

Biochemical characterization of oxidative stress in the compatible interaction between *Pepper golden mosaic virus* and habanero pepper plants

Caracterización bioquímica del estrés oxidativo durante la interacción compatible entre el *Pepper golden mosaic virus* y plantas de chile habanero

Cristina Aguilar-Sánchez, División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera estatal libre Villahermosa Comalcalco Km 27 S/N, Ranchería, Jalpa de Méndez, Tabasco, C.P. 86205; **Yereni Minero-García**, ¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 # 130, Chuburna de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México, C.P. 97205; **Cecilia Hernández-Zepeda**, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 8, No. 39, Mz. 29, S.M. 64 Cancún, Quintana Roo, México, C.P. 77500; **Oscar Alberto Moreno-Valenzuela***.

*Corresponding autor: oamv@cicy.mx

Received: November 15, 2021.

Accepted: March 13, 2022.

Aguilar-Sánchez C, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela OA. 2022. Biochemical characterization of oxidative stress in the compatible interaction between *Pepper golden mosaic virus* and habanero pepper plants. Mexican Journal of Phytopathology 40(2): 145-168.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2111-1>

Primera publicación DOI: 29 de Marzo, 2022.

First DOI publication: March 29, 2022.

Abstract. In this work, the role of *Pepper golden mosaic virus*-mosaic strain (PepGMV-Mo) infection on hydrogen peroxide (H₂O₂), salicylic acid (SA), and the antioxidant enzymes catalase (CAT) and peroxidase (POX) were analyzed *in vitro* during the compatible interaction between

Resumen. En este trabajo, se realizó el análisis *in vitro* del papel de la infección por la cepa del *Pepper golden mosaic virus*-mosaico (PepGMV-Mo) en los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido salicílico (SA, por su término en inglés) y de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y peroxidasa (POX), durante la interacción compatible entre el PeGMV-Mo y *Capsicum chinense*. Los niveles endógenos de H₂O₂, SA, CAT y POX fueron monitoreados en un experimento curso temporal y los niveles de las cuatro variables incrementaron en las plantas inoculadas con PepGMV-Mo en comparación con el control de infección simulada (vector de clonación sin virus o infección simulada, mock) y con plantas sanas. Se observaron tres picos de incremento del H₂O₂ en las plantas inoculadas durante el curso temporal. El primer incremento se observó al inicio de la línea del

PepGMV-Mo and *Capsicum chinense* plants. Endogenous H₂O₂, SA, CAT and POX were monitored over time, and the levels of all four were increased in the PepGMV-Mo-Mo inoculated plants compared to the mock-inoculated (cloning vector) and healthy plants. Three peaks of H₂O₂ were observed in the inoculated plants during the time course experiment. The first increase was observed at the beginning of the time course experiment, at 30 minutes post inoculation (mpi), and the last at the end of the experiment, at 24 days post inoculation (dpi). The SA concentration increased 12 hours post-inoculation (hpi) in inoculated plants relative to mock-inoculated and healthy plants. Due to PepGMV-Mo infection, CAT and POX activity increased. An increase in CAT activity was observed 4 hpi in PepGMV-Mo-infected plants, and a decrease in CAT activity correlated with the increase in SA concentration at 12 hpi in the infected plants. POX activity was higher in the infected plants than in the mock-inoculated and healthy plants for the duration of the time course experiment. Taken together, the findings suggest that oxidative stress is involved in the compatible interaction between PepGMV-Mo-Mo and *C. chinense*; however, this burst was not sufficient to confer resistance or tolerance to habanero pepper against the virus based on symptom phenotype observed.

Key words: *in vitro* plants, hydrogen peroxide, salicylic acid, peroxidase, catalase.

The geminivirus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), is a bipartite single stranded virus transmitted by whiteflies and it considered a major pathogen that infects numerous solanaceous crops, including different species of *Capsicum* in Mexico and Central America (Barboza *et al.*, 2018;

tiempo, a 30 minutos después de la inoculación (mdi) y el último pico se observó al final del experimento, a 24 días después de la inoculación (ddi). Las concentraciones del SA incrementaron a las 12 horas después de la inoculación (hdi) en las plantas inoculadas con el virus en comparación con las plantas control y las plantas sanas. La concentración de SA incrementó a las 12 horas después de la inoculación (dpi) en las plantas inoculadas con el PepGMV-Mo en comparación a las plantas control y plantas sanas. Debido a la infección con el PepGMV-Mo, la actividad de CAT y POX incrementó. Se observó un incremento en la actividad de CAT a las 4 hdi en las plantas infectadas con PepGMV-Mo y un decremento en la actividad de CAT correlacionada con el incremento en la concentración de SA a las 12 hpi en las plantas infectadas. La actividad de POX fue mayor en las plantas infectadas que en las plantas control y las plantas sanas durante el curso temporal. En conjunto, los resultados sugieren que el estrés oxidativo está involucrado en la interacción compatible entre el PepGMV-Mo y *C. chinense*; sin embargo, esta explosión oxidativa no fue suficiente para conferir resistencia o tolerancia contra el virus con base en el fenotipo observado en plantas de chile habanero.

Palabras clave: plantas *in vitro*, peróxido de hidrógeno, ácido salicílico, peroxidasa, catalasa.

El geminivirus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) es un virus bipartita monocatenario transmitido por la mosquita blanca y es considerado un patógeno importante que infecta a varios cultivos de solanáceas, incluyendo a diferentes especies de *Capsicum* en México y Centroamérica (Barboza *et al.*, 2018; Hernández-Espinal *et al.*, 2018; Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Nakhla *et al.*, 2005). Con base en sus propiedades genómicas y

Hernández-Espinal *et al.*, 2018; Méndez-Lozano *et al.*, 2001; Nakhla *et al.*, 2005). Based on their genomic and biological properties, three strains of PepGMV are reported as PepGMV-Serrano (PepGMV-Se), PepGMV-Mosaic (PepGMV-Mo) and PepGMV-Distortion (PepGMV-Di) and they cause different symptoms in the infected plants. PepGMV-Se causes a bright golden mosaic, PepGMV-Mo produced a yellow-green mosaic, and PepGMV-Di caused only a mild mosaic and foliar distortion followed by a “recovery” phenotype (Brown *et al.*, 2005), that has been associated with posttranscriptional and transcriptional gene silencing (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). A geminivirus genetic resistance trait was characterized in the *Capsicum chinense* BG-3821 accession, and the marker genes for systemic acquired resistance (SAR) were found to be induced after inoculation of resistant leaves with PepGMV (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011). These findings suggest that resistance in plants depends at least in part on the early response to virus infections, such as the induction of genes related to H₂O₂ production.

Plants respond to pathogen attacks by activating both local and systemic defenses that restrict the growth and spread of the pathogen. In infected leaves, these defenses often involve the hypersensitive response (HR) and the formation of necrotic lesions at the infection site (Lukan *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2007). Eventually, the non-inoculated parts of the plant develop a long-lasting SAR (Clark *et al.*, 2007). One of the earliest events in the HR is a burst of oxidative metabolism leading to the generation of superoxide anion radicals (O²⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂) (Wohlgemuth *et al.*, 2002). Hydrogen peroxide is an important signal molecule in plant defense against biotic and abiotic stress (Quan *et al.*, 2008; Mejía-Teniente *et al.*, 2019). Plants have developed antioxidant

biológicas, se reportaron tres cepas del PepGMV: PepGMV-Serrano (PepGMV-Se), PepGMV-Mosaico (PepGMV-Mo) y PepGMV-Distorsión (PepGMV-Di), que causan síntomas diferentes en las plantas infectadas. PepGMV-Se causó un mosaico dorado brillante, PepGMV-Mo produjo un mosaico amarillo verdoso y PepGMV-Di causó únicamente un leve mosaico y distorsión foliar, seguido de un fenotipo de “recuperación” (Brown *et al.*, 2005), que ha sido relacionado con el silenciamiento de genes postranscripcionales y transcripcionales (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). En la accesión *Capsicum chinense* BG-3821 se caracterizó un rasgo de resistencia genética geminiviral y se encontró que los genes marcadores para la resistencia sistémica adquirida (RSA) se indujeron después de la inoculación de hojas de plantas resistentes con el PepGMV (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011). Estos resultados sugieren que la resistencia en plantas depende, al menos en parte, de la respuesta temprana a infecciones por virus, tal como la inducción de genes relacionados con la producción de H₂O₂.

Las plantas responden a ataques de patógenos mediante la activación de las defensas locales y de las sistémicas, que restringen el crecimiento y la propagación del patógeno. En hojas infectadas, estas defensas suelen involucrar la respuesta hipersensible (RH) y la formación de lesiones necróticas en el sitio de infección (Lukan *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2007). Con el tiempo, las partes no inoculadas de la planta desarrollan una RSA duradera (Clark *et al.*, 2007). Uno de los primeros eventos en la RH es una explosión del metabolismo oxidativo que conduce a la generación de radicales de anión de superóxido (O²⁻) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Wohlgemuth *et al.*, 2002). El peróxido de hidrógeno es una importante molécula señal en la defensa de la planta contra el estrés biótico y abiótico (Quan *et al.*, 2008; Mejía-Teniente *et al.*, 2019).

mechanisms for protection against the damage caused by Reactive Oxygen Species (ROS). The major ROS scavenging enzymes in plants include CAT and POX. In potato tubers infected with *Erwinia chrysanthemi*, for example, a two-fold increase in CAT activity was observed in infected potato tubers compared to mock-inoculated tubers (Miguel *et al.*, 2000). In another study in which susceptible and resistant tomato cultivars were infected with *Ralstonia solanacearum*, the activities of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and catalase all increased; however, the antioxidative mechanism was found to be much stronger in the resistant cultivars (Mandal *et al.*, 2011). In tomato plants, the inoculation of saprobic fungi filtrates increased enzyme activity of CAT, POX and other antioxidant enzymes. These increases were efficient to control the severity of the early blight disease caused by *Alternaria solani* in tomato plants (Rodrigues-Alencar *et al.*, 2020). Plants generally respond to viral infection with ROS generation and an upregulation of antioxidant enzymes. In the compatible interactions of *Cucumber mosaic virus* and *Zucchini yellow mosaic virus* with *Cucumis sativus* and *Cucurbita pepo* plants, respectively, increased antioxidant activities of CAT, POX, and superoxide dismutase have been reported. Thus, antioxidant enzymes contribute to oxidative stress in systemic plant-virus interactions (Riedle-Bauer, 2000).

Salicylic acid (SA) is a key signal in plant defense against viral infection and it is considered critical for the activation of both local and systemic resistance responses (Klessig *et al.*, 2018). Findings reported in the literature indicate an H_2O_2 -SA interaction in which H_2O_2 and SA constitute a self-amplifying system: H_2O_2 induces SA accumulation, and SA enhances H_2O_2 levels (Van Camp *et al.*, 1998). Salicylic acid participates

Las plantas han desarrollado mecanismos antioxidantes para la protección contra el daño causado por las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus términos en inglés). Las principales enzimas depuradoras de ROS en plantas incluyen CAT y POX. En tubérculos de papa infectados con *Erwinia chrysanthemi*, por ejemplo, se observó que se duplicó la actividad de CAT en tubérculos de papa infectados, en comparación con tubérculos con inoculación simulada (Miguel *et al.*, 2000). En otro estudio, en el que cultivares de tomate susceptibles y resistentes fueron infectados con *Ralstonia solanacearum*, aumentaron las actividades de la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa. Sin embargo, el mecanismo antioxidante demostró ser mucho más fuerte en los cultivares resistentes (Mandal *et al.*, 2011). En plantas de tomate, la inoculación de filtrados de hongos saprobios aumentó la actividad enzimática de CAT, POX y otras enzimas antioxidantes. Estos aumentos fueron eficientes en el control de la severidad del tizón temprano causado por *Alternaria solani* en plantas de tomate (Rodrigues-Alencar *et al.*, 2020). Por lo general, las plantas responden a una infección viral con la generación de ROS y una sobrerregulación de enzimas antioxidantes. En las interacciones compatibles del *Cucumber mosaic virus* y del *Zucchini yellow mosaic virus* con plantas de *Cucumis sativus* y *Cucurbita pepo*, respectivamente, se reportaron aumentos en las actividades antioxidantes de CAT, POX y superóxido dismutasa. De esta forma, las enzimas antioxidantes contribuyen al estrés oxidativo en las interacciones sistémicas planta-virus (Riedle-Bauer, 2000).

El ácido salicílico (SA por su término en inglés) es una señal clave en la defensa de la planta contra infecciones virales y es considerado fundamental para la activación de las respuestas de resistencia, tanto locales como sistémicas (Klessig *et al.*, 2018). Los hallazgos reportados en la literatura

in the induction of the incompatible interaction between plants and virus. After this induction, plant responses with several mechanisms to limit viral propagation at the infection site. These mechanisms include the increase in the production of ROS, pathogenesis-related proteins, induction of the HR, etc. (Baebler *et al.*, 2014). SA is also responsible for the activation of systemic acquired resistance (SAR) in distal tissues, which lessens the effects of secondary attacks. Salicylic acid can induce resistance to *Tobacco mosaic virus* (TMV) by affecting its ability to replicate in the inoculated tissue of *Nicotiana benthamiana* (Chivasa *et al.*, 1997). It is also involved in the inhibition of long-distance movement when *Arabidopsis thaliana* is infected by *Cucumber mosaic virus* (CMV). Nevertheless, different host species may use distinct approaches for resisting infection by the same virus (Mayers *et al.*, 2005). The aim of the present study was to investigate the role of hydrogen peroxide, salicylic acid and antioxidant enzymes during the compatible interaction between PepGMV-Mo strain and habanero pepper (*Capsicum chinense*) grown *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and treatments

Habanero pepper (*Capsicum chinense*) seeds were germinated *in vitro* using basal MS media. The seeds were disinfected with sodium hypochlorite (2%) and 70% ethanol, washed three times with distilled sterile water then incubated at 50 °C for 30 min to eliminate any seed-borne pathogens. The *in vitro* plants were maintained in a room under controlled environmental conditions (25 to 26 °C, 16:8 h (light/dark) photoperiod, light intensity of 50.26 mmol m⁻² s⁻¹).

indican una interacción H₂O₂-SA en la que el H₂O₂ y SA constituyen un sistema autoamplificante: el H₂O₂ induce la acumulación de SA y el SA aumenta los niveles de H₂O₂ (Van Camp *et al.*, 1998). El SA participa en la inducción de la interacción incompatible entre plantas y virus. Después de esta inducción, la planta responde con varios mecanismos para limitar la propagación viral en el sitio de infección. Dichos mecanismos incluyen el aumento en la producción de ROS, proteínas relacionadas con la patogénesis, la inducción de RH, etc. (Baebler *et al.*, 2014). El SA también es responsable de la activación de la resistencia sistémica adquirida (RSA) en tejidos distales, que reduce los efectos de ataques secundarios. El SA puede inducir la resistencia al *Tobacco mosaic virus* (TMV) al afectar su habilidad de replicarse en el tejido inoculado de *Nicotiana benthamiana* (Chivasa *et al.*, 1997). También está involucrado en la inhibición de movimiento de larga distancia al infectarse *Arabidopsis thaliana* con el *Cucumber mosaic virus* (CMV). Sin embargo, diferentes especies hospedantes pueden resistir infecciones del mismo virus de formas muy distintas (Mayers *et al.*, 2005). El objetivo del presente estudio fue investigar el papel del peróxido de hidrógeno, el ácido salicílico y enzimas antioxidantes durante la interacción compatible entre la cepa PepGMV-Mo y el chile habanero (*Capsicum chinense*) cultivado *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales vegetales y tratamientos

Se germinaron semillas de chile habanero (*Capsicum chinense*) *in vitro* usando un medio basal MS. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (2%) y 70% etanol, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se incubaron a 50 °C por

Plant inoculation with PepGMV-Mo

Infective clones of PepGMV-Mo (DNA A and DNAB), donated by Dr. Rafael Rivera-Bustamante, were used to inoculate habanero pepper seedlings using a previously described biolistic inoculation procedure (Idris *et al.*, 2001). The third or fourth leaves of plants at the four-leaf stage of *in vitro* plants were directly bombarded at 900 psi He with gold particles (1 µg, BioRad, Hercules, CA) covered with viral DNA as previously described (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). For mock inoculation, the plants were bombarded with the cloning vector (Bluescript) without the virus genome. Healthy plants without inoculation were used as control. Inoculations using this protocol were done in four separate experiments, each consisting of six inoculated plants for each time point of the time course experiment, for virus-infected, mock and healthy plants.

Plant material and DNA analysis

Plant material was collected from systemic infected tissue at the following time points: 0 and 30 min; 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h; and 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 days). The samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total DNA was extracted for each treatment as previously described (Echevarría-Machado *et al.*, 2005).

A 576 bp fragment was amplified using the primers prAV324 and prAC889 (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). PCR was performed using RedTaq Polymerase (Bioline) as described in Hernández-Zepeda *et al.* (2007b). The PCR products were cloned into the pGEMT-Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, and the cloned inserts were sequenced by MacroGen Inc. The sequences were edited and aligned using EditSeq

30 min para eliminar posibles patógenos presentes en las semillas. Las plantas *in vitro* se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones ambientales controladas (25 a 26 °C, fotoperiodo 16:8 h (luz/oscuridad), intensidad de luz de 50.26 mmol m⁻² s⁻¹).

Inoculación de plantas con el PepGMV-Mo

Clonas infecciosas del PepGMV-Mo (ADN A y ADN B), donados por el Dr. Rafael Rivera-Bustamante, fueron usados para inocular plántulas de chile habanero con un procedimiento de inoculación por biolística descrito anteriormente (Idris *et al.*, 2001). Las terceras o cuartas hojas de plantas *in vitro* en la etapa de cuatro hojas fueron bombardeadas de manera directa a 900 psi He con partículas de oro (1 µg, BioRad, Hercules, CA) cubiertas con ADN viral como ya se describió (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a). Para la inoculación simulada, las plantas fueron bombardeadas con el vector de clonación (Bluescript) sin el genoma del virus. Como control se usaron plantas sanas sin inocular. Se realizaron cuatro experimentos separados, cada uno de los cuales consistieron en seis plantas inoculadas para cada punto del curso temporal del experimento, para plantas infectadas con el virus, simuladas y sanas.

Análisis de material vegetal y de ADN

Se recolectó material vegetal de tejido infectado sistémico tras cumplirse los siguientes tiempos: 0 y 30 min; 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h; y 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 días). Las muestras se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. El ADN total fue extraído para cada tratamiento como ya se describió (Echevarría-Machado *et al.*, 2005).

Se amplificó un fragmento de 576 bp usando los iniciadores prAV324 y prAC889 (Hernández-

and MegAlign (DNASStar version 5.08, Madison, USA) and subjected to a BLASTx search using the NCBI GenBank database.

Southern blot

Five micrograms of total DNA from each treatment were digested with *Hind*III and loaded onto a 1% agarose gel. After electrophoresis, the DNA was transferred to a Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) by capillary action using a 20X solution of 0.15 M sodium chloride and 0.015 M sodium citrate (SSC). After this, the membrane was UV-crosslinked. The hybridization was performed with 500 ng of the A genome of PepGMV-Mo as probe. The probe was labeled using AlkPhos Direct™ (Alkphos Direct Hybridization kit, Amersham, Arlington Heights, Illinois, USA).

Hydrogen peroxide determination

A modified version of the ferrous ammonium sulfate/xylene orange (FOX) method was used to determine the H₂O₂ contents of the leaf extracts, as previously reported (Cheeseman, 2006). The assay mixture after addition of the sample contained 250 mM ferrous ammonium sulfate, 100 mM sorbitol, 90% ethanol and 100 mM xylene orange in 25 mM sulfuric acid in a total volume of 3 mL. The assay measured the difference in absorbance between 550 and 800 nm for at least 15 min, and the color was stable for at least 1 h. The standard was prepared by dilution in 30% H₂O₂ (reagent grade, SIGMA). The concentration of H₂O₂ in the reagent was calibrated using the absorbance at 240 nm and an extinction coefficient of 43.6 M⁻¹ cm⁻¹.

Salicylic acid determination

Salicylic acid was extracted from leaf tissue (0.3 g) and analyzed as described by Gaffney *et al.*

Zepeda *et al.*, 2007a). Se realizó la PCR usando Polimerasa RedTaq (Bioline) según lo descrito por Hernández-Zepeda *et al.* (2007b). Los productos de la PCR fueron clonados en el Vector pGEMT-Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante y los insertos clonados fueron secuenciados por MacroGen Inc. Las secuencias fueron editadas y alineadas usando EditSeq y MegAlign (DNASStar versión 5.08, Madison, EE. UU.) y se les realizó una búsqueda de BLASTx usando la base de datos del NCBI GenBank.

Southern blot

Cinco microgramos de ADN total de cada tratamiento se digirieron con *Hind*III y se cargaron a un gel de agarosa a 1%. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana Hybond N+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) por acción capilar usando una solución de 20X de 0.15 M de cloruro de sodio y 0.015 M de citrato de sodio (SSC). Posteriormente, la membrana fue hibridada por UV. La hibridación se llevó a cabo con 500 ng del genoma A de PepGMV-Mo como sonda. La sonda se etiquetó usando AlkPhos Direct™ (Alkphos Direct Hybridization kit, Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE. UU.).

Cuantificación de peróxido de hidrógeno

Una versión modificada del método de sulfato de amonio ferroso /naranja de xilenol (FOX) fue usada para determinar los contenidos de H₂O₂ de los extractos de las hojas, como se reportó anteriormente (Cheeseman, 2006). La mezcla de ensayo después de la adición de la muestra contenía 250 mM de sulfato de amonio ferroso, 100 mM sorbitol, 90% etanol y 100 mM naranja xilenol en 25 mM ácido sulfúrico en un volumen total de 3 mL. El ensayo midió la diferencia de absorbancia entre 550 y 800 nm por al menos 15 min y el color se

(1993), with several modifications. The methanol extracts (2.5 mL) were split into two equal parts, with one part analyzed for free SA and the other for SA conjugate. The final samples were resuspended in 500 μ L methanol, from which 50 μ L was injected into a high-performance liquid chromatographic column (Agilent Technology 1200 series, column Alltima C18 reverse-phase). Step gradient elution was performed using 20 mM sodium acetate (pH 5.0) plus 20% methanol (solvent A) and 20 mM sodium acetate (pH 5.0) plus 70% methanol (solvent B). The separation conditions were the same as those described by Uknes *et al.* (1993): 10 min gradient from 5 to 30% solvent B, 100% B and re-equilibration at 5% B.

Enzyme activity

Protein extraction was performed using phosphate buffer (pH 7.0), and quantification of total proteins was performed as previously described by Peterson (1977). Catalase activity was determined following the generation of O_2 as described by Inamine and Baker (1989). The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 20 g mL^{-1} protein extract in 3 mL solution. The reaction was initiated by adding 10 μ L of 30% [2.2 mM] (w/v) H_2O_2 (reagent grade, SIGMA). POX activity was measured with guaiacol (4 mM, $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) as a substrate in 0.05 mM $C_2H_3NaO_2$ (pH 5.0) at 25 °C. The reaction was initiated using 2.2 mM H_2O_2 . The subsequent oxidation of guaiacol was measured as absorbance change at 470 nm in a spectrophotometer (DU 800; Beckman, Munich, Federal Republic of Germany) for 3 min (Berg and Huystee, 1984).

Statistical analysis

All experiments were performed in six-fold, and the data generated were the results of four separate

mantuvo estable por al menos 1 h. El estándar fue preparado por dilución en 30% H_2O_2 (grado reactivo, SIGMA). La concentración de H_2O_2 en el reactivo fue calibrado con la absorbancia a 240 nm y un coeficiente de extinción de $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Cuantificación de ácido salicílico

El ácido salicílico se extrajo del tejido foliar (0.3 g) y se analizó según lo descrito por Gaffney *et al.* (1993), con varias modificaciones. Los extractos de metanol (2.5 mL) se dividieron en dos partes iguales, con una parte analizada para SA libre y la otra, para SA conjugado. Las muestras finales fueron resuspendidas en 500 μ L metanol, de los cuales se inyectaron 50 μ L en una columna cromatográfica líquida de alto rendimiento (Agilent Technology serie 1200, columna Alltima C18 de fase reversa). La elución en gradiente escalonado se llevó a cabo con 20 mM de acetato de sodio (pH 5.0) más 20% metanol (solvente A) y 20 mM de acetato de sodio (pH 5.0) más 70% metanol (solvente B). Las condiciones de separación fueron iguales a las descritas por Uknes *et al.* (1993): gradiente de 10 min de 5 a 30% solvente B, 100% B y re-equilibrado a 5% B.

Actividad enzimática

La extracción de proteínas se realizó mediante el uso de un amortiguador de fosfato (pH 7.0) y la cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo según lo descrito por Peterson (1977). La actividad de la catalasa se determinó siguiendo la generación de O_2 según lo descrito por Inamine y Baker (1989). La mezcla reactiva contenía 100 mM de amortiguador de fosfato de potasio (pH 7.0) y 20 g mL^{-1} de extracto de proteína en 3 mL de solución. La reacción se inició al agregar 10 μ L de 30% [2.2 mM] (w/v) H_2O_2 (grado reactivo, SIGMA). La actividad de POX se midió con guayacol (4 mM, $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como sustrato en 0.05 mM $C_2H_3NaO_2$

experiments. Enzyme activities, protein, H₂O₂ and SA concentration are mean values from 24 samples.

RESULTS

PepGMV-Mo infection and symptom development

To control environmental variables, an *in vitro* infection protocol was developed for PepGMV-Mo in its compatible host, habanero pepper (*Capsicum chinense*). Typical symptoms associated with PepGMV-Mo infection, were observed in the inoculated plants (Figure 1G-I), however, the symptoms were slightly attenuated. The symptoms associated with PepGMV-Mo infection were visible nine dpi in the inoculated plants. The symptoms observed were leaf curling and mild yellow-green mosaics in the new leaves (Figure 1G). Symptoms were not observed in healthy and mock-inoculated plants (Figure 1A-C and 1D-F). Yellow mosaic and leaf distortion symptoms continued to develop until 24 dpi (Figure 1I). PepGMV-Mo was detected in the new, systemic leaves of the inoculated plants. The samples were analyzed for the detection of PepGMV-Mo of the infected plants. In the infected plants, a 576 bp fragment of the core *Cp* gene was detected using PCR (see methods). Amplification did not occur in samples from mock-inoculated and healthy plants. A total of 15 sequences were selected and compared by pairwise nucleotide identity with the original PepGMV-Mo clone. All of the clones sequenced had 98-100% identity with the original PepGMV-Mo DNA-A clone and 95-98% nucleotide identity with other PepGMV-Mo isolates previously reported in GenBank. Southern blot hybridization was used to evaluate the accumulation of viral DNA. The three expected DNA replicative forms, the open circle, double-

³NaO₂ (pH 5.0) a 25 °C. La reacción inició usando 2.2 mM H₂O₂. La oxidación subsecuente de guayacol se midió como un cambio de absorbancia a 470 nm en un espectrofotómetro (DU 800; Beckman, Munich, República Federal de Alemania) por 3 min (Berg y Huystee, 1984).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado y los datos generados fueron los resultados de cuatro experimentos separados. Las actividades enzimáticas, proteínas, H₂O₂ y concentraciones de SA son valores medios de 24 muestras.

RESULTADOS

Infección por PepGMV-Mo y desarrollo de síntomas

Para controlar las variables ambientales, se desarrolló un protocolo de infección *in vitro* para el PepGMV-Mo en su hospedante compatible, el chile habanero (*Capsicum chinense*). Las plantas inoculadas presentaron síntomas típicos asociados a la infección por PepGMV-Mo (Figura 1G-I), aunque los síntomas estaban ligeramente atenuados. Los síntomas asociados con la infección por PepGMV-Mo fueron visibles a los nueve dpi en las plantas inoculadas. Los síntomas observados son el enrollamiento de las hojas y leves mosaicos color verde amarillento en las hojas nuevas (Figura 1G). No se observaron síntomas en plantas sanas o con inoculación simulada (Figuras 1A-C y 1D-F). Los síntomas de mosaico amarillo y de distorsión foliar continuaron desarrollándose hasta 24 dpi (Figura 1I). Se detectó PepGMV-Mo en las nuevas hojas sistémicas de las plantas inoculadas. Se analizaron las muestras para la detección de PepGMV-Mo en

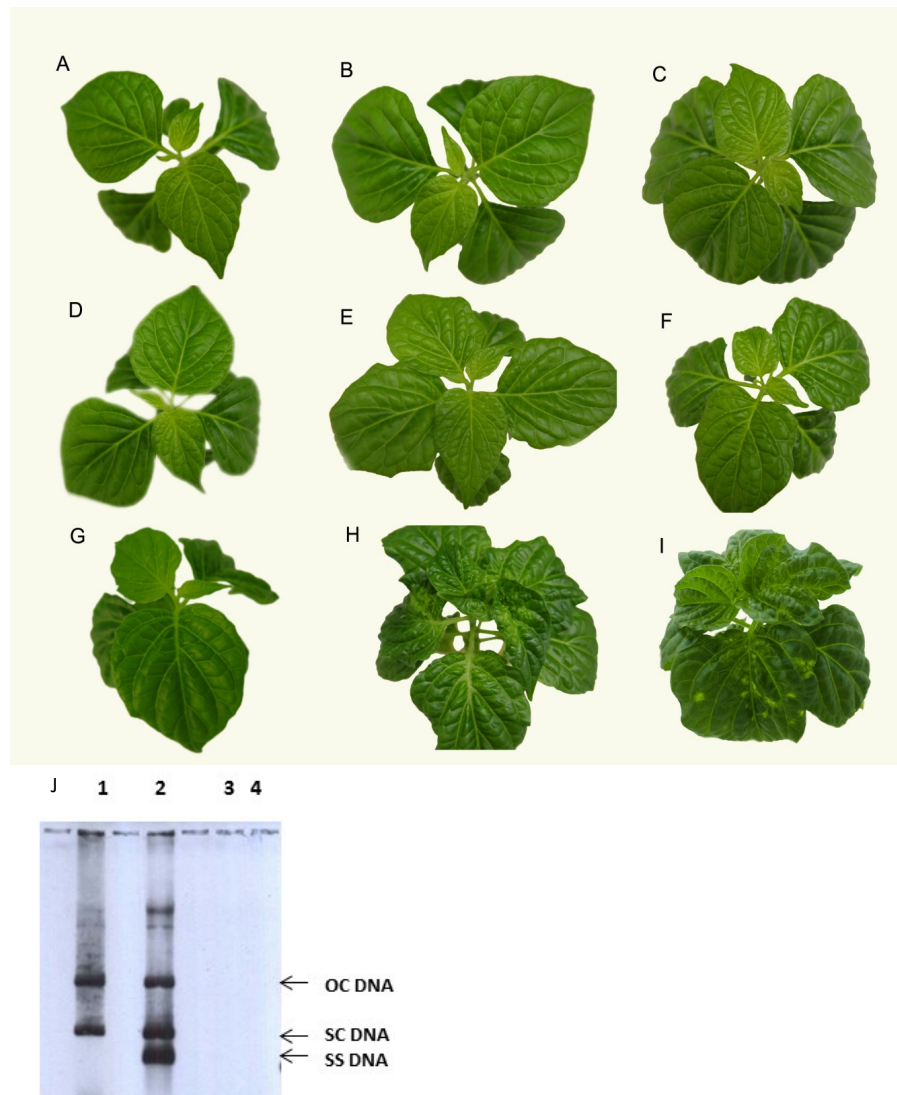


Figure 1. Pepper plants were biolistically inoculated or not inoculated to create three different treatment groups. A. Healthy control plant at time zero; B. Healthy control plant at 9 dpi; C. Healthy plant at 21 dpi; D. Mock-inoculated plant at 0 dpi; E. Mock-inoculated plant at 9 dpi; F. Mock-inoculated plant at 21 dpi; G. PepGMV-Mo-inoculated plant at time zero; H. PepGMV-Mo-inoculated plant at 9 dpi; I. PepGMV-Mo-inoculated plant at 21 dpi. All of the plants were cultivated in basal MS media. J. Viral DNA accumulation. Lane 1, DNA from PepGMV-Mo-inoculated plants at 9 dpi; lane 2, DNA from PepGMV-Mo-inoculated plants at 21 dpi; lane 3, DNA from mock-inoculated plants at 9 dpi; lane 4, DNA from mock-inoculated plants at 21 dpi. The following replicative forms of viral DNA are shown: ssDNA (single-stranded DNA), scDNA (supercoiled dsDNA) and ocDNA (open circular DNA).

Figura 1. Las plantas de chile fueron inoculadas de manera biolística o no inoculadas para formar tres grupos diferentes de tratamiento. A. Planta testigo sana en tiempo cero; B. Planta testigo sana a 9 dpi; C. Planta sana a 21 dpi; D. Planta con inoculación simulada a 0 dpi; E. Planta con inoculación simulada a 9 dpi; F. Planta con inoculación simulada a 21 dpi; G. Planta inoculada con PepGMV-Mo en tiempo cero; H. Planta inoculada con PepGMV-Mo a 9 dpi; I. Planta inoculada con PepGMV-Mo a 21 dpi. Todas las plantas fueron cultivadas en medio MS basal. J. Acumulación de ADN viral. Columna 1, ADN de plantas inoculadas con PepGMV-Mo a 9 dpi; Columna 2, ADN de plantas inoculadas con PepGMV-Mo a 21 dpi; columna 3, ADN de plantas con inoculación simulada a 9 dpi; columna 4, ADN de plantas con inoculación simulada a 21 dpi. Las siguientes formas replicativas de ADN viral se muestran a continuación: ADNmc (ADN monocatenario), ADNse (ADN superenrollado) y ADNca (ADN de círculo abierto).

stranded, and single-stranded forms, were observed in the infected, PepGMV-Mo inoculated plants. While the single-strand form was not observed at 9 dpi, the single- and double-stranded forms were observed at 24 dpi (Figure 1J). These results confirm the validity of the *in vitro* infection system for evaluating the interaction between habanero pepper and PepGMV-Mo. In particular, all of the replicative forms of PepGMV-Mo were detected in the newly developed leaves of all infected plants.

Hydrogen peroxide generation in PepGMV-Mo-infected habanero pepper

After bombardment, H₂O₂ levels increased significantly in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants 30 mpi. In contrast, no increase in H₂O₂ was observed in healthy plants, indicating that the mechanical damage due to the inoculation procedure was responsible for the initial oxidative burst. The content of H₂O₂ in the mock-inoculated and PepGMV-Mo-inoculated plants was 4.6 and 4.8 times greater, respectively, than the content in healthy plants. After this initial increase in H₂O₂ levels, a gradual decrease was observed in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants up to 8 hpi. At 12 hpi, a second peak was observed in the infected plants, with the H₂O₂ content 2.4 and 1.8 times greater than the content in the healthy and mock-inoculated plants, respectively (Figure 2A). Thus, the significant difference in H₂O₂ production could be associated with the presence of the virus in pepper plants. A third peak of H₂O₂ was observed in virus-inoculated plants at 21 dpi that was two times greater than the levels in mock-inoculated and healthy plants (Figure 2B).

Salicylic acid generation in PepGMV-Mo-infected habanero pepper

The levels of SA increased significantly after biolistic inoculation of PepGMV-Mo in inoculated

las plantas infectadas. En las plantas infectadas se detectó un fragmento de 576 bp de la región central del gen *Cp* con el uso de PCR (ver métodos). No existió amplificación en las muestras de plantas sanas o con inoculación simulada. Se seleccionó un total de 15 secuencias, que se compararon mediante identidad de nucleótidos por pares con el clon original del PepGMV-Mo. Todos los clones secuenciados presentaron una identidad de 98-100% con el clon original de ADN-A PepGMV-Mo y 95-98% de identidad nucleótida con otros aislamientos de PepGMV-Mo reportados anteriormente en el GenBank. La hibridación del Southern blot se usó para evaluar la acumulación de ADN viral. Se observaron las tres formas replicativas esperadas del ADN en las plantas infectadas e inoculadas con PepGMV-Mo: el círculo abierto, la doble cadena y una sola cadena. Mientras que la forma de una sola cadena no se observó a 9 dpi, las formas de una y dos cadenas sí fueron observadas a 24 dpi (Figura 1J). Estos resultados confirman la validez del sistema infeccioso *in vitro* para evaluar la interacción entre el chile habanero y PepGMV-Mo. En particular, todas las formas replicativas de PepGMV-Mo fueron detectadas en las hojas recién desarrolladas de todas las plantas infectadas.

Generación de peróxido de hidrógeno en plantas de chile habanero infectadas con PepGMV-Mo.

Después del bombardeo, los niveles de H₂O₂ aumentaron de manera significativa en plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo a los 30 mpi. En contraste, no se observó aumento en H₂O₂ en las plantas sanas, lo cual indica que el daño mecánico debido al procedimiento de inoculación fue el responsable de la explosión oxidativa inicial. El contenido de H₂O₂ en las plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo fue de 4.6 y 4.8 veces mayor, respectivamente, que el contenido en plantas sanas. Después de este aumento inicial en los niveles de H₂O₂, se observó una reducción gra-

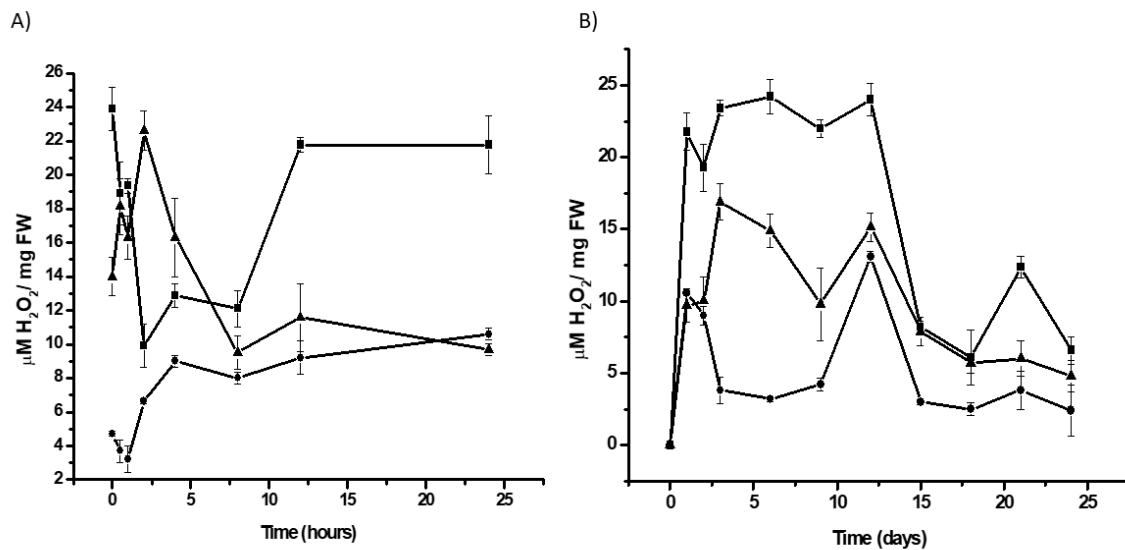


Figure 2. Time-course analysis of the H₂O₂ levels in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. H₂O₂ content during the early response period after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 2. Análisis de curso-temporal de los niveles de H₂O₂ en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Contenido de H₂O₂ durante el periodo de respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

and mock-inoculated plants. At 30 mpi, the SA content in mock-inoculated and PepGMV-Mo-infected plants was 4.0 and 6.2 times greater, respectively, than the SA content in healthy, non-inoculated control plants. These results clearly indicate that the initial increase in SA and H₂O₂ levels were attributable to the mechanical damage caused by biolistic inoculation. After this initial increase, an 8-fold decrease was observed in the levels of SA up to 8 hpi, both in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants (Figure 3A). At 12 hpi, 4.5- and 7.8- fold increases were observed in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, respectively, relative to the levels in healthy plants (Figure 3A). Although increases were observed in both mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, the difference in SA content between them was 58%. This difference suggests that the SA content

dual en plantas con inoculación simulada y en las inoculadas con el PepGMV-Mo hasta 8 hpi. A las 12 hpi, se observó un segundo pico de aumento en las plantas infectadas, con un contenido de H₂O₂ 2.4 y 1.8 veces mayor que el contenido en plantas sanas y con inoculación simulada, respectivamente (Figura 2A). Así, la diferencia significativa en la producción de H₂O₂ podría relacionarse con la presencia del virus en plantas de chile. Se observó un tercer pico de H₂O₂ en las plantas inoculadas con el virus a 21 dpi que fue dos veces mayor que en los niveles en plantas sanas y con inoculación simulada (Figura 2B).

Generación de ácido salicílico en chiles habaneros infectados con PepGMV-Mo

Los niveles de SA aumentaron de forma significativa después de la inoculación por biolística

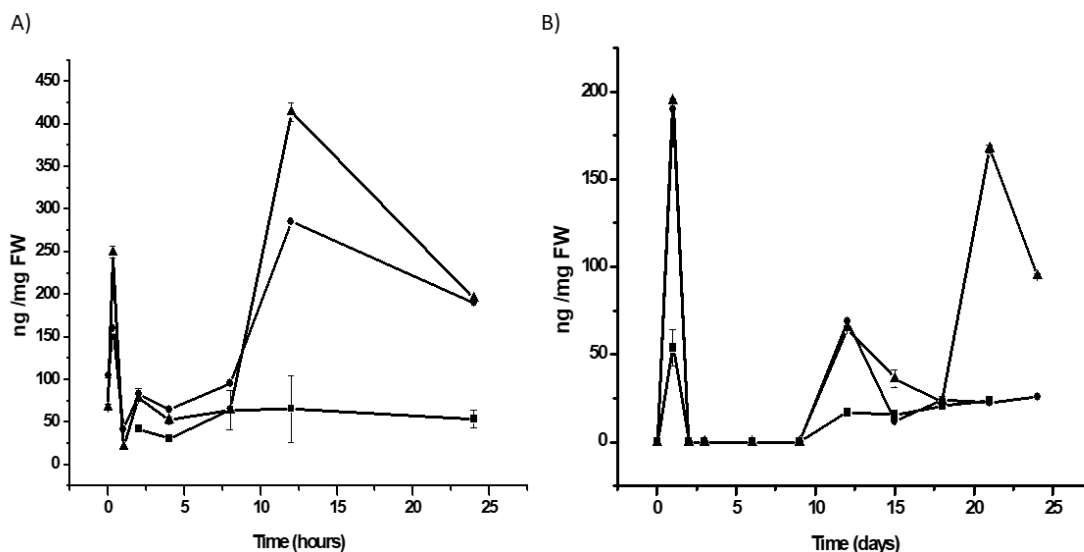


Figure 3. Time course-analysis of the salicylic acid content of habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. SA content during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 3. Análisis de curso-temporal del contenido de ácido salicílico de plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Contenido de AS durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

at this time point reflects the plant response to the viral infection. As observed with H_2O_2 , a third peak of increase of SA content was observed 21 dpi in PepGMV-Mo-inoculated plants. At this time point, the SA content in the infected plants was 3 times higher than the SA content in healthy and mock-inoculated plants (Figure 3B). The increases in SA and H_2O_2 levels in PepGMV-Mo-infected plants indicate the onset of a late (21 dpi) response corresponding to SAR.

Antioxidative enzyme activity in PepGMV-Mo-infected habanero pepper. Catalase (CAT) activity.

An increase in catalase activity was observed in PepGMV-Mo-infected habanero pepper plants. The activity of this enzyme increased gradually

del PepGMV-Mo en plantas inoculadas y con inoculación simulada. A los 30 mpi, el contenido de SA en plantas con inoculación simulada y en las infectadas con el PepGMV-Mo fue 4.0 y 6.2 veces mayor, respectivamente, que el contenido de SA en plantas testigo sanas y no inoculadas. Estos resultados indican con claridad que el aumento inicial en los niveles de SA y H_2O_2 se podían atribuir al daño mecánico causado por la inoculación por biolística. Después de este aumento inicial, se observó una reducción de ocho veces en los niveles de SA a las 8 hpi, tanto en plantas con inoculación simulada como en aquellas inoculadas con el PepGMV-Mo (Figura 3A). A 12 hpi, aumentos de 4.5 y 7.8 veces se observaron en plantas con inoculación simulada y con inoculación con el PepGMV-Mo, respectivamente, en relación con los niveles observados en plantas sanas (Figura 3A). Si bien se observaron aumentos en plantas con inoculación simulada y en

in PepGMV-Mo-infected plants, with a peak at 4 hpi. At this time point, the CAT activities in the mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants were 2.1 and 4.7 times greater, respectively, than the activity in healthy plants (Figure 4A). CAT activity subsequently decreased in PepGMV-Mo-inoculated plants and gradually increased in control plants. At 12 dpi, the CAT activities in PepGMV-Mo-inoculated, mock-inoculated and healthy plants were similar (Figure 4B), suggesting that CAT activity could be regulated by the increase in SA concentration at 8 hpi (Figure 3A).

Guaiacol peroxidase (POX) activity

Two peaks of POX activity were observed during the first 12 hpi. At the first peak at 4 hpi, POX activity was 3.3 times greater in inoculated plants than in mock-inoculated and healthy plants. At the second peak at 12 hpi, POX activity was 3.5

las inoculadas con el PepGMV-Mo, la diferencia en contenidos de SA entre ellas fue de 58%. Esta diferencia sugiere que el contenido de SA en ese momento refleja la respuesta de la planta a la infección viral. Tal como se observó con H_2O_2 , un tercer pico de aumento del contenido de SA se presentó a los 21 dpi en plantas inoculadas con PepGMV-Mo. En este momento, el contenido de SA en plantas infectadas fue tres veces mayor al contenido de SA en plantas con inoculación simulada e inoculación con PepGMV-Mo (Figura 3B). Los aumentos en los niveles de SA y H_2O_2 en plantas infectadas con PepGMV-Mo indican el inicio de una respuesta tardía (21 dpi) correspondiente a la RSA.

Actividad enzimática antioxidante en chile habanero infectada con PepGMV-Mo. Actividad de Catalasa (CAT).

Se observó un aumento en la actividad de catalasa en plantas de chile habanero infectadas con

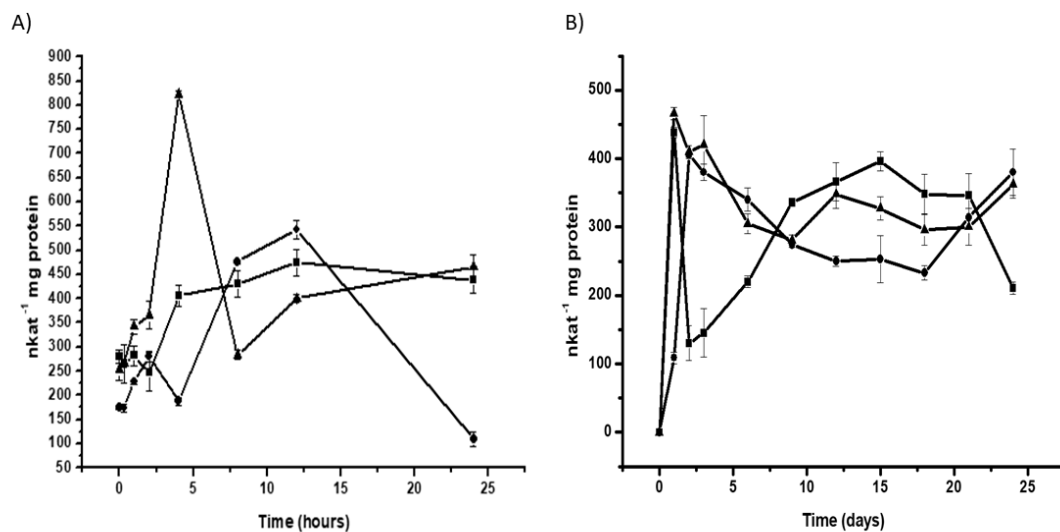


Figure 4. Time-course analysis of the specific activity of catalase in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. CAT activity during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 4. Análisis de curso-temporal de la actividad específica de catalasa en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Actividad de CAT durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

and 5.8 times greater in mock- and PepGMV-Mo-inoculated plants, respectively, compared to healthy plants (Figure 5A). The activity of this antioxidant enzyme gradually increased in PepGMV-Mo-inoculated plants over the course of the experiment. At 9 dpi, POX activity was 1.3 and 4.6 times higher in PepGMV-Mo-inoculated plants than in mock-inoculated and healthy plants, respectively (Figure 5B). At 18 dpi, POX activity was 4.7 times greater in inoculated plants than in both mock-inoculated and control plants (Figure 5B).

DISCUSSION

In the present study, we identified responses that occur both early and late after inoculation of habanero pepper with PepGMV-Mo. The development of symptoms in the present study was consistent with previous reports for the PepGMV-Mo isolate (Brown *et al.*, 2005) and all the plants

el PepGMV-Mo. La actividad de esta enzima aumentó de forma gradual en plantas infectadas con PepGMV-Mo, con un pico de aumento a las 4 hpi. En este punto, la actividad de CAT en las plantas con inoculación simulada y con inoculación con el PepGMV-Mo fueron 2.1 y 4.7 veces mayor, respectivamente, que la actividad en plantas sanas (Figura 4A). La actividad de CAT después se redujo en las plantas inoculadas con el PepGMV-Mo y aumentó en las plantas testigo. A los 12 dpi, la actividad de CAT en plantas con inoculación simulada, plantas inoculadas con el PepGMV-Mo y las plantas sanas fueron similares (Figuras 4B), lo que sugiere que la actividad de CAT podría estar regulada por el aumento en la concentración de SA a las 8 hpi (Figura 3A).

Actividad de guayacol peroxidasa (POX)

Se observaron dos picos de aumento de la actividad de POX durante las primeras 12 hpi. En el

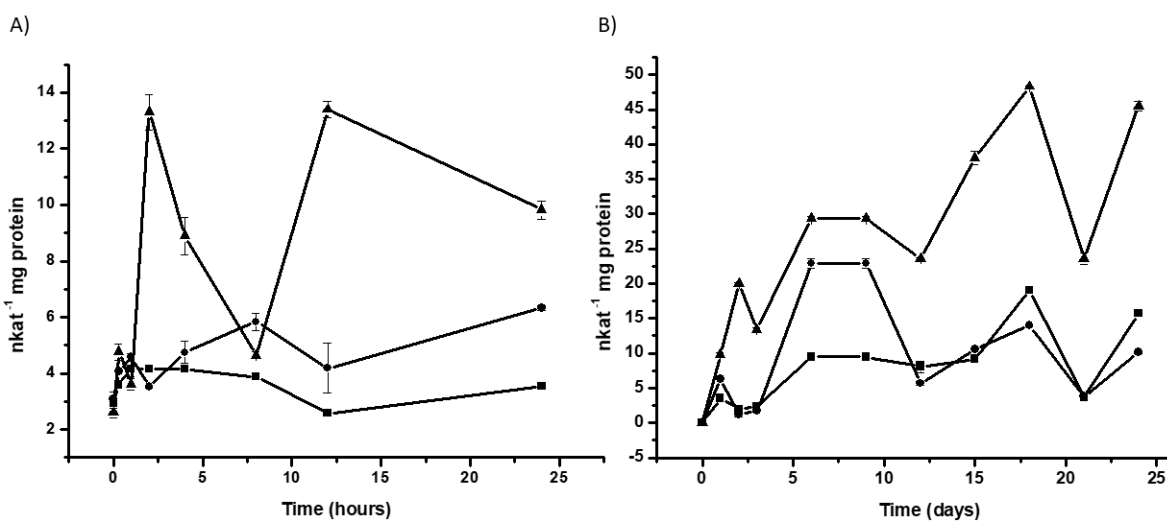


Figure 5. Time-course analysis of the specific activity of peroxidase in habanero pepper plants inoculated with PepGMV-Mo. A. POX activity during the early response after inoculation (0-24 hpi); B. Time-course experiment from 0 to 24 dpi. PepGMV-Mo-inoculated plants (p); mock-inoculated plants (l); healthy plants (n). The data are the mean values \pm SE of 24 repetitions from four independent experiments.

Figura 5. Análisis de curso-temporal de la actividad específica de peroxidasa en plantas de chile habanero inoculadas con PepGMV-Mo. A. Actividad de POX durante la respuesta temprana postinoculación (0-24 hpi); B. Experimento de curso-temporal de 0 a 24 dpi. Plantas inoculadas con PepGMV-Mo (p); plantas con inoculación simulada (l); plantas sanas (n). Los datos son los valores medios \pm SE de 24 repeticiones de cuatro experimentos independientes.

were susceptible to virus infection. However, some of the symptoms in the *in vitro* system were attenuated due to the different variables affecting these plants.

Little is known about the involvement of ROS in symptom development and pathogenesis in the context of compatible plant-virus interactions. Although a HR was not observed in PepGMV-Mo-infected plants in the present study, an oxidative burst was observed, with three major peaks of increase of H₂O₂ from 30 mpi to 24 dpi. The first peak of increase at 30 mpi was due to mechanical damage caused by biolistic inoculation. Intensive ROS production has been reported in wounded cells and cells subjected to mechanical tension (Olson and Varner, 1993), so it is not surprising that oxidative bursts occurred in all of the treatments 30 min after biolistic inoculation. In plant cell-bacterial interactions, the phase I burst is considered a biologically non-specific reaction (Wojtaszek, 1997). The second peak of increase observed 12 hpi in PepGMV-Mo-infected plants is consistent with previous reports that associate the production of ROS during phase II with a specific HR trigger in non-host resistance (Wojtaszek, 1997). Thus, the second peak of increase can be associated with the PepGMV-Mo infection, the plant response to this infection and symptom development. Previous studies, including a report about *Plum pox virus* (PPV) infection of susceptible peach plants (Hernández *et al.*, 2006), have indicated that increased ROS levels may contribute to symptom development and pathogenesis in compatible plant-virus interactions. In incompatible plant-virus interactions, ROS generation plays an important role in virus resistance. In compatible plant-virus interactions, however, little is known about the involvement of ROS in symptom development and pathogenesis. As previously reported, the generation of ROS is not sufficient to cause a

primer pico de aumento a las 4 hpi, la actividad de POX fue 3.3 veces mayor en plantas inoculadas que en aquellas con inoculación simulada o sanas. En el segundo pico de aumento a las 12 hpi, la actividad de POX fue 3.5 y 5.8 veces mayor en plantas con inoculación simulada y con las inoculadas con el PepGMV, respectivamente, en comparación con plantas sanas (Figura 5A). La actividad de esta enzima antioxidante aumentó de forma gradual en plantas inoculadas con el PepGMV-Mo en el transcurso del experimento. A los 9 dpi, la actividad de POX fue 1.3 y 4.6 veces mayor en plantas inoculadas con PepGMV-Mo que en plantas con inoculación simuladas y sanas, respectivamente (Figura 5B). A los 18 dpi, la actividad de POX fue 4.7 veces mayor en plantas inoculadas que en aquellas con inoculación simulada o plantas testigo (Figura 5B).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, identificamos respuestas que ocurren de forma temprana o de forma tardía después de la inoculación del chile habanero con el PepGMV-Mo. El desarrollo de síntomas en el presente estudio fue consistente con reportes previos del aislado PepGMV-Mo (Brown *et al.*, 2005) y todas las plantas fueron susceptibles a infecciones virales. Sin embargo, algunos de los síntomas en el sistema *in vitro* se vieron atenuados debido a las diferentes variables que afectaban a estas plantas.

Poco se sabe de la intervención de ROS en el desarrollo de síntomas y patogénesis en el contexto de interacciones compatibles planta-virus. Si bien no se observó una RH en plantas infectadas con el PepGMV-Mo en el presente estudio, sí se observó una explosión oxidativa, con tres picos de aumento principales de H₂O₂, a los 30 mpi y hasta los 24 dpi. El primer pico de aumento observado a los 30 mpi

hypersensitive reaction in compatible plant-RNA virus interactions or tissue collapse and restriction of the pathogen at the infection site (Riedle-Bauer, 2000). Similarly, our results demonstrate that in the compatible habanero pepper-PepGMV-Mo interaction, ROS production was not sufficient to confer tolerance, and the disease was able to develop further.

Exogenous SA can induce resistance to viruses even in plants lacking a resistance gene. This resistance is characterized by a decrease in virus yield and a delay in the onset of disease symptoms, and it occurs in the absence of macroscopic cell death or a hypersensitive reaction (Murphy *et al.*, 1999). This suggests that plants possess another mechanism by which SA mediates resistance to viruses. However, increased SA levels at 12 hpi did not inhibit symptom development in the habanero pepper plants infected with PepGMV-Mo *in vitro*. Our results showed that PepGMV-Mo, a DNA virus, can induce an increase in SA in a compatible interaction along with a bimodal response, as previously reported (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011). Additionally, this response can restrict the spread of certain RNA viruses in compatible infections (Murphy and Carr, 2002; Takahashi *et al.*, 2002). Markers for SA signaling, such as PR-1, are up-regulated during systemic infections by several RNA viruses (Huang *et al.*, 2005). CaMV infection, for example, was found to stimulate SA-dependent expression of PR-1, PR-2, and PR-5 in susceptible *Arabidopsis* ecotypes (Laird *et al.*, 2004). DNA viruses have also been found to stimulate SA signaling pathways in both compatible and incompatible interactions. García-Neria and Rivera-Bustamante (2011) reported two peaks of increase at day two and day five post inoculation in the levels of SA in both compatible and incompatible PepGMV infections. They showed that the kinetic of SA production was similar in both resistant and susceptible plants although

se debió al daño mecánico causado por la inoculación biolística. La producción intensiva de EOR ha sido reportado en células heridas y células sujetas a tensión mecánica (Olson y Varner, 1993), por lo que no sorprende que explosiones oxidativas ocurrieran en todos los tratamientos a los 30 min después de la inoculación biolística. En interacciones célula vegetal-bacteria, la fase I de la explosión es considerada una reacción biológicamente no específica (Wojtaszek, 1997). El segundo pico de aumento, observado 12 hpi en plantas infectadas con el PepGMV-Mo, es consistente con reportes previos que asocian la producción de ROS durante la fase II con un disparador de la RH en la resistencia de plantas no hospederas (Wojtaszek, 1997). Así, el segundo pico de aumento puede asociarse con la infección del PepGMV-Mo, con la respuesta de la planta a esta infección y al desarrollo de síntomas. Estudios anteriores, incluyendo un reporte acerca de la infección por *Plum pox virus* (PPV) de plantas de durazno susceptibles (Hernández *et al.*, 2006), indican que niveles altos de ROS pueden contribuir al desarrollo de síntomas y patogénesis en interacciones planta-virus compatibles. En interacciones planta-virus incompatibles, la generación de ROS juega un importante papel en la resistencia al virus. Sin embargo, en interacciones planta-virus compatibles, poco se sabe de la intervención de ROS en el desarrollo de síntomas y en la patogénesis. Previamente se reportó que la generación de ROS no es suficiente para causar una reacción hipersensible en interacciones planta-virus compatibles o el colapso de tejidos y la restricción del patógeno en el sitio de infección (Riedle-Bauer, 2000). De manera similar, los resultados del presente estudio demuestran que en la interacción de chile habanero-PepGMV-Mo compatibles, la producción de ROS no fue suficiente para conferir tolerancia y la enfermedad se pudo desarrollar.

El SA exógeno puede inducir resistencia a virus, incluso en plantas que no poseen un gen de

the concentration on resistant plant was two to three fold higher in inoculated infected tissue. In systemic infected tissue, they observed a bimodal response too, however, in systemic infected tissue, levels of SA were lower than in inoculated infected tissue. Susceptible plants showed two peaks of increase in SA content at day five and day 10-post inoculation. In our work we used susceptible plants in the experiments. In our study, two SA peaks of increase in systemic infected tissue were observed, the first at 12 hpi and the second at 21 dpi. These results were similar to the results find by Garcia-Neria and Rivera-Bustamante (2011), with one peak of increase in the first days after the virus inoculation in susceptible plants and other peak of increase at the end of the time course experiment. Our results suggest that SAR is involved in the compatible interaction between PepGMV-Mo and habanero pepper; however, it was not sufficient to confer resistance to the pepper plants.

Our findings also indicate an interaction between H_2O_2 and SA that results in a self-amplifying system for plant defense: H_2O_2 induces SA accumulation, and SA enhances the levels of H_2O_2 (Van Camp *et al.*, 1998). The increase observed in SA levels 12 hpi in PepGMV-Mo-infected plants was accompanied by increased in H_2O_2 levels. This relationship was confirmed at 21 dpi in infected plants, when an increase in H_2O_2 levels co-occurred with an increase in SA content.

Plants react to virus infections with an upregulation of radical scavenging enzymes, such as SODs, catalases, and peroxidases (Riedle-Bauer, 2000). In plants, the main enzymatic H_2O_2 scavenger of photosynthetic cells is CAT, which converts H_2O_2 into H_2O and O_2 (Quan *et al.*, 2008). An early increase in CAT activity was observed in the compatible interaction between PepGMV-Mo and habanero pepper plants, resulting in an activity level 2 times greater than that of the control at 4

resistencia. Esta resistencia se caracteriza por una reducción en la infectividad del virus y un retraso en el inicio de los síntomas, además de que ocurre en la ausencia de la muerte celular macroscópica o de una reacción hipersensible (Murphy *et al.*, 1999). Esto sugiere que las plantas poseen otro mecanismo por el cual el SA media en la resistencia a los virus. Sin embargo, los niveles mayores de SA a 12 hpi no inhibieron el desarrollo de síntomas en las plantas *in vitro* de chile habanero infectadas con el PepGMV-Mo. Los resultados del presente estudio demostraron que el PepGMV-Mo, un virus de ADN, puede inducir un aumento en SA en una interacción compatible junto con una respuesta bimodal, como ya ha sido reportado (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011). Además, esta respuesta puede restringir la propagación de ciertos virus de ARN en infecciones compatibles (Murphy y Carr, 2002; Takahashi *et al.*, 2002). Los marcadores para la señalización del SA, como el PR-1, son sobre-regulados durante las infecciones sistémicas por varios virus de ARN (Huang *et al.*, 2005). Se encontró que la infección por el CaMV, por ejemplo, estimulaba la expresión dependiente de SA de PR-1, PR-2 y PR-5 en ecotipos susceptibles de Arabidopsis (Laird *et al.*, 2004). También se ha encontrado que los virus de ADN estimulan vías de señalización mediadas por el SA, tanto en interacciones compatibles como incompatibles. Garcia-Neria y Rivera-Bustamante (2011) reportaron dos picos de aumento en los días dos y cinco post-inoculación en los niveles de SA en infecciones de PepGMV tanto compatibles como incompatibles. Estos investigadores demostraron que la cinética de la producción de SA era similar, tanto en plantas resistentes como susceptibles, aunque la concentración en la planta resistente era de dos a tres veces mayor en tejidos infectados. En el tejido infectado sistémico, también observaron una respuesta bimodal, aunque en el tejido sistémico infectado, los niveles de AS

hpi. After this peak, CAT activity was similar to that of control plants. Our results are in contrast to previously reported decreases in catalase activity in *Phaseolus vulgaris* infected with WCIMV and tobacco infected with TMV (Chen *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 2002; Neuenschwander *et al.*, 1995). In cucumber plants inoculated with *Cucumber mosaic virus* (CMV), CAT activity was unaffected (Riedle-Bauer, 1998). The decrease in CAT activity after 4 hpi may have led to the observed increase in H₂O₂ levels and the induction of SAR (Neuenschwander *et al.*, 1995).

Increased POX activity in disease development has been correlated with resistance expression, although increased activity has also been reported in hosts that permit systemic infection (Kozłowska *et al.*, 2001; Riedle-Bauer, 2000). In the present study, peroxidase activity increased throughout the duration of the experiment. A previous study by Milavec *et al.* (2008) demonstrated that in the early period following inoculation of potato plants with *Potato virus Y* (PVY), the virus induced an increase of two times in soluble, ionically-bound and covalently-bound POXs activities, in both tolerant and resistant plants at 3 hpi, while in susceptible plants the POX activity decreased in the early period and the increase was not observed before 24 hpi. In contrast with this last observation, in our work, in susceptible plants infected with PepGMV-Mo, the first increase in POX activity was observed 2 hpi compared to mock inoculation and healthy plants, similar to the results obtained in potato plants tolerant and resistant to the PVY (Milavec *et al.*, 2008). It was reported that in mock-inoculated potato plants susceptible to PTY^{NTN}, soluble and ionically-bound peroxidases decreased in relation to intact plants. The authors proposed that these effects could be the result of injury and due to the effect of substances present in the sap of healthy plants (Milavec *et al.*, 2001). In contrast, we observed that

fueron menores que en el tejido infectado inoculado. Las plantas susceptibles presentaron dos picos de aumento en el contenido de SA en los días 5 y 10 post-inoculación. En el presente trabajo se usaron plantas susceptibles para los experimentos. En este estudio se observaron dos picos de aumento de SA, el primero a las 12 hpi y el segundo, a los 21 dpi. Estos resultados fueron similares a los resultados obtenidos por Garcia-Neria y Rivera-Bustamante (2011), con un pico de aumento en los primeros días después de la inoculación con el virus en plantas susceptibles y otro pico de aumento al final del curso temporal del experimento. Nuestros resultados sugieren que la RSA está involucrada en la interacción compatible entre PepGMV-Mo y el chile habanero, aunque no fue suficiente para conferir resistencia a las plantas de chile.

Nuestros hallazgos también indican una interacción entre el H₂O₂ y el SA, que resulta en un sistema autoamplificante para la defensa de las plantas: el H₂O₂ induce la acumulación de SA, y éste aumenta los niveles de H₂O₂ (Van Camp *et al.*, 1998). El aumento en los niveles observados de SA a las 12 hpi en plantas infectadas con PepGMV-Mo estuvo acompañado de aumentos en los niveles de H₂O₂. Esta relación fue confirmada a los 21 dpi en plantas infectadas, cuando un aumento en los niveles de H₂O₂ ocurrió de forma simultánea con un aumento en el contenido de SA.

Las plantas reaccionan a las infecciones virales con una sobrerregulación de enzimas depuradoras de radicales libres, como SODs, catalasas y peroxidases (Riedle-Bauer, 2000). En las plantas, el principal depurador enzimático de H₂O₂ de células fotosintéticas es la CAT, que convierte al H₂O₂ en H₂O y O₂ (Quan *et al.*, 2008). Se observó un aumento temprano en la actividad de CAT en la interacción compatible entre PepGMV-Mo y las plantas de chile habanero, lo cual resultó en un nivel de actividad 2 veces mayor al del testigo a las 4 hpi. Tras este

total POX activity increases in mock-inoculated, in relation to healthy plants. These differences could be due to the use of different mock inoculation. In the Milavec *et al.* (2001) report, they used healthy plant's sap as mock inoculation and we used the Bluescript cloning vector as mock inoculation. This last treatment does not contain the substances present in the sap that could inactivate the POX activity. Riedle-Bauer (2000) reported that in susceptible plants of *Cucumis sativa* and *Cucurbita pepo* infected with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), total POX activity increased 14 and six times in infected plants 20 dpi, respectively, in systemic leaves displayed viral symptoms, with an increase in H₂O₂ accumulation. Similar results were obtained in our work. POX activity in systemic leaves continued to increase through the time course experiment, with a higher activity observed between 18 to 24 dpi. This POX activity increase was related with an increase in H₂O₂ accumulation at 24 dpi. These results suggest that total peroxidase activity are involved in H₂O₂ production during plant-virus interactions (Riedle-Bauer, 2000). Peroxidases have long been postulated to produce H₂O₂ (Milavec *et al.*, 2008; Elstner and Heupel, 1976). More recently, cell wall peroxidases have been found to be responsible for some, if not all, of the H₂O₂ produced in the oxidative burst (Hernández *et al.*, 1993; Bestwick *et al.*, 1997; Bolwell *et al.*, 1995). Taken together, our data indicate that increased of antioxidant defense is not enough to confer resistance or tolerance to habanero pepper plants in the compatible interaction with PepGMV-Mo and that the symptoms observed may be related to this increase. How the increases in H₂O₂, SA, and POX activity at 21 dpi are related to symptom remission will require further investigation, preferably in an *in vivo* system.

pico, la actividad de CAT fue similar a la de las plantas testigo. Nuestros resultados contrastan con las reducciones ya reportadas para la actividad de la catalasa en *Phaseolus vulgaris* infectado con el WCIMV y en tabaco infectado con el TMV (Chen *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 2002; Neuenschwander *et al.*, 1995). En plantas de pepino inoculadas con *Cucumber mosaic virus* (CMV), la actividad de CAT no fue afectada (Riedle-Bauer, 1998). La reducción de CAT después de 4 hpi puede haber conducido al aumento observado en niveles de H₂O₂ y la inducción de RSA (Neuenschwander *et al.*, 1995).

El aumento en la actividad de las POX en el desarrollo de la enfermedad se ha correlacionado con la expresión de resistencia, aunque también se ha reportado un aumento de actividad en hospedantes que permiten la infección sistémica (Kozłowska *et al.*, 2001; Riedle-Bauer, 2000). En el presente estudio, la actividad de la peroxidasa aumentó a lo largo del experimento. Un estudio previo, realizado por Milavec *et al.* (2008), demostró que en el periodo temprano, después de la inoculación de plantas de papa con *Potato virus Y* (PVY), el virus indujo un aumento de dos veces en la actividad de las POX solubles, POX unidas iónicamente y POX unidas covalentemente a las 3 hpi, mientras que en plantas susceptibles, la actividad de las POX disminuyó en el periodo temprano y el aumento no se observó antes de las 24 hpi. En contraste con esta última observación, en el presente trabajo, en las plantas susceptibles infectadas con PepGMV-Mo, el primer aumento en la actividad de POX se observó a las 2 hpi en comparación con la inoculación simulada y con plantas sanas, similar a los resultados obtenidos para plantas de papa tolerantes y resistentes al PVY (Milavec *et al.*, 2008). Previamente se reportó que en plantas de papa con inoculación simulada y susceptibles a PTY^{NTN}, las peroxidases solubles y las unidas iónicamente disminuyeron en relación

CONCLUSIONS

Our *in vitro* results demonstrate that habanero pepper plants respond to the compatible virus PepGMV-Mo by activating the synthesis and accumulation of H₂O₂ and SA and increasing the activity of CAT and POX. Furthermore, the SAR pathway was activated but insufficient to confer resistance to the habanero pepper plants.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank CONACyT for Grant #106105 and for the doctoral scholarship awarded to Cristina Aguilar-Sánchez. We also thank Dr. Rafael Rivera-Bustamante for providing us with the infectious clones of PepGMV, Dr. Rosa Maria Escobedo-Gracia Medrano for her critical comments, and M.C. Miriam Monforte-González for her technical support.

LITERATURE CITED

- Baebler S, Witek K, Petek M, Stare K, Tusek-Znidaric M, Pompe-Novak M, Renaut J, Szajko K, Strzelczyk-Żyta D, Marczewski W, Morgiewicz K, Gruden K and Hennig J. 2014. Salicylic acid is an indispensable component of the Ny-1 resistance-gene-mediated response against *Potato virus Y* infection in potato. *Journal of Experimental Botany* 65 (4): 1095-1109. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert447>.
- Barboza N, Blanco-Meneses M, Esker P, Moriones E and Inoue-Nagata AK. 2018. Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica. *Annals of Applied Biology* 172 (1): 20-32. <https://doi.org/10.1111/aab.12398>.
- Berg BM and Huystee RB. 1984. Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase from petunia. *Physiologia Plantarum* 60 (3): 299-304. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06066.x>.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH and Mansfield JW. 1997. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9 (2): 209-221. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.2.209>.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR and Zimmerlin A. 1995. The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23:517-532. <https://doi.org/10.3109/10715769509065273>.
- Brown JK, Idris AM, Ostrow KM, Goldberg N, French R and Stenger DC. 2005. Genetic and phenotypic variation of the *Pepper golden mosaic virus* complex. *Phytopathology* 95 (10):1217-1224. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>.
- con las plantas intactas. Los autores propusieron que estos efectos pudieran ser el resultado de lesiones y del efecto de sustancias presentes en la savia de plantas sanas (Milavec *et al.*, 2001). En contraste, se observó que la actividad total de las POX aumenta en plantas con inoculación simulada en relación con plantas sanas. Estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes inoculaciones simuladas. En el reporte de Milavec *et al.* (2001) usaron la savia de la planta sana como inoculación simulada y en este trabajo usamos el vector de clonación Bluescript como inoculación simulada. Este último tratamiento no contiene las sustancias presentes en la savia que podrían desactivar la actividad de las POX. Riedle-Bauer (2000) reportó que en las plantas susceptibles de *Cucumis sativa* y *Cucurbita pepo* infectadas con el *Cucumber mosaic virus* (CMV) y el *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), la actividad total de POX aumentó 14 y 6 veces en plantas a los 20 dpi, respectivamente, mientras que las hojas sistémicas presentaron síntomas virales, con un aumento en la acumulación de H₂O₂. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares. La actividad de POX en hojas sistémicas continuó en aumento a lo largo del curso temporal del experimento, con una mayor actividad observada entre los 18 y 24 dpi. Este aumento en la actividad de POX se relacionó con un aumento en la acumulación de H₂O₂ a 24 dpi. Estos resultados sugieren que la actividad total de las peroxidasas está involucrada en la producción de H₂O₂ durante las interacciones planta-virus (Riedle-Bauer, 2000). Desde hace mucho tiempo se ha sugerido que las peroxidasas producen H₂O₂ (Milavec *et al.*, 2008; Elstner y Heupel, 1976). Más recientemente se encontró que las peroxidasas de las paredes celulares son responsables de al menos parte del H₂O₂ producido en la explosión oxidativa (Hernández *et al.*, 1993; Bestwick *et al.*, 1997; Bolwell *et al.*, 1995). Tomados de manera conjunta, los datos obtenidos

- Carrillo-Tripp J, Lozoya-Gloria E and Rivera-Bustamante RF. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 97 (1): 51-59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>.
- Clark D, Durner J, Navarre D and Klessig D. 2007. Nitric Oxide inhibition of tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13 (12): 1380-1384. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1380>.
- Clarke SF, Guya PL, Burritta DJ and Jameson PE. 2002. Changes in the activities of antioxidant enzymes in response to virus infection and hormone treatment. *Physiologia Plantarum* 114 (2): 157-164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1140201.x>.
- Cheeseman J. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* 57 (10): 2435-2444. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl004>.
- Chen Z, Silva H and Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262 (5141): 1883-1886. <http://doi.org/10.1126/science.8266079>.
- Chivasa S, Murphy AM, Naylor M and Carr JP. 1997. Salicylic acid interferes with *Tobacco mosaic virus* replication via a novel Salicylhydroxamic acid-sensitive mechanism. *Plant Cell* 9 (4): 547-557. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.547>.
- Dempsey DA and Klessig DF. 1995. Signals in plant disease resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 93 (3): 167-186. [https://doi.org/10.1016/0020-2452\(96\)81488-6](https://doi.org/10.1016/0020-2452(96)81488-6).
- Echevarría-Machado I, Sánchez-Cach LA, Hernández-Zepeda C, Rivera-Madrid R and Moreno-Valenzuela OA. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissue. *Molecular Biotechnology* 31 (2): 129-136. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>.
- Elstner EF and Heupel A. 1976. Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130 (1): 175-180. <https://doi.org/10.1007/BF00384416>.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H and Ryals J. 1993. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261 (5122): 754-756. <http://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>.
- García-Neria MA and Rivera-Bustamante RF. 2011. Characterization of *Geminivirus* resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24 (2): 172-182. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-10-0126>.
- Hernández-Espinal LA, Enríquez-Verdugo I, Melgoza-Villagómez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Félix S, Linares-Flores PJ and Garzón-Tiznado JA. 2018. Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Fitotecnia Mexicana* 41(2): 149-157. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.149-157>.
- Hernández JA, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA and Sevilla F. 1993. Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum* 89 (1): 103-110. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01792.x>.

indican que los aumentos en las defensas antioxidantes no son suficientes para conferir resistencia o tolerancia para las plantas de chile habanero en la interacción compatible con PepGMV-Mo y que los síntomas observados podrían estar relacionados con este aumento. La manera en que los aumentos en la actividad de H₂O₂, SA y POX a los 21 dpi se relacionan con la remisión de síntomas requerirá de más investigación, de preferencia en un sistema *in vivo*.

CONCLUSIONES

Los resultados *in vitro* demuestran que las plantas de chile habanero responden al virus compatible PepGMV-Mo al activar la síntesis y acumulación de H₂O₂ y SA y al aumentar la actividad de CAT y POX. Asimismo, la vía de RSA se activó pero es insuficiente para conferir resistencia a las plantas de chile habanero.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACyT por la Beca de doctorado #106105 y por la beca de doctorado entregada a Cristina Aguilar-Sánchez. Nuestros agradecimientos también para el Dr. Rafael Rivera-Bustamante por donarnos los clones infecciosos de PepGMV, a la Dra. Rosa María Escobedo-Gracia Medrano por sus comentarios críticos y a la M.C. Miriam Monforte-González por su apoyo técnico.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

Hernández JA, Díaz-Vivancos P, Rubio M, Olmos E, Ros-Barceló A and Martínez-Gómez P. 2006. Long-term *Plum pox virus* infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot *Prunus armeniaca*, cultivar but not in a resistant cultivar. *Physiologia Plantarum* 126 (1): 140-152. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00581.x>.

- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007a. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. *Plant Pathology* 56 (5): 763-770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01652.x>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007b. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. *Virus Genes* 35 (3): 825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Huang ZL, Yeakley JM, García EW, Holdridge JD, Fan JB and Whitham SA. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiology* 137 (3): 1147-1159. <https://doi.org/10.1104/pp.104.056028>.
- Idris AM, Smith SE and Brown JK. 2001. Ingestion, transmission and persistence of *Chino del Tomate virus* (CdTV), a New World begomovirus, by Old and New World biotypes of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. *Annals of Applied Biology* 139 (1): 145-154. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00139.x>.
- Inamine GS and Baker JE. 1989. A catalase from tomato fruit. *Phytochemistry* 28 (2): 345-348. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80010-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80010-X).
- Quan LJ, Zhang B, Shi WW and Li HY. 2008. Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *Journal of Integrated Plant Biology* 50 (1): 2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00599.x>.
- Klessig DF, Choi HW and Dempsey DA. 2018. Systemic acquired resistance and salicylic acid: past, present, and future. *Molecular Plant Microbe Interaction* 31 (9):871-888.
- Kozłowska M, Fryder K and Wolko B. 2001. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Dymellia applanata* (Niessl/Sacc.). *Acta Physiologiae Plantarum* 23 (3): 303-310. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0037-6>.
- Laird J, Armengaud P, Giuntini P, Laval V and Milner JJ. 2004. Inappropriate annotation of a key defense marker in Arabidopsis: will the real PR-1 please stand up? *Planta* 219 (6): 1089-1092. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1355-x>.
- Lukan T, Baebler S, Pompe-Novak M, Guček K, Zagorščak M, Coll A and Gruden K. 2018. Cell death is not sufficient for the restriction of *Potato virus Y* spread in hypersensitive response-conferred resistance in potato. *Frontiers in Plant Science* 9:1-12 <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00168>.
- Mandal S, Kumar Das R and Mishra S. 2011. Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (2): 117-223. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.10.006>.
- Mayers CN, Lee KC, Moore CA, Wong SM and Carr JP. 2005. Salicylic acid induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in Squash and *Arabidopsis thaliana*: Contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 18 (5): 428-434. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-0428>.
- Mejía-Teniente L, Durán-Flores BA, Torres-Pacheco I, González-Chavira MM, Rivera-Bustamante RF, Feregrino-Pérez AA, Pérez-Ramírez I, Rocha-Guzmán NE, Reynoso-Camacho R and Guevara-González RG. 2019. Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annum* L.) against Pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 106: 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.008>.
- Méndez-Lozano J, Rivera-Bustamante RF, Fauquet CM and De la Torre-Almaráz R. 2001. *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus* are Geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Disease* 85 (12): 1291. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.12.1291A>.
- Miguel E, Poza-Carrión C, López-Solanilla E, Aguilar I, Llama-Palacios A, García-Olmedo F and Rodríguez-Palenzuela P. 2000. Evidence against a direct antimicrobial role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13 (4): 421-429. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.421>.
- Milavec M, Gruden K, Ravnikar M and Kovač M. 2008. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by *Potato virus Y*. *Plant Pathology* 57 (5): 861-869. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01833.x>.
- Milavec M, Ravnikar M and Kovac M. 2001. Peroxidases and photosynthetic pigments in susceptible potato infected with *Potato virus Y<sup>NTN</sup>*. *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (10): 891-898. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01303-1](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01303-1).
- Murphy AM and Carr JP. 2002. Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. *Plant Physiology* 128 (2): 552-563. <https://doi.org/10.1104/pp.010688>.
- Murphy AM, Chivasa S, Singh DP and Carr JP. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends in Plant Science* 4 (4): 155-160. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01390-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01390-4).
- Nakhla MK, Sorensen A, Mejía L, Ramirez P, Karkashian JP and Maxwell DP. 2005. Molecular characterization of tomato infecting Begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Horticulture* 695 (31): 277-288. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.31>.
- NCBI. 2021. National Center for Biotechnology Information. [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).
- Neuenschwander U, Verooij L, Friedich S, Uknes H and Kessmann Ryals J. 1995. Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant Journal* 8 (2): 227-233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.08020227.x>.
- Olson PD and Varner JE 1993. Hydrogen peroxide and lignifications. *Plant Journal* 4 (5): 887-892. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04050887.x>.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S and Klessig D. 2007. Methyl Salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318 (5847): 113-116. <http://doi.org/10.1126/science.1147113>.

- Peterson G. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al*, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 83 (2): 346-356. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).
- Riedle-Bauer M. 1998. Activities of antioxidant enzymes in cucumber plants infected with *Cucumber mosaic virus*. *Phyton* 38 (1): 149–157. [https://www.zobodat.at/pdf/PHY\\_38\\_1\\_0149-0157.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/PHY_38_1_0149-0157.pdf).
- Riedle-Bauer M. 2000. Role of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in systemic virus infections of plants. *Journal of Phytopathology* 148 (5): 297-302. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00503.x>.
- Rodrigues-Alencar MS, Da Silva-Solino AJ, Batista-Oliveira JS, Pascholati SJ and Freitas-Schwan-Estrada KR. 2020. Induction of defense mechanisms in tomato plants by saprobic fungi filtrates against early blight disease. *Revista Caatinga* 33 (3): 671– 678. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n310rc>.
- Rodríguez-Negrete EA, Carrillo-Tripp J and Rivera-Bustamante RF. 2009. RNA Silencing against Geminivirus: complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology* 83 (3): 1332-1340. <https://doi.org/10.1128/JVI.01474-08>.
- Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y and Dinesh-Kumar SP. 2002. RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to *Cucumber mosaic virus* requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant Journal* 32 (5): 655–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01453.x>.
- Uknes S, Winter AM, Delaney T, Vernooij B, Morse A, Friedrich L, Nye G, Potter S, Ward E and Ryals J. 1993. Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6 (6): 692-698. [https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1993Articles/Microbe06\\_692.pdf](https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1993Articles/Microbe06_692.pdf).
- Van Camp W, Van Montagu M and Inzé D. 1998. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Science* 3 (9): 330-334. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01297-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01297-7).
- Wohlgemuth H, Mittelstrass K, Kschieschan S, Bender J, Weigel HJ, Overmyer K, Kangasjärvi J, Sandermann H and Langebartels C. 2002. Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell and Environment* 25 (6): 717-726. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00859.x>.
- Wojtaszek P. 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense response. *Acta Physiologiae Plantarum* 19 (4): 581-589. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11738-997-0057-y.pdf>.