

DEPÓSITO LEGAL ZU2020000153

ISSN 0041-8811

E-ISSN 2665-0428

Revista de la Universidad del Zulia

Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada



Ciencias del
Agro,
Ingeniería
y Tecnología

Año 16 N° 45

Enero - Abril 2025

Tercera Época

Maracaibo-Venezuela

Identificación de genes homólogos a inhibidores de proteasas presentes en el genoma del oomiceto patógeno de la familia de las solanáceas

Estefanía Ramírez-Delgado *

Verónica Ancona **

Gustavo A. Frías-Treviño ***

José Luis Hernández-Mendoza ****

Israel García-León *****

Jesús Di Carlo Quiroz-Velásquez *****

RESUMEN

La secuenciación de genomas de diversos patógenos del género *Phytophthora* ha conducido a la identificación de genes que codifican proteínas efectoras que permiten la evasión y manipulación de la defensa de la planta. El objetivo de la investigación fue la búsqueda e identificación de secuencias homólogas a proteínas inhibidoras de proteasas y glucanasas, dentro del genoma de *P. capsici* (CPV-282) aislado de Chile en México. La Metodología consistió en analizar inhibidores de proteínas extracelulares (EPI), inhibidores de proteasas con dominios tipo cistatina (EPIC) y proteínas inhibidoras de glucanasas (GIP) reportadas en *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora ramorum* y *Phytophthora brassicae*. Resultados obtenidos: El análisis *in silico* reveló la presencia de genes homólogos a EPI10, EPIC3, PiGIP y PsGIP, a partir de los cuales se diseñaron oligonucleótidos para confirmar la predicción del análisis bioinformático. Las secuencias obtenidas de los productos amplificados por Reacción en Cadena de la Polimerasa permitieron identificar secuencias homólogas a inhibidores de proteasas tipo cistatina (PcEPIC3) e inhibidores de glucanasas (PcGIP), dentro del genoma de *P. capsici*. Los resultados sugieren que el género *Phytophthora* comparte herramientas genéticas que le permiten manipular los sistemas de defensa de la planta y así ser eficientes en la colonización de su hospedero.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología, Gen, Evolución, Informática, Enzima.

*Tecnológico de Monterrey, Departamento de Bioingeniería, Jal. México. E-mail: biol.estefaniarmz@tec.mx

**Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, Weslaco, Texas, Estados Unidos. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8860-0382>. E-mail: Veronica.Ancona-Contreras@tamuk.edu

*** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-4553-8776>. E-mail: serveva_gfriast@hotmail.com

****Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8686-1340>. E-mail: jhernandezm@ipn.mx

*****Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7876-1219>. E-mail: igarcial@ipn.mx

*****Instituto Politécnico Nacional, Reynosa, Tamaulipas, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6021-0427>. E-mail: jquiroz@ipn.mx

Recibido: 02/10/2024

Aceptado: 04/12/2024

Identification of Genes Homologous to Protease Inhibitors Present in the Genome of the Pathogenic Oomycete of the Solanaceae Family

ABSTRACT

The sequencing of genomes of various pathogens of the *Phytophthora* genus has led to the identification of genes encoding effector proteins that allow evasion and manipulation of plant defense. The objective of the research was the search and identification of sequences homologous to protease and glucanase inhibitor proteins within the genome of *P. capsici* (CPV-282) isolated from chili in Mexico. The methodology consisted of analyzing extracellular protein inhibitors (EPI), protease inhibitors with cystatin-like domains (EPIC) and glucanase inhibitor proteins (GIP) reported in *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora brassicae*. Results obtained: The *in silico* analysis revealed the presence of homologous genes to EPII0, EPIC3, PiGIP and PsGIP, from which oligonucleotides were designed to confirm the prediction of the bioinformatics analysis. The sequences obtained from the products amplified by Polymerase Chain Reaction allowed the identification of sequences homologous to cystatin-type protease inhibitors (PcEPIC3) and glucanase inhibitors (PcGIP) within the *P. capsici* genome. The results suggest that the *Phytophthora* genus shares genetic tools that allow it to manipulate the plant's defense systems and thus be efficient in the colonization of its host.

KEYWORDS: Biotechnology, Genes, Evolution, Computer programming, Enzymes.

Introducción

El proceso coevolutivo entre plantas y patógenos ha robustecido el arsenal químico que regula su interacción (Toruño *et al.*, 2016). Así, las plantas cuentan con enzimas hidrolíticas como glucanasas, quitinasas y proteasas, que representan un mecanismo de defensa importante a través de la degradación directa de la pared micelial del patógeno y, en el caso de las glucanasas, indirectamente a través de la liberación de oligosacáridos de β -1,3-glucanos (Karimi-Jashni *et al.*, 2015; Sharpee y Dean, 2016). Por su parte, los patógenos han desarrollado mecanismos para escapar de esta actividad enzimática, tal es el caso de los fitopatógenos del género *Phytophthora* que son considerados de gran importancia por causar numerosas pérdidas en cultivos, así como por los daños en ecosistemas naturales en todo el mundo (Ho, 2018). Se han reportado diversos genes asociados a la patogénesis, que contribuyen a suprimir las respuestas de defensa en la

planta, produciendo moléculas inhibitorias que les permiten evadir la actividad de glucanasas y proteasas secretadas por el hospedero (Kamoun, 2006; Stassen y Van Den Achkerveken, 2011).

Por ejemplo, *P. sojae* cuenta con genes que codifican inhibidores de glucanasas que interactúan con las endo-beta-1,3-glucanasas de la planta de soja durante la infección (Rose *et al.*, 2002). Estas proteínas, denominadas proteínas inhibidoras de la glucanasa (GIP) comparten una similitud estructural significativa con la clase de tripsina proteasas serinas, pero contienen residuos catalíticos mutados y son proteolíticamente no funcionales (Damasceno *et al.*, 2008). Las GIP se consideran como moléculas que inhiben la degradación de b-1. 3 / 1,6 glucanos en la pared celular del patógeno o la liberación de oligosacáridos que provocan la defensa por las endo-b-1,3 glucanasas del huésped (Wang y Wang, 2018).

Se han descrito y caracterizado inhibidores extracelulares de proteasas, EPII y EPII0, de *P. infestans*, que pertenecen a la familia de los inhibidores de la serina proteasa tipo Kazal (Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005). Además, este fitopatógeno secreta inhibidores de proteasas con dominios tipo cistatina, denominados EPIC (Tian *et al.*, 2007). Se ha observado que los inhibidores EPI y EPII0 interactúan directamente con la serina proteasa P69B del tomate (Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005), mientras que los efectores EPIC1 y EPIC2B atacan e inhiben las proteasas apoplásticas Rcr3, PiP1 del tomate y las proteasas C14 tanto en tomate como en papa (Song *et al.*, 2009; Kaschani *et al.*, 2010). Lo anterior pone de manifiesto que la sinergia entre las proteasas del huésped y los inhibidores del patógeno es un mecanismo de defensa-contra-defensa presente en la interacción planta-*Phytophthora*.

En la literatura sólo se ha reportado la predicción de proteínas inhibidoras de la familia Kazal, en *P. infestans*, *P. sojae*, *P. ramorum* y *P. brassicae* (Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005). La secreción de este tipo de inhibidores parece ser parte de una estrategia de infección común para *Phytophthora*, ya que *P. parasitica* expresa un gen similar al EPII (Panabieres *et al.*, 2005). En cuanto a inhibidores tipo GIP, recientemente se logró la caracterización de un gen codificante en *P. capsici* (Johnson *et al.*, 2016).

Con la expansión de la presencia de *P. capsici* en múltiples familias de hortalizas importantes, los esfuerzos de investigación se han centrado en comprender su epidemiología,

genética y los mecanismos de infección y virulencia (Castro-Rocha *et al.*, 2015). Si bien se han logrado avances importantes en la identificación de múltiples genes involucrados en el proceso de infección de *P. capsici*, la mayor parte ha estado enfocada a efectores citoplasmáticos (Mafurah *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018) y elicinas (Kim *et al.*, 2009; Vijesh-Kumar *et al.*, 2013). La presente investigación representa una contribución al entendimiento de los fenómenos que se suceden en las interacciones entre *P. capsici* y las plantas hospederas, motivado entre otras cosas porque no se han reportado genes que codifiquen para proteínas de los tipos EPIC, EPI y GIP en cepas mexicanas, integrando desde el análisis bioinformático hasta la confirmación de ellos por métodos moleculares.

1. Materiales y métodos

1.1. Análisis bioinformático

La búsqueda de genes homólogos a las proteínas EPI, EPIC y GIP, se realizó empleando el programa Trace Archive Nucleotide BLAST en el genoma de *P. capsici* (taxid 4784). Para ello se utilizó como referencia los números de acceso de las proteínas reportadas presentes en *P. infestans*, *P. sojae*, *P. ramorum*, *P. brassicae*, (Rose *et al.*, 2002, Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2008). Se eligieron aquellos fragmentos cuyo valor de Query cover fuera mayor al 80% y una identidad superior al 70% a fin de incrementar la homología entre las secuencias. El porcentaje de similitud de las secuencias de interés, así como la ubicación en el genoma de *P. capsici* fue corroborado por medio del programa UGENE 1.31 (<http://ugene.net/>). Posteriormente se diseñaron primers específicos utilizando el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para ello se consideraron parámetros como que la longitud del amplicón fuera de 150–300 pb, temperaturas de alineamiento entre 55-61 °C, y un contenido de GC de 40–60% (Tabla 1). Para cada par de primers se realizó PCR *in silico* a fin de asegurar la especificidad, empleando para ello la herramienta UGENE 1.31.

1.2. Identificación de genes en *P. capsici*

En este estudio se utilizó la cepa CPV-282 de *P. capsici*, proporcionada por la Dra. Sylvia Patricia Fernández-Pavía (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo- Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). La cepa se conservó a temperatura ambiente en medio PDA. Para la obtención de biomasa, se tomaron discos de micelio del borde de la zona de crecimiento, se transfirieron a tubos Falcon™ con 20 ml de caldo LB y se mantuvieron en agitación por 5 días a 30°C. La extracción de ADN se realizó con el DNeasy Plant Pro Kit™ (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido fue cuantificado por medio de NanoDrop™ (Thermo Scientific, USA). Con el propósito de amplificar las regiones homólogas a los genes codificantes para las proteínas de interés, se utilizaron los primers diseñados (Tabla 1) para las reacciones de PCR, las cuales fueron preparadas de acuerdo a las especificaciones del Taq PCR Core Kit™ (Qiagen, Hilden, Alemania). Como control positivo se utilizaron primers específicos para *P. capsici* (Silvar et al, 2005). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 50µl, conteniendo 1 µl de ADN, 5 µl de 10x PCR buffer, 1 µl de 10mM dNTP mix, 0,5 µl de cada primer 10 µM, 0,25 µl de Taq ADN Polimerasa y se ajustó el volumen con agua libre de nucleasas. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 94°C por 3 min, 94°C por 30 s, 55°C por 30s, 72°C por 60s, 35 ciclos, y una extensión final de 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa 1% y se estimó su tamaño con un marcador de peso molecular de 1000 pb. Los productos resultantes fueron secuenciados por Eurofins Genomics LCC™ (Kentucky, USA).

Las secuencias que se obtuvieron fueron analizadas con el software CLC Sequence Viewer 8.0 ® y comparadas con las secuencias de referencia depositadas en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de los productos amplificados se realizaron alineamientos de las secuencias con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para la predicción de los marcos de lectura abierta de las secuencias de oligonucleótidos obtenidas, se utilizó la herramienta ORFfinder del NCBI™ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Se realizó la construcción de árboles filogenéticos utilizando CLC Sequence Viewer 8.0 ®, para analizar la relación entre las secuencias obtenidas de *P. capsici* y aquellas ya reportadas en otras especies, para PcEPIC3, PsGIP y PiGIP se utilizó el método de Neighbor Joining y la

medición de distancia nucleotídica con Kimura 80. Además, se realizó un análisis de Bootstrap con 1000 réplicas para analizar cómo se relacionan entre sí.

2. Resultados y discusión

2.1. Identificación *in silico* de proteínas homólogas en *P. capsici*

En la búsqueda de genes homólogos a las proteínas EPI, EPIC y GIP, dentro del genoma de *P. capsici*, se analizaron un total de 35 proteínas tipo EPI, 13 proteínas tipo EPIC y 7 proteínas tipo GIP, las cuales han sido anteriormente reportadas en *P. infestans*, *P. sojae*, *P. ramorum* y *P. brassicae* (Tian et al., 2007; Rose et al., 2002; Damasceno et al., 2008). Solamente EPI10 (accesión AY586282), EPIC3 (accesión AY935253), PiGIP1 (accesión EU443395) y PiGIP2 (accesión EU443392) de *P. infestans* cumplieron con los criterios de selección establecidos; un porcentaje de Query cover mayor a 80% y el porcentaje de identidad mayor al 70%. En el caso de GIP1 (accesión AF406607) de *P. sojae* el porcentaje de Query cover fue del 78% y el de identidad del 68,81%, sin embargo, se tomó la decisión de incluirlo en el estudio para contar con dos referencias para las proteínas GIP, proveniente de distintas especies, y se descartó PiGIP2, para continuar con el análisis bioinformático.

Posteriormente se llevó a cabo la corroboración del porcentaje de similitud de las secuencias de EPI10, EPIC3, PiGIP1 y GIP1 con el genoma de *P. capsici*. En todos los casos se encontró una similitud superior al 95%. Los fragmentos que alinearon con el genoma fueron tomados como referencia para el diseño de los primers (Tabla 1). La especificidad, ubicación y longitud de cada amplicón fue confirmada por medio del análisis de PCR *in silico*. Después de llevar a cabo el ensayo de PCR *in vitro* se obtuvieron productos con una longitud correspondiente a la estimada en el análisis bioinformático.

2.2. Análisis de secuencias de *Phytophthora*

El análisis mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas del producto amplificado con los primers diseñados para PcEPIC3, reportó en el genoma de *P. capsici* una identidad del 75,47% con el gen de la secuencia codificante para el inhibidor de la proteasa extracelular tipo

cistatina de la especie *P. mirabilis* (Sequence ID: [KF531625.1](#)). En el caso de los oligonucleótidos PiGIP y PsGIP el análisis reportó una identidad del 86,51% y 78,18% respectivamente, en ambos casos con la especie *P. infestans* (Sequence ID: [_XM_002899784.1](#)) y su secuencia codificante del ARNm para una proteína inhibidora de glucanasas. La secuencia que se obtuvo con el primer PcEPII0, no reportó una referencia dentro de la base de datos, que permita asignar un gen de interés, por lo que no se consideró en el resto del trabajo.

Nombre del primer	Secuencia	Tamaño del amplicón	Tm*	% GC
PiGIP1-F	CAGTCTTCGTTATCCCACAC	170 bp	60,4	50
PiGIP1-R	GAGAAGGCTAGTAAGTTCGC		60,4	50
PcEPII0-F	ACGAATGGACGACTTCCTG	162 bp	60,2	52,6
PcEPII0-R	CCGAGGGTAAACTTCATGGT		60,4	50
PsGIP1-F	GCTTGACAGACCGATCAGAA	162 bp	60,4	50
PsGIP1-R	TGGGATAACGAAGACTGTGG		60,4	50
PcEPIC3-F	GGCAGACCTTGATAGTTACG	299 bp	60,4	50
PcEPIC3-R	CGAAAATTCAGTGGGGTTTG		58,4	45

Tabla1. Características de los primers diseñados en este estudio, para la amplificación de regiones homólogas a los genes codificantes para las proteínas EPII0, EPIC3 y GIP

2.3. Predicción de Marcos de Lectura Abierta (ORF)

Se llevó a cabo la predicción de marcos de lectura abierta de las secuencias de oligonucleótidos obtenidas y se determinaron las regiones comprendidas entre un codón de inicio y un codón de parada. Se identificó un ORF con una longitud de 396 nucleótidos (nt) y 131 aminoácidos (aa) para PcEPIC3 y para PiGIP y PsGIP se determinó que tienen un mismo ORF, con una longitud de 777nt y 258aa.

La construcción de los árboles filogenéticos por utilizando el método de Neighbor Joining, permitió realizar un análisis comparativo, donde se observa que *P. capsici* (PcEPIC3) tiene una afinidad del 98% con el clado de otras 3 especies de *Phytophthora* que codifican para proteínas

similares a los inhibidores de la cisteína proteasa. Respecto a PcGIP, se determinó un 96% de afinidad con otras proteínas inhibidoras de glucanasas codificados por *P. infestans* (figura 1).

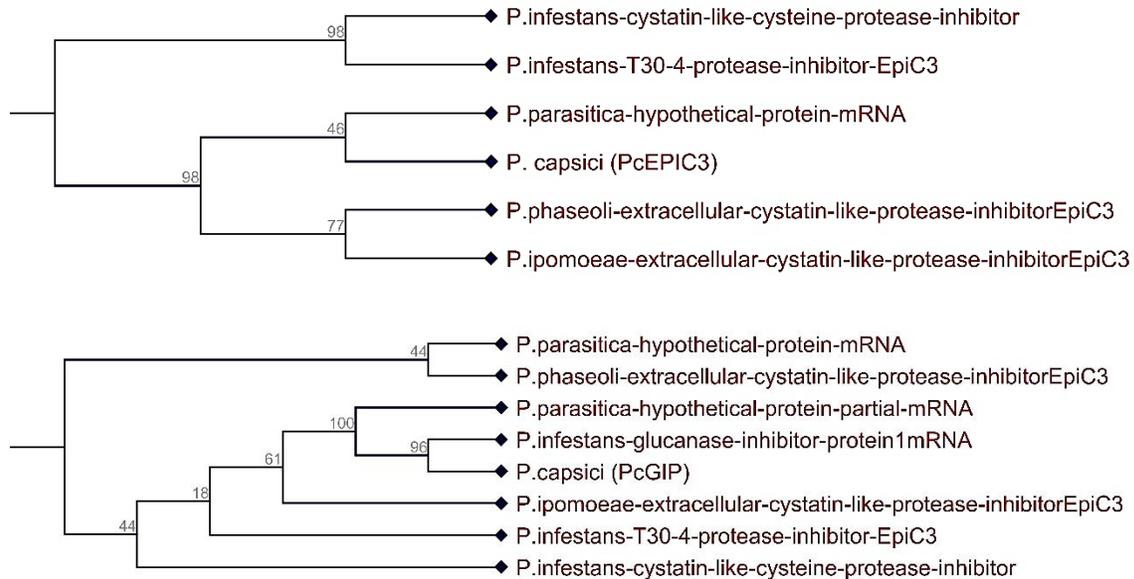


Figura 1. Árboles filogenéticos construidos de las secuencias obtenidas de la amplificación de los oligonucleótidos PcEPI3 y PcGIP, con el método de Neighbor Joining representando correlaciones entre *P. capsici* y las especies reportadas en la base de datos del NCBI.

Los oomicetos son microorganismos filamentosos que incluyen una gran diversidad de fitopatógenos que secretan un arsenal de proteínas efectoras para atacar a sus hospederos y permitir la infección parasitaria. La secuenciación genómica ha revelado que algunas especies albergan un complejo catálogo de efectores en sus genes (Franceschetti *et al.*, 2017). Siguiendo la hipótesis de que las especies de *Phytophthora* comparten la estrategia de evasión y manipulación de la defensa del huésped por medio de la secreción de determinados efectores (Birch *et al.*, 2006; Wawra *et al.*, 2012), este estudio describe un nuevo enfoque para la búsqueda e identificación de secuencias homólogas a proteínas inhibidoras de proteasas y glucanasas, dentro del genoma de un aislado mexicano de *P. capsici* (Reyes-Tena *et al.*, 2019), reportadas en otras especies.

Gran parte del repertorio de efectores de *Phytophthora* consiste en efectores apoplásticos, es decir, proteínas extracelulares que inhiben o contrarrestan los compuestos asociados a la defensa y las enzimas hidrolíticas de la planta. Las proteínas GIP son proteínas secretadas por *Phytophthora* para inhibir la degradación de β -1,3/1,6-glucanos en su pared celular, y que se une e inhibe específicamente a las EGAsas de la planta (Damasceno *et al.*, 2008). El análisis bioinformático que se llevó a cabo en este estudio para determinar la presencia de efectores tipo GIP en *P. capsici*, resultó en un par de secuencias homólogas: PiGIP y PsGIP, con un mismo ORF, lo que indica que aun con disimilitudes en sus secuencias, codifican para un mismo efector GIP. Así mismo ocurre con los efectores EPIC en *P. infestans*, que pueden no estar relacionados en secuencia pero han evolucionado de manera convergente para apuntar a la misma proteasa del hospedero (Song *et al.*, 2009).

Varios de los genes efectores codifican proteínas con una baja similitud de secuencias con proteínas conocidas, (Franceschetti *et al.*, 2017), lo que pudo derivar la falta de asignación de secuencias homólogas para proteínas tipo EPI dentro del genoma de *P. capsici*, a pesar de su frecuente presencia en otras especies (Tian *et al.*, 2004).

La secuencia del efector EPIC3 está altamente conservado en *P. infestans*, *P. sojae* y *P. ramorum* (Tian *et al.*, 2007), así como en *P. cactorum* (Armitage *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos de los análisis de las secuencias mostraron una alta homología con las secuencia de los genes de EPIC3, siendo este el primer reporte para *P. capsici* y el primer caso reportado para un aislado mexicano de efectores tipo GIP. Las diferencias en la expansión de determinadas familias de genes, particularmente aquellos que codifican los dinámicos repertorios de efectores, son probablemente responsables de los diferentes rasgos entre las especies de *Phytophthora*, como lo es la especificidad de sus hospederos y su variabilidad en patogenicidad (Hass *et al.*, 2009).

La expresión de enzimas de defensa por parte de la planta y su correspondiente proteína de inhibición en el patógeno, plantea un escenario de coevolución antagónica (Hein *et al.*, 2009). Los efectores apoplásticos han surgido como actores importantes en la interacción planta-patógeno. Las secuencias homologas a proteínas GIP y EPIC reportadas en este estudio presentes en *P. capsici*, podrían actuar como factores de virulencia para suprimir la defensa de la

planta o como patrones moleculares para provocar la inmunidad de la planta (Wang y Wang, 2018).

Conclusiones

Los hallazgos de este estudio resaltan que las herramientas genéticas existentes en otras especies de *Phytophthora* que derivan en mecanismos para la manipulación e intervención contra la defensa de la planta, también se encuentran presentes en *P. capsici* como secuencias homólogas a proteínas inhibidoras de proteasas y glucanasas. Además, que el análisis de las secuencias de genomas de *Phytophthora* hacen posible comprender la complejidad y posible funcionalidad de los efectores que hacen que este tipo de oomicetos sean patógenos tan eficientes y devastadores.

Referencias

- Armitage, A.D., E. Lysøe, C.F. Nellist, L.A. Lewis, L.M. Cano, R.J. Harrison y M.B. Brurberg. (2018). Bioinformatic characterisation of the effector repertoire of the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum*. *PLoS ONE* 13:1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202305>
- Birch, P.R.J., A.P. Rehmany, L. Pritchard, S. Kamoun y J.L. Beynon. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* 14: 8–11. DOI: 10.1016/j.tim.2005.11.007
- Castro-Rocha A., J.P. Flores-Márgez, M. Aguirre-Ramírez, S.P. Fernández-Pavía, G. Rodríguez-Alvarado y P. Osuna-Ávila. (2015). Traditional and Molecular Studies of the Plant Pathogen *Phytophthora capsici*: A Review. *J Plant Pathol Microb.* 05:06. DOI: 10.4172/2157-7471.1000245
- Damasceno C.M.B., J.G. Bishop, D.R. Ripoll, J. Win, S. Kamoun y J.K.C. Rose. (2008). Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with plant endo-beta-1,3-glucanases. *MPMI* 21: 820–30. DOI: 10.1094/MPMI-21-6-0820
- Fan G., Y. Yang, T. Li, W. Lu, Y. Du, X. Qiang, Q. Wen y W. Shan. (2018). A *Phytophthora capsici* RXLR Effector Targets and Inhibits a Plant PPIase to Suppress Endoplasmic Reticulum-Mediated Immunity. *Molecular Plant* 11:1067–83. DOI: 10.1016/j.molp.2018.05.009
- Franceschetti, M., A. Maqbool, H. G. Pennington, S. Kamoun y M.J. Banfield. (2017). Effectors of Filamentous Plant Pathogens: Commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81(2), 1–17. DOI: 10.1128/MMBR.00066-16
- Hein I., E.M. Gilroy, M.R. Armstrong y P.R.J. Birch. (2009). The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Mol. Plant Pathol.* 10: 547–62. DOI:10.1111/j.1364-3703.2009.00547.x

Johnson G.K., O.R. Babu, I.P. Vijesh-Kumar, S.J. Eapen y M. Anandaraj. (2016). Interplay of genes in plant-pathogen interactions: In planta expression and docking studies of a beta 1,3 glucanase gene from *Piper colubrinum* and a glucanase inhibitor gene from *Phytophthora capsici*. *Physiol Mol Biol Plants* 22:567-73. DOI:10.1007/s12298-016-0378-7

Kamoun S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 41-60. DOI:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436

Karimi-Jashni M., R. Mehrabi, J. Collemare, C.H. Mesarich y P.J.G.M. de Wit. (2015). The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 6:584. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00584>

Kaschani F., M. Shabab, T. Bozkurt, T. Shindo, S. Schornack, C. Gu, M. Ilyas, J. Win, S. Kamoun y R.A.L. van der Hoorn. (2010). An effector-targeted protease contributes to defense against *Phytophthora infestans* and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol.* 154:1794-804. DOI: 10.1104/pp.110.158030

Kim Y.T., J. Oh, K.H. Kim, J.Y. Uhm y B.M. Lee. (2009). Isolation and characterization of NgRLK1, a receptor-like kinase of *Nicotiana glutinosa* that interacts with the elicitor of *Phytophthora capsici*. *Mol Biol Rep.* 37: 717-27. DOI: 10.1007/s11033-009-9570-y

Mafurah J.J., H. Ma, M. Zhang, J. Xu, F. He, T. Ye, D. Shen, Y. Chen, N.A. Rajput y D. Dou. (2015). A Virulence Essential CRN Effector of *Phytophthora capsici* Suppresses Host Defense and Induces Cell Death in Plant Nucleus. *PLoS ONE* 10: e0127965. DOI: 10.1371/journal.pone.0127965

Panabieres F., J. Amselem, E. Galiana y J.Y. Le Berre. (2005). Gene identification in the oomycete pathogen *Phytophthora parasitica* during *in vitro* vegetative growth through expressed sequence tags. *Fungal Genet. Biol.* 42: 611-23. DOI: 10.1016/j.fgb.2005.03.002

Reyes-Tena A., A. Castro-Rocha, G. Rodríguez-Alvarado, G. Vázquez-Marrufo, ME. Pedraza-Santos, K. Lamour y S.P. Fernández-Pavía. (2019). Virulence phenotypes on chili pepper for *Phytophthora capsici* isolates from Michoacán, Mexico. *HortScience* 54(9)1526-1531. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13964-19>

Rose J.K.C., K. Ham, A.G. Darvill y P. Albersheim. (2002). Molecular Cloning and Characterization of Glucanase Inhibitor Proteins: Coevolution of a Counterdefense Mechanism by Plant Pathogens. *The Plant Cell* 14:1329-45. doi: 10.1105/tpc.002253

Sharpee W.C. y R.A. Dean. (2016). Form and function of fungal and oomycete effectors. *Fungal Biology Reviews.* 30:62-73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.04.001>

Silvar C., J.M. Duncan, D.E.L. Cooke, N.A. Williams, J. Díaz y F. Merino. (2005). Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *Eur J Plant Pathol.* 112: 43-52. DOI 10.1007/s10658-004-8232-0

Song J., J. Win, M. Tian, S. Schornack, F. Kaschani, M. Ilyas, R.A.L. van der Hoorn y S. Kamoun. (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *PNAS* 106:1654–59. doi: 10.1073/pnas.0809201106.

Stassen J.H.M. y G. van den Ackerveken. (2011). How do oomycete effectors interfere with plant life? *Curr Opin Plant Biol.* 14:407–14. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.05.002

Tian M., E. Huitema, L. da Cunha, T. Torto-Alalibo y S. Kamoun. (2004). A Kazal-like Extracellular Serine Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Targets the Tomato Pathogenesis-related Protease P69B. *J. Biol. Chem.* 279: 26370–77. DOI: 10.1074/jbc.M400941200

Tian M., B. Benedetti y S. Kamoun. (2005). A Second Kazal-Like Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Inhibits and Interacts with the Apoplastic Pathogenesis-Related Protease P69B of Tomato. *Plant Physiol.* 138:1785–93. DOI: 10.1104/pp.105.061226

Tian M., J. Win, J. Song, R. van der Hoorn, E. van der Knaap y S. Kamoun. (2007). A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiol.* 143:364–77. DOI: 10.1104/pp.106.090050

Toruño T.Y., I. Stergiopoulos y G. Coaker. (2016). Plant-Pathogen Effectors: Cellular Probes Interfering with Plant Defenses in Spatial and Temporal Manners. *Annu Rev Phytopathol.* 54:419–41. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-100204

Vijesh-Kumar I.P., N. Reena, M. Anandaraj, S.J. Eapen, G.K. Johnson y K. Vinitha. (2013). Amplification, Cloning and In silico Prediction of Full Length Elicitin Gene from *Phytophthora capsici*, the Causal Agent of Foot Rot Disease of Black Pepper. *J Plant Pathol Microb.* 04: 6–11. DOI: 10.4172/2157-7471.1000181

Wang Y. y Y. Wang. (2018). *Phytophthora sojae* effectors orchestrate warfare with host immunity. *Curr Opin Microbiol.* 46:7–13. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.008

Wawra S., R. Belmonte, L. Löbach, M. Saraiva, A. Willems y P. van West. (2012). Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Curr Opin Microbiol.* 15: 685–91. DOI: 10.1016/j.mib.2012.10.008

Zhao L., X. Zhang, X. Zhang, W. Song, X. Li, R. Feng, C. Yang, Z. Huang y C. Zhu. (2018). Crystal structure of the RxLR effector PcRxLR12 from *Phytophthora capsici*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 503:1830–35. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.07.121

Agradecimientos

Al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (Laboratorio de Biotecnología Experimental), a Texas A&M University-Kingsville Citrus Center y a la UAAAN, Al Proyecto SIP IPN 20241994, 20242757, así como al programa EDI-IPN, por el apoyo para llevar a cabo el trabajo de investigación y al CONAHCYT – SNII.

Conflicto de interés

Los autores de este manuscrito declaran no tener ningún conflicto de interés.

Declaración ética

Los autores declaran que el proceso de investigación que dio lugar al presente manuscrito se desarrolló siguiendo criterios éticos, por lo que fueron empleadas en forma racional y profesional las herramientas tecnológicas asociadas a la generación del conocimiento.

Copyright

La *Revista de la Universidad del Zulia* declara que reconoce los derechos de los autores de los trabajos originales que en ella se publican; dichos trabajos son propiedad intelectual de sus autores. Los autores preservan sus derechos de autoría y comparten sin propósitos comerciales, según la licencia adoptada por la revista

Licencia Creative Commons

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional



REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA, Fundada el 31 de mayo de 1947

UNIVERSIDAD DEL ZULIA, Fundada el 11 de septiembre de 1891