos 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) y 48, 96 y 120 hpi en el caso de *Fo*. Cada tiempo contó con su respectivo testigo. Además a los nueve días posteriores a la inoculación (dpi), en cinco plantas de CM334 inoculadas con *Pc* se evaluó, por abajo del sitio de la punción e inoculación el avance de la necrosis y colonización sistémica, ya que toda la parte apical del tallo colapsó.

De cada una de esas plantas se tomaron tres fragmentos de tallo de 1 cm de longitud a partir del sitio donde terminaba la necrosis y hacia la base del tallo, cada fragmento se colocó en una caja Petri con agua destilada estéril para detectar el crecimiento micelial y formación de esporangios del oomiceto. Las cajas se mantuvieron a temperatura ambiente y luz blanca constante por 72 h para observar la presencia o ausencia de esporangios. También

cellules. Dans l'interaction incompatible 31% des noyaux des cellules corticales étaient rouges, suggérant une réaction d'hypersensibilité. Dans l'interaction compatible 71% étaient globuleux et gris, suggérant la mort par nécrose.

Mots clés supplémentaires: Interaction compatible, interaction incompatible, oomycètes, réaction d'hypersensibilité, mort cellulaire programmée, nécrose.

The chili (*Capsicum annuum*) is an economically important crop in Mexico, and great losses in production areas are caused by the disease known as chili wilt, induced by the oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*). The CM334 creole type Serrano chili has highlighted itself because of its high level of resistance against the oomycete manifested throughout a hypersensitive reaction (HR) (Bonnet *et al.*, 2007). During the HR, the cell located around the penetration site “commits suicide”, which makes both the infection and pathogen spreading stop. The HR has been considered some kind of programmed cell death (PCD). Several cytological characteristics, PCD typical, were observed in chili fruits (*Capsicum baccatum*) resistant to *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*), such as separation of the plasma membrane from the cell wall, cytoplasm condensation, dilation of the endoplasmic reticulum, the presence of numerous small vacuoles, heterochromatic nuclei and less osmophilic, and DNA fragmentation. Conversely, there was a degradation of the cell wall, vacuole fragmentation, degradation of the nucleus and cytoplasm, as well as cytoplasm condensation in susceptible fruits (*C. annuum*) (Kim *et al.*, 2004). It was recently observed that some CM334 plants died after being inoculated with *Pc* (unpublished data). The death of these plants may have been the result of resistance loss, or derived from a violent and extensive HR at a neck level of the plants; they eventually succumb. Due to the relevance of the CM334 genotype, described as the universal resistant to *Pc* and representing a source of potential resistance to the oomycete (Glosier *et al.*, 2008), it was considered desirable to compare the cell morphological changes of CM334 chili plants in the incompatible interaction with *P. capsici* with those developed with in the compatible interaction with *Fusarium oxysporum* (*Fo*). The CM334 chili germinated seeds and Yolo Wonder (YW) (used as a *Pc* susceptible control) were planted in plastic cups and kept in a growth chamber at 25±2 °C with 14 h of light and 10 h of darkness.

The *Pc* pathogens (strain 6143) and *Fo* were cultured at room temperature in V8 and PDA medium, respectively. Plants in the 4 to 6 true leaf stage were inoculated performing a puncture in the node of cotyledonary leaves, and a culture medium disk of 0.5 cm diameter, with mycelium, was placed on this area; a total of three treatments were obtained for CM334 plants: 1) Inoculation with *Pc*, 2) inoculation with *Fo* and 3) control (with disk puncture and culture medium without mycelium); only two were obtained for YW: 1) inoculation with *P. capsici*, and 2) control. The time considered in the *Pc* inoculations, 12, 24 and 48 h post-inoculation (hpi), and 48, 96 and 120 hpi in the *Fo* case.

cinco plantas inoculadas con *Fo* y cinco del testigo se evaluaron a los 30 dpi como se describió para *Pc*, excepto que los fragmentos de tallo fueron de 1.5 cm de longitud, y debido a que no se observó daño en la parte apical del tallo, uno de los fragmentos correspondió a la parte apical, otro al sitio de inoculación y el tercero a la parte basal. Para las observaciones citológicas bajo microscopía de luz se tuvieron cinco plantas para cada tratamiento y tiempo, y para ello se cortó un fragmento de tallo de 1 cm de longitud de cada planta, situando en medio el sitio de la punción.

La fijación e inclusión con parafina de los tallos se hizo con el protocolo de López *et al.* (2005). Las muestras se cortaron transversal y longitudinalmente a 8 μm de grosor con un micrótopo HYRAX M 25 marca ZEISS y se montaron en portaobjetos. Posteriormente se realizó una tinción doble safranina (metilcelosolve) – verde rápido (metilcelosolve) (López *et al.*, 2005) y los cortes se observaron en un microscopio de luz VE-B6 marca Velab. En cortes observados bajo el objetivo de 40X se contaron y caracterizaron los núcleos de las células corticales y medulares del tallo, también se registró el número de células del xilema que contenían polifenoles o hifas. Se observaron muestras de todos los tiempos y tratamientos, pero estas variables sólo se evaluaron en CM334-*Pc* 24 hdi, CM334-*Fo* 48 hdi, CM334-Testigo 24 hdi, YW-*Pc* 24 hdi y YW-Testigo 24 hdi. Fue en estos tiempos en los que se observaron diferencias evidentes entre tratamientos. Todos los cortes que se evaluaron fueron del área donde se hizo la punción e inoculación. En los tratamientos donde se inoculó *Pc*, sólo se evaluó el tiempo 24 hpi debido a que a las 12 hpi no se observaron cambios morfológicos evidentes entre tratamientos y para las 48 hpi la totalidad del tallo en el área de punción e inoculación estaba colapsada. En el caso de la inoculación con *Fo*, se eligió el tiempo de 48 hpi porque fue en ese tiempo en el que se observaron los cambios más evidentes entre tratamientos.

En la interacción compatible YW-*Pc* los primeros síntomas de necrosamiento se presentaron a las 24 hpi y a los 5 dpi todas las plantas murieron. La presencia de micelio y esporangios a lo largo del tallo de todas las plantas, evidenció que el avance del patógeno no se detuvo. En la interacción incompatible CM334-*Pc* se observó el necrosamiento a las 24 hpi y a los 9 dpi el necrosamiento avanzó en el tallo sólo 2.06 cm por debajo del sitio de punción e inoculación. No se detectó la presencia de micelio y esporangios en el segmento basal de tallo analizado, lo que indicó que el avance del oomiceto finalmente fue detenido. En la interacción CM334-*Fo* la longitud de la necrosis fue en promedio de 0.33 cm a los 3 dpi, de 0.52 cm a los 23 dpi y a los 30 dpi el hongo avanzó sistemáticamente hasta el segmento del tallo evaluado más distante al punto de inoculación; en todos los fragmentos se registró la presencia de micelio, microconidios y macroconidios. Las plantas testigo a los 30 dpi no presentaron síntomas de necrosamiento o signos de algún patógeno. Con excepción del tratamiento YW-*Pc*, en todos los demás se distinguieron en las células de los cortes de tejido analizados, tres tipos principales de núcleos: 1) Normales, con formas variadas (esféricos, ovalados o alargados), de color gris claro y con

Each time had its respective control. Also, nine days post inoculation (dpi), the necrosis advancing and systemic colonization were evaluated in five CM334 *Pc* inoculated plants, below the puncture and inoculation site, since the entire apical stem had collapsed.

A total of three stem pieces 1 cm long were taken from each of these plants at the point where necrosis ended and towards the base of the stem; each fragment was placed in a Petri dish with sterile distilled water in order to detect the mycelia growth oomycete sporangia formation. The dishes were kept at room temperature and under a constant white light for 72 h to determine either the presence or absence of sporangia. Moreover, five *Fo* inoculated plants and five from the control were evaluated at 30 dpi as described for *Pc*, with the exception that the stem fragments were 1.5 cm long; since no damage was observed in the apical part of the stem, one of the fragments corresponded to the apical side, another to the inoculation and the third to the basal. A total of five plants were for cytological observations under light microscopy for each treatment and time; a 1 cm stem fragment was cut from each plant to do so, placing the puncture site in the middle.

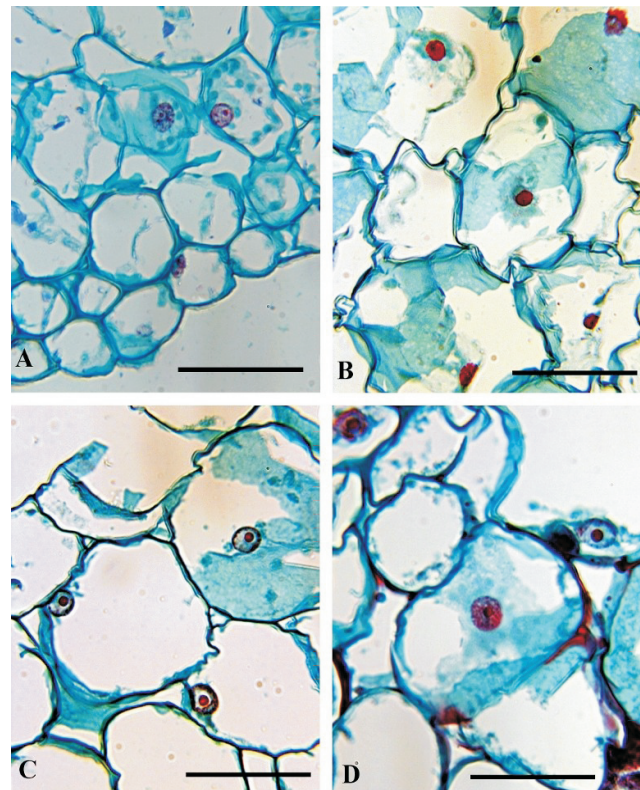


Figura 1. Microfotografías de los tipos de núcleos observados durante las interacciones evaluadas: (A) normales, (B) rojos, (C) globosos y (D) globosos-rojos. Barra = 50 μm .

Figure 1. Microphotographs of the types of nuclei observed during the evaluated interactions: (A) normal, (B) red, (C) globose and (D) globose-roed. Bar= 50 μm .

presencia de gránulos generalmente pequeños y oscuros, con un nucléolo pequeño de color anaranjado (Figura 1A). 2) Rojos, generalmente esféricos u ovalados, condensados (contraídos), de apariencia granulosa y color rojo; los gránulos del núcleo fueron de color rosa oscuro a rojo y el nucléolo con frecuencia no fue distinguible (Figura 1B). 3) Globosos, núcleos grandes y esféricos, de color gris claro, con pocos gránulos oscuros y con un nucléolo grande de color anaranjado brillante situado generalmente en el centro del núcleo (Figura 1C). En todas las plantas testigo, solamente en las células dañadas por la punción se observó la acumulación de polifenoles (formando estructuras esféricas de color rojo y textura lisa) y a las 24 h posteriores a la punción (hpp), las células del tallo mostraron el 98.5% de núcleos con apariencia normal. En cambio en la interacción incompatible (CM334-*Pc*), el colapso de tejidos avanzó hasta la médula del tallo (pero sin degradación aparente de las paredes celulares) a las 24 hpi y el 30.9% de los núcleos de las células de la corteza, no colapsadas, fueron rojos (Figura 1B). Las hifas del oomiceto se encontraron entre las paredes celulares del tejido cortical y medular del tallo y en el 10.9% de los elementos del vaso del xilema. En la interacción compatible (CM334-*Fo*), a las 48 hpi las células localizadas en el sitio de la inoculación mostraron mayor acumulación de polifenoles, en comparación con la incompatible y las células en contacto con ellos se degradaron total o parcialmente. En esta interacción 70.8% de los núcleos visibles en la corteza fueron globosos (Figura 1C), y sólo el 0.3% presentó color rojo y se localizaron en sitios con acumulación de polifenoles o cercanos a las hifas. Estos últimos núcleos, a diferencia de los observados en la interacción incompatible, mantuvieron un nucléolo grande (Figura 1D). Las hifas de *Fo* invadieron inter e intracelularmente al parénquima y al 1.7% de los elementos de vaso del xilema. En la interacción compatible YW-*Pc* casi la tercera parte del diámetro del tallo fue colapsado presentando una evidente degradación de las paredes celulares a las 24 hpi y el 14.3% del total de núcleos observados en la corteza fueron de color rojo y granuloso. Las hifas crecieron intercelularmente en las células del parénquima y también se observaron dentro del 13.2% de los elementos de vaso del xilema.

Dado que *Pc* no avanzó sistémicamente en CM334, se infiere que la planta mostró resistencia al patógeno y que la necrosis observada fue producto de una rápida e intensa RH. En las plantas susceptibles del cv Yolo Wonder todo el tallo mostró necrosis y fue colonizado; así mismo, en la interacción compatible CM334-*Fo*, el patógeno creció sistémicamente a lo largo del tallo como lo indicó el hecho de que en todos los segmentos analizados hubo desarrollo del patógeno, confirmando la susceptibilidad de CM334 a este hongo. Aunque en las tres interacciones evaluadas se presentaron síntomas de necrosamiento, hubo claras diferencias estructurales a nivel de tejidos, lo que indica que los mecanismos responsables de la necrosis fueron diferentes. En las interacciones compatibles YW-*Pc* y CM334-*Fo* fue evidente la degradación de las paredes celulares desde las 12 hpi, debido posiblemente a la actividad de enzimas líticas producidas por estos patógenos

The fixation and embedding in paraffin the stems was carried out by the López *et al.* (2005) protocol. The samples were cut transversely and longitudinally to an 8 µm thickness with a HYRAX M 25 microtome ZEISS brand; then they were placed on slides. Afterwards, a safranin double stain (methyl cellosolve) was performed – fast Green (methyl cellosolve) (López *et al.*, 2005) and the sections were observed under a VE-B6 light microscope Velab brand. The nuclei of cortical and medullary stem cells were counted and characterized in sections observed under the 40X objective; also, the number of xylem cells containing polyphenols or hyphae was recorded. Samples of all times and treatments were observed, but these variables were evaluated only in CM334-*Pc* 24 hdi, CM334-*Fo* 48 hdi, CM334-Control 24hdi, YW-*Pc* 24 hdi and YW-Control 24 hdi. It was during such time frames when there were clear differences among treatments. All of the assessed sections were from the area where both puncture and inoculation had been performed. Only the 24 hpi time was evaluated in the treatments where *Pc* was inoculated due to a lack of evident morphological changes among treatments; furthermore, by the 48 hpi, the entire stem at the puncture and inoculation site had collapsed. A 48 hpi time was chosen in the case of *Fo* inoculation because it was at that time when the most obvious changes, among treatments, were observed.

The first necrosis symptoms, in the YW-*Pc* compatible interaction, occurred at 24 hpi; by the 5 dpi, all of the plants were dead. It was revealed by the presence of mycelium and sporangia along the stem of all plants that the advance of the pathogen did not stop. Necrosis was observed in CM334-*Pc* incompatible interaction at 24 hpi and; necrosis had advanced on the stem only 2.06 cm below the puncture and inoculation site by the 9 dpi. The presence of mycelium or sporangia, in the basal stem segment analyzed, was not detected, thus indicating that the advance of the oomycete was finally stopped. The length of the necrosis in the CM334-*Fo* interaction averaged 0.33 cm at 3 dpi, 0.52 cm at 23 dpi and by the 30 dpi the fungus systematically moved forward to the evaluated stem segment most distant from the inoculation point; the presence of mycelium, microconides and macroconidia was recorded in all fragments.

Neither necrosis nor any other pathogen symptoms were revealed by the plants at 30 dpi. A total of three main types of nucleus were perceived in all other cells, except for the YW-*Pc* treatment: 1) Normal with various shapes (spherical, oval or elongated), light gray and with the presence of granules, usually small and dark, and a small orange nucleolus (Fig. 1A). 2) Red, usually round or oval, condensed (contracted), grainy appearance and reddish; the nucleus granules were from dark pink to red and the nucleus was often not distinguishable (Fig. 1B). 3) Globose, large, spherical nuclei, light gray with few dark granules and large nucleus with a bright orange, usually located in the center of the nucleus (Fig. 1C). A polyphenols accumulation (forming red and soft textured spherical structures) was observed in all of the control plants, but only in the puncture damaged cells, and 24 h post puncture (hpp) a 98.5% nucleus with a normal appearance was revealed by the stem cells. In

(Roncero *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010), y a que los mecanismos de defensa de las plantas no se dispararon tan rápido ni con la magnitud necesaria para defenderse del ataque por el patógeno. En contraste, en las células de los tallos de CM334 inoculados con *Pc*, las paredes celulares no mostraron mayor degradación aunque si sufrieron colapso. En la interacción CM334-*Pc* la acumulación de compuestos fenólicos pudo haber contribuido a evitar la colonización del tejido por parte del oomiceto, ya que se ha reportado que los ácidos fenólicos solubles contenidos en tallos de variedades resistentes de Chile están asociados con su resistencia a *Pc* (Fernández y Liddell, 1997). Por el contrario, la gran acumulación de compuestos fenólicos en la interacción CM334-*Fo* no pudo evitar la colonización, debido quizás a que estos compuestos no fueron nocivos para este hongo o a que hubo diferencias en el tipo de fenoles acumulados en uno y otro caso. Se sabe que los núcleos de células bajo diferentes tipos de MCP sufren una condensación o contracción y se tornan de coloración oscura (Guimarães y Linden, 2004). Esto coincide con lo observado en células de la interacción CM334-*Pc* donde se presentó el mayor porcentaje de núcleos rojos (30.9%) en comparación con las interacciones compatibles CM334-*Fo* (0.3%) y YW-*Pc* (14.3%). Es posible que en la interacción YW-*Pc* algunas células en las que se observaron núcleos rojos y granulosos también hayan sucumbido por un proceso de MCP, sólo que al presentarse con menor frecuencia (14.3%) en comparación con el genotipo resistente CM334 (30.9%), no se evitó la colonización por el oomiceto. Sin embargo, la posibilidad de que se trate de dos tipos de núcleos rojos con características ultraestructurales diferentes no puede descartarse; de ahí que es necesario verificar bajo microscopía electrónica de transmisión si la ultraestructura de los núcleos rojos de la interacción compatible YW-*Pc* es similar o no a la de la incompatible CM334-*Pc*. Por otro lado, algunas de las características de los núcleos de tipo globoso presentes en la interacción compatible CM334-*Fo* coinciden con las reportadas en interacciones planta-patógeno compatibles, donde los núcleos presentaban un nucléolo grande y prominente o los núcleos no fueron deformados y contenían cromatina menos densa que núcleos de células con MCP (Jones *et al.*, 1974; Kosslak *et al.*, 1997). Estos autores comentan que el núcleo parece ser el primer organelo que reacciona a los estímulos y que los cambios sufridos presumiblemente indican una actividad metabólica nuclear alta. En la presente investigación se encontraron claras diferencias estructurales entre la interacción incompatible CM-334- *Pc* y las interacciones compatibles CM334-*Fo* y YW-*Pc*. A nivel de microscopía de luz, las diferencias en la estructura celular observadas entre las interacciones evaluadas, sugieren que en las interacciones compatibles (YW-*Pc* y CM334-*Fo*) la muerte celular fue producto de la actividad de los metabolitos secretados por el patógeno (a nivel de pared celular), mientras que la muerte celular en la interacción incompatible (CM334-*Pc*) se debió probablemente a una MCP que inhibió el avance del oomiceto a lo largo del tallo de la planta.

contrast, in the CM334-*Pc* incompatible interaction, the collapse progressed to the tissue of the stem pith (but without apparent cell walls degradation) at 24 hpi, and 30.9% of the cells nuclei in the cortex, not collapsed, were red (Fig. 1B). The oomycete hyphae were found between the walls of cortical and medullary tissue of the stem and in 10.9% of the xylem vessel elements. An increased polyphenols accumulation was revealed in the CM334-*Fo* compatible interaction by the cells located in the inoculation site at 48 hpi, in comparison with the incompatible; the cells in contact with them were either totally or partially degraded. A total of 70.8% of the nuclei visible in the cortex, in this interaction, were globose (Fig. 1C), and only 0.3% were red and located at sites with polyphenols accumulation or near the hyphae. Unlike those observed in the incompatible interaction, these latter nuclei maintained large nucleoli (Fig. 1D). The parenchyma was inter and intracellularly invaded by the *Fo* hyphae, and 1.7% of the xylem vessel elements. Almost a third of the stem diameter was collapsed in the YW-*Pc* compatible interaction, by presenting clear cell walls degradation at 24 hpi and the 14.3% of the total nuclei observed in the cortex were red and granular. The hyphae grew intercellularly in the parenchyma cells, and were also observed in 13.2% of the xylem vessel elements.

Since the *Pc* did not systematically moved in CM334, it is inferred that a resistance from the plant to the pathogen was revealed, and that the observed necrosis was due to a rapid and intense HR. Concerning the susceptible Yolo Wonder plants, the whole stem had necrosis and was colonized, also, in the CM334-*Fo* compatible interaction the pathogen grew systematically along the stem, as indicated by the fact that in there was a pathogen development in all of the analyzed segments, confirming CM334 susceptibility to such fungus. Even though necrosis symptoms were revealed in the three evaluated interactions, there were clear structural differences at tissue level, which indicates that the mechanisms responsible for necrosis were different. The cell walls degradation was quite evident since the 12 hpi in the YW-*Pc* and CM334-*Fo* compatible interactions, perhaps due to lytic enzymes activity produced by these pathogens (Roncero *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2010), and because the plants defense mechanisms were neither triggered as quickly nor to the extent required in order to defend itself from the attack of the pathogen.

Conversely, in CM334 stem cells *Pc* inoculated, cell walls did not have a higher degradation, although they did experience a collapse. The phenolic compounds accumulation could have contributed to prevent tissue colonization by the oomycete, as it has been reported that the content of soluble phenolic acids in stems of resistant varieties of Chile are associated with resistance to *Pc* (Fernández and Liddell, 1997). Instead, the large phenolic compounds accumulation in the CM334-*Fo* interaction was not sufficient to prevent colonization, probably due to the fact that such compounds were not harmful to the fungus, or because there were differences in the type of phenols accumulated in each case. It is known that the cells nuclei, under different MCP types undergo condensation or

LITERATURA CITADA

- Bonnet J, Danan S, Boudet C, Barchi L, Sage-Palloix A, Caromel B, Palloix A and Lefebvre V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 115: 253-264.
- Feng B, Li P, Wang H and Zhang X. 2010. Functional analysis of pcpme6 from oomycete plant pathogen *Phytophthora capsici*. *Microbial Pathogenesis* 49: 23-31.
- Fernández PS and Liddell CM. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87: 529.
- Glosier BR, Ogundiwin EA, Sidhu GS, Sischo DR and Prince JP. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici* in pepper. *Euphytica* 162: 23-30.
- Guimarães CA and Linden R. 2004. Programmed cell death. Apoptosis and alternative deathstyles. *European Journal of Biochemistry* 271: 1638-1650.
- Jones DR, Graham WG and Ward EWB. 1974. Ultrastructural changes in pepper cells in a compatible interaction with *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* 64:1084-1090.
- Kim KH, Yoon JB, Park HG, Park EW and Kim YH. 2004. Structural modifications and programmed cell death of chili pepper fruit related to resistance responses to *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Phytopathology* 94: 1295-1304.
- Kosslak RM, Chamberlin MA, Palmer RG and Bowen BA. 1997. Programmed cell death in the root cortex of soybean root necrosis mutants. *The Plant Journal* 11: 729-745.
- López CML, Márquez GJ y Murguía SG. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo de Angiospermas. 2a Edición. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Roncero MI, Di Pietro A, Ruiz RMC, Huertas GMD, García MFI, Méglecz E, Jiménez A, Caracuel Z, Sancho ZR, Hera C, Gómez GE, Ruiz RM, González VCI y Páez MJ. 2000. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: S47-S53.
- contraction, and become dark colored (Guimarães and Linden, 2004). This is consistent with what has been observed in the CM334-*Pc* interaction, where the highest red nuclei percentage was revealed (30.9%) compared to the CM334-*Fo* (0.3%) and YW-*Pc* (14.3%) compatible interactions. It is possible that in the YW-*Pc* interaction, some of the cells in which red and granular nuclei were observed had also succumbed to an MCP process, but only to appear less frequently (14.3%) compared to the CM334 resistant genotype (30.9%); the oomycete colonization was not prevented. Nevertheless, the possibility that these two types of red nuclei had different structural characteristics cannot be excluded; hence, it is necessary to verify if the red nuclei ultrastructure of the YW-*Pc* compatible interaction is similar or not to CM334-*Pc* incompatible. Furthermore, some of the characteristics of the globose type nuclei present in the CM334-*Fo* incompatible interaction are consistent with those reported in compatible plant-pathogen interactions, where the nuclei had a prominent and large nucleolus, were not deformed, and contained less dense chromatin than the nuclei cells with MCP (Jones *et al.*, 1974; Kosslak *et al.*, 1997). It is discussed by these authors that the nucleus appears to be the first organelle to react to stimuli and that the changes experienced probably indicate a high nuclear metabolic activity. Clear structural differences between the CM-334- *Pc* incompatible interaction and the CM334-*Fo* and YW-*Pc* compatible were revealed in the study hereby. It is suggested by the cellular structure differences observed among the evaluated interactions, at a light microscopy level, that the cellular death observed in the compatible interactions (YW-*Pc* and CM334-*Fo*) was due to the activity of the metabolites secreted by the pathogen (at cellular wall level), whereas the cellular death in the incompatible interaction (CM334-*Pc*) was probably due to an MCP which inhibited the oomycete progress along the stem of the plant.