

# GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 INOCULADO CON *Phytophthora capsici*

Ernesto Fernández-Herrera, Reyna I. Rojas-Martínez, Olga Gómez-Rodríguez, Lorenzo Guevara-Olvera, María Esther Rivas-Dávila, Ernestina Valadez-Moctezuma y Emma Zavaleta-Mejía

## RESUMEN

Con la finalidad de aportar información de los mecanismos que restringen la colonización y reproducción de *Phytophthora capsici* en raíces de chile CM-334 resistente al oomiceto, el presente estudio tuvo por objetivos: 1) comparar la acumulación de transcritos de los genes POX (peroxidasa), GLU ( $\beta$ -1,3 glucanasa), PR-1 (proteína PR1) y EAS (5-epi-aristolóqueno sintasa); y 2) comparar la actividad enzimática total de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol, en raíces de chile CM-334 inoculadas y no inoculadas con el oomiceto. En las raíces de CM-334 inoculadas con *P. capsici* se incrementaron de manera significativa los niveles relativos de POX, GLU y PR-1 desde las 6h posteriores a la inoculación (hpi), y los mayores incrementos (15,4; 10,1 y 8,5 veces, respectivamente)

se registraron a las 48 hpi en comparación con las plantas no inoculadas. EAS se incrementó considerablemente desde las 6 hpi (16,3 veces), pero a diferencia de los otros genes la máxima acumulación (23 veces) se registró a las 12 hpi. La actividad de glucanasas y peroxidasas se incrementó a medida que transcurrió el tiempo posterior a la inoculación con el oomiceto y para ambas enzimas el incremento de su actividad fue significativo ( $P \leq 0,05$ ) a las 12, 24 y 48 hpi. El contenido de capsidiol en plantas CM-334 inoculadas fue significativamente mayor ( $P \leq 0,05$ ) respecto a las plantas no inoculadas; los incrementos fueron de 69,7; 165,1; 259,1 y 386,7% a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente.

## Introducción

En México, el chile (*Capsicum annum* L.) es una especie hortícola de gran importancia económica y social. Sin embargo, un factor limitante en la productividad del cultivo es la marchitez causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo. (González *et al.*, 2004). El control se ha realizado mediante prácticas culturales y el empleo de fungicidas sintéticos; no obstante, se considera que el uso de variedades resistentes representa una estrategia amigable con el ambiente para

el manejo de esta enfermedad y de otras inducidas por fitopatógenos con origen en el suelo (Pérez *et al.*, 1990). La línea Criollo de Morelos 334 (CM-334) del chile tipo serrano, es altamente resistente al oomiceto y su resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más virulentas (Bonnet *et al.*, 2007; Kim y Kim, 2009) y actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Oelke *et al.*, 2003; Glosier *et al.*, 2008).

Las plantas, como resultado del proceso de coevolución

con sus patógenos, han desarrollado diferentes mecanismos de defensa contra ellos, tanto de tipo constitutivo como inducido. Los mecanismos constitutivos incluyen barreras físicas (como la cutícula y la pared celular) y compuestos tóxicos preexistentes que inhiben el crecimiento del patógeno. Los inducidos se disparan en el momento en que el patógeno intenta invadir al hospedante y consisten en la formación de barreras físicas (como capas de corcho y deposición de calosa, entre otras), la acumu-

lación de compuestos tóxicos como las fitoalexinas y producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), todo lo anterior como resultado de la activación de la expresión de genes. En algunos casos la planta presenta una respuesta de hipersensibilidad (RH), la cual es considerada la máxima expresión de resistencia (Fernández *et al.*, 1998; Sepúlveda *et al.*, 2003). Todas las plantas, tanto susceptibles como resistentes, poseen dichos mecanismos, y la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno

**PALABRAS CLAVE /** *Capsicum annum* / Capsidiol / EAS / Genes de Defensa /  $\beta$ -1,3 Glucanasas / Peroxidasa / *Phytophthora capsici* / Proteína PR-1 / Proteínas Relacionadas con Patogénesis /

Recibido: 31/01/2011. Modificado: 19/03/2012. Aceptado: 23/03/2012.

**Ernesto Fernández-Herrera.** Maestro en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo (UACH), México. Doctor en Ciencias en Fitopatología, Colegio de Postgraduados (COLPOS), México. Posdoctorante, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIDIR-IPN), Sinaloa, México.  
**Reyna I. Rojas Martínez.** Doctora en Ciencias en Fitopatología,

COLPOS. Profesora Investigadora, COLPOS, México.  
**Olga Gómez Rodríguez.** Doctora en Ciencias en Fitopatología, COLPOS, México. Investigadora, COLPOS, México.  
**Lorenzo Guevara Olvera.** Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Profesor Investi-

gador, Instituto Tecnológico de Celaya, México.  
**María Esther Rivas Dávila.** Ph.D. en Fitopatología, Auburn University, EEUU. Gerente, Bidases, Productora y Comercializadora de Semillas, S.A. de C. V. Celaya, México.  
**Ernestina Valadez Moctezuma.** Doctora en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesora Investigadora, UACH, México.

**Emma Zavaleta-Mejía.** Ph.D. en Fitopatología, University of California, Riverside, EEUU. Profesora Investigadora, COLPOS. Dirección: Km. 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, C. P. 56230, México. e-mail: zavaleta@colpos.mx

## DEFENSE GENES, ENZYMATIC ACTIVITY AND CAPSIDIOL CONTENT IN CM-334 CHILLI PEPPER INOCULATED WITH *Phytophthora capsici*

Ernesto Fernández-Herrera, Reyna I. Rojas-Martínez, Olga Gómez-Rodríguez, Lorenzo Guevara-Olvera, María Esther Rivas-Dávila, Ernestina Valadez-Moctezuma and Emma Zavaleta-Mejía.

### SUMMARY

In order to provide information about the mechanisms that restrict colonization and reproduction of *Phytophthora capsici* in roots of CM-334 chilli pepper resistant to the oomycete, the present study aimed 1) to compare the accumulation of POX (peroxidase), GLU ( $\beta$ -1,3 glucanase), PR-1 (PR1 protein) and EAS (5-*epi*-aristolochene synthase) gene transcripts, and 2) to compare the total enzymatic activity of peroxidases and glucanases, and the total capsidiol content, in roots of CM-334 pepper inoculated or not with the oomycete. In CM-334 pepper roots inoculated with *P. capsici* the relative levels of POX, GLU and PR-1 were significantly increased from 6h post-inoculation (hpi), and the largest increases in compari-

son with the non-inoculated plants (15.4, 10.1 and 8.5 times, respectively) were recorded at 48hpi. EAS increased considerably from 6hpi (16.3 times), but in contrast to the other genes the accumulation maximum (23 times) was observed at 12hpi. The activity of glucanases and peroxidases increased as time after oomycete inoculation progressed and for both enzymes the increase was significant ( $P \leq 0.05$ ) at 12, 24 and 48hpi. The capsidiol content of inoculated CM-334 plants was significantly higher ( $P \leq 0.05$ ) with respect to non-inoculated plants, with increments of 69.7, 165.1, 259.1 and 386.7% at 6, 12, 24 and 48 hpi, respectively.

## GENS DE DEFESA, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CONTEÚDO DE CAPSIDIOL NA PIMENTA CM-334 INOCULADA COM *Phytophthora capsici*

Ernesto Fernández-Herrera, Reyna I. Rojas-Martínez, Olga Gómez-Rodríguez, Lorenzo Guevara-Olvera, María Esther Rivas-Dávila, Ernestina Valadez-Moctezuma e Emma Zavaleta-Mejía.

### RESUMO

Com a finalidade de aportar informação dos mecanismos que restringem a colonização e reprodução de *Phytophthora capsici* em raízes de pimenta CM-334 resistente ao oomiceto, o presente estudo teve por objetivos: 1) comparar a acumulação de transcritos dos genes POX (peroxidase), GLU ( $\beta$ -1,3 glucanase), PR-1 (proteína PR1) e EAS (5-*epi*-aristolocheno sintase); e 2) comparar a atividade enzimática total de peroxidases e glucanases, e o conteúdo de capsidiol, em raízes de chile CM-334 inoculadas e não inoculadas com o oomiceto. Nas raízes de CM-334 inoculadas com *P. capsici* se incrementaram de maneira significativa os níveis relativos de POX, GLU e PR-1 desde as 6h posteriores à inoculação (hpi), e os maiores incre-

mentos (15,4; 10,1 e 8,5 vezes, respectivamente) se registraram às 48 hpi em comparação com as plantas não inoculadas. EAS se incrementou consideravelmente desde as 6 hpi (16,3 vezes), mas a diferença dos outros genes a máxima acumulação (23 vezes) se registrou às 12 hpi. A atividade de glucanases e peroxidases se incrementou a medida que transcorreu o tempo posterior à inoculação com o oomiceto e para ambas enzimas o incremento de sua atividade foi significativo ( $P \leq 0,05$ ) às 12, 24 e 48 hpi. O conteúdo de capsidiol em plantas CM-334 inoculadas foi significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ) em relação às plantas não inoculadas; os incrementos foram de 69,7; 165,1; 259,1 e 386,7% às 6, 12, 24 e 48 hpi, respectivamente.

está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos que forman barreras físicas y químicas que restringen el crecimiento y reproducción del patógeno (Silvar *et al.*, 2008).

En el caso particular de materiales de Chile resistentes a *P. capsici*, la evidencia experimental hasta ahora generada indica que su resistencia al

oomiceto puede explicarse por diferentes mecanismos que involucran: incrementos en la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3 glucanasa (Egea *et al.*, 1999), fenil alanina amonio liasa (PAL) y peroxidases ácidas; cambios en compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Candela *et al.*, 1995; Fernández, 1997); e incremento en la síntesis de la fitoalexina capsidiol (Egea *et al.*, 1996a). Además de los transcritos de la PR  $\beta$ -1,3 glucanasa (de la familia PR-2), también se han reportado incrementos rápidos

y abundantes de transcritos de otras PRs que son miembros de las familias PR-1, PR-3 (quitinasas) y PR-9 (peroxidases); y por consiguiente se ubican como parte fundamental de los mecanismos de defensa contra el oomiceto (Egea *et al.*, 1999; Kim y Hwang, 2000; Hong y Hwang, 2005). Las PRs en general se consideran como uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 2006).

El capsidiol es la fitoalexina sesquiterpénica más importan-

te en Chile y su acumulación en las zonas de infección inhibe o restringe el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible *P. capsici*-Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La enzima clave en la biosíntesis de la fitoalexina es la 5-*epi*-aristolocheno sintasa, codificada por el gen *PEAS* (Zavala *et al.*, 2000).

Con base en lo anterior y con la idea de aportar información que ayude al entendimiento de los mecanismos que restringen la colonización

TABLA I  
OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS PARA ANALIZAR LA ACUMULACIÓN DE ALGUNOS GENES RELACIONADOS  
CON LA DEFENSA EN PLANTAS DE CM-334 INOCULADAS CON *P. capsici*

Gen	Acceso	Referencia	Primer		Amplificación
			Nombre	Secuencia primer (5'-3')	
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa ( <i>GAPDH</i> )	AJ246011	DPE	GLIFW GLIRV	GGCCTTATGACTACAGTTCACCTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217pb
PR-1 ( <i>CABPRI</i> )	AF053343	Gayoso, <i>et al.</i> 2007	PR1FW PR1RV	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	301pb
Peroxidasa ( <i>CAPOI</i> )	AF442386	DPE	POXFW POXRV	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG GGATGCGTTCGATTGAAGGGTC	560pb
$\beta$ -1,3-glucanasa ( <i>CABGLU</i> )	AF227953	DPE	GLUFW GLURV	GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG CATCTTGTACCACCACATTAGGTGC	480pb
5- <i>epi</i> -aristoloxeno sintasa ( <i>PEAS</i> )	AJ005588	DPE	EASFW EASREV	GCTCAAGAAATTGAACCCGCCGAAG TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	200pb

DPE: diseñados en el presente estudio. *CABPRI*=*PR-1*; *CAPOI*=*POX*; *CABGLU*=*GLU*; *PEAS*=*EAS*.

y reproducción de *P. capsici* en las raíces de plantas de chile CM-334, el presente estudio tuvo por objetivos: 1) comparar mediante PCR en tiempo real la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* y *EAS*, relacionados con la defensa, y 2) comparar la actividad enzimática total de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol, en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas y no inoculadas con el oomiceto.

## Materiales y Métodos

### Establecimiento de los experimentos

Plántulas de chile CM-334 se crecieron en macetas conteniendo arena esterilizada y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 26 ±1°C con un fotoperiodo de 14h luz y 10h oscuridad. El aislamiento 6143 de *P. capsici* usado en este trabajo fue proporcionado por Sylvia Patricia Fernández-Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. El cultivo del oomiceto, la inducción de la esporulación y la cuantificación de zoosporas se realizó de acuerdo a lo reportado por Villar *et al.* (2009). En cada ensayo se tuvieron dos tratamientos, plantas inoculadas con *P. capsici* y plantas testigo (no inoculadas), y para cada tratamiento se establecieron 52

plantas. Las plantas se inocularon con 300000 zoosporas cuando presentaron 5-6 hojas verdaderas. Para corroborar tanto la patogenicidad del aislamiento como la eficacia de la inoculación, 10 plantas de chile del cv. J.E. Parker susceptible a *P. capsici* fueron también inoculadas. El experimento completo se repitió una vez. A las 6, 12, 24 y 48h posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto, de cada tratamiento se tomaron 13 plantas para cada tiempo, se cortaron las raíces, se lavaron, se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C.

### Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real

El RNA total de raíces de chile se extrajo a partir de 0,5g de tejido congelado usando el Kit RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA se almacenó a -80°C. La calidad e integridad del RNA se verificó en gel de agarosa desnaturizante al 1,2%.

La síntesis de cDNA se realizó en dos pasos: 1) la primera mezcla de reacción estuvo constituida por 2µg de RNA total; 0,4µl de oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen®), se aforó a un volumen de 12µl con agua libre de RNAsas y DNAsas y se incubó a 70°C por 10min, y al terminar se

colocó la mezcla en hielo; 2) a la primera mezcla de reacción se le adicionaron 8µl de una segunda mezcla, la cual contenía 4µl de amortiguador 5x para retrotranscripción, 2µl de ditioneol 0,1M; 1µl dNTP mix 10mM y 1µl de la retrotranscriptasa (M-MLV Reverse transcriptase, Promega®). La mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD®) durante 60min a 37°C y 10min a 70°C.

Los pares de oligonucleótidos utilizados en el estudio se muestran en la Tabla I. Con excepción de aquellos para el gen *PR-1*, los demás se diseñaron usando el programa DNASTAR® a partir de las secuencias de genes disponibles en el GenBank del NCBI. La mezcla de reacción de PCR en tiempo real consistió de 2,5µl de buffer 10x para PCR; 1,25µl de MgCl<sub>2</sub> 30mM; 1µl de 10pM de cada primer; 1µl de dNTP mix 10mM; 1:150000 SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR); 0,25µl de fluoresceína 1µM; 1,5µl de cDNA; 0,125µl de Amplicasa (Biogenica®), y se aforó a un volumen de 25µl con agua libre de RNAsas y DNAsas, en un sistema estándar de PCR en tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturización inicial a 94°C/4min, seguido de 30 ciclos a 94°C/30s,

60°C/30s y 72°C/30s, y un paso final de extensión a 72°C/4min. La especificidad de los oligonucleótidos se corroboró mediante el análisis de las curvas de disociación y por la secuenciación de los productos de PCR obtenidos. El gen de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (*GAPDH*) se usó como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión y las plantas no inoculadas representaron la expresión 1x del gen de interés. El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Livak y Schmittgen, 2001). Para cada tratamiento se realizaron seis determinaciones por tiempo evaluado.

### Extracción de proteína y actividad de peroxidasas

La extracción de proteína se realizó a partir de 0,2g de tejido macerándolo en un mortero que contenía buffer frío de Tris-HCL 50mM; pH 7,5. El extracto se centrifugó a 12000g a 4°C por 5min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C. La concentración de proteínas se determinó con el Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EEUU) para lo cual se utilizó albúmina sérico-bovina, fracción V (Sigma), como estándar. La actividad de peroxidasas se determinó con el incremento de absorbancia a 470nm debi-

do a la formación de tetraguaiacol (Hammerschmidt *et al.*, 1982). La mezcla de reacción consistió de 220µl de amortiguador de Tris-HCl 50mM, pH 7,5; 15µl de peróxido de hidrógeno 0,25%; 25µl de guaiacol 0,1M; y 5µg de proteína total. La actividad enzimática se reportó como µmoles de tetraguaiacol / µg de proteína. Se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado.

#### Extracción de proteína y actividad de glucanasas

Se maceró 0,25g de tejido de raíces usando como buffer acetato de sodio 0,05M; pH 5,2. El extracto se centrifugó a 15000g a 4°C por 10min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C. La actividad de β-1,3 glucanasas se determinó usando el ensayo de laminarina-ácido dinitrosalicílico de Abeles y Forrence (1970) con algunas modificaciones. A 25µl de extracto crudo de la enzima se le adicionó 25µl de laminarina 1% y se incubó a 40°C durante 10min. La reacción se detuvo adicionando 375µl de ácido dinitrosalicílico y calentando por 5min en agua hirviendo (100°C). Enfriada la solución ésta, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 500nm. El blanco consistió del extracto de la enzima y laminarina al tiempo cero de incubación. La reducción de azúcar se calculó usando una curva estándar de glucosa. Una unidad de actividad de β-1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1µmol de glucosa por 10min, bajo las condiciones arriba citadas (Pan *et al.*, 1991). Se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado.

#### Extracción y cuantificación de capsidiol

El capsidiol se extrajo de acuerdo al método descrito por Egea *et al.* (1996b), con

algunas modificaciones. De cada tratamiento y tiempo se tomó una muestra de 0,5g de tejido radical, se maceró por 30s en N<sub>2</sub> líquido y posteriormente por 1min en una mezcla 2:1 de cloroformo:metanol. Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente y se disolvió nuevamente en cloroformo para su análisis por cromatografía en capa fina, la cual se desarrolló con una mezcla 1:6 de hexano:acetato de etilo, utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck®). Las muestras fueron cromatografiadas en banda y eluidas conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se confrontó físicamente con la porción eluida y no revelada de cada tratamiento, las regiones correspondientes al Rf= 0,28 característico del capsidiol se rasparon, se lavaron con cloroformo, se filtraron y evaporaron a sequedad.

La estimación del contenido de capsidiol se realizó según el método descrito por Chávez y Lozoya (1996), con algunas modificaciones. Las muestras se disolvieron en 250µl de metanol, y para la cuantificación se preparó una mezcla de reacción de extracto y vainillina 2% en ácido sulfúrico en proporción 1:1, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 40min y posteriormente se leyó a una longitud de onda de 640nm en un Nanodrop®. Para la cuantificación de la fitoalexina se utilizó una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de capsidiol puro, aislado e identificado por nuestro grupo de investigación (Villar *et al.*, 2009).

#### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza para un modelo completamente al azar con el paquete

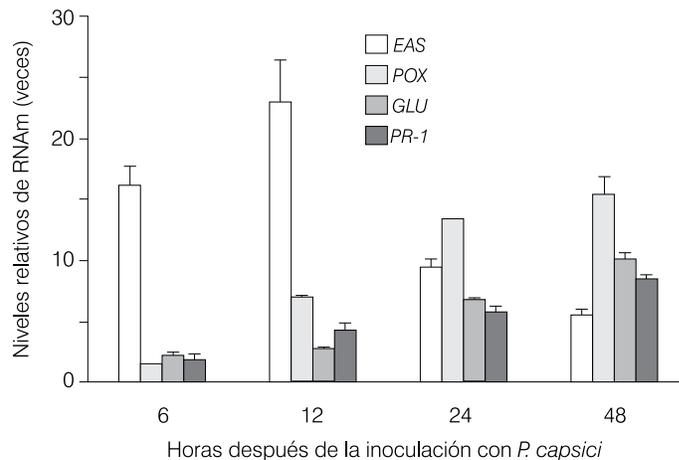


Figura 1. Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de Chile CM-334 inoculadas con *P. capsici* respecto a las plantas no inoculadas. *EAS*: 5-epi-aristoloqueno sintasa, *POX*: peroxidasa, *GLU*: β-1,3-glucanasa. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes con seis determinaciones cada uno. La línea de cada barra representa la desviación estándar.

estadístico SAS (1999), y para la comparación de medias de tratamiento se aplicó la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

## Resultados

### Niveles relativos de genes relacionados con la defensa

En comparación con las plantas testigo (no inoculadas), en raíces de Chile CM-334 tratadas con *P. capsici*, se registró una acumulación significativamente mayor de transcritos de los genes *EAS* (5-epi-aristoloqueno sintasa), *POX* (peroxidasa), *GLU* (β-1,3 glucanasa) y *PR-1* (proteína PR1). De entre de ellos el gen *EAS* presentó el mayor incremento, 23 veces con respecto al testigo (Figura 1). Los transcritos de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* se detectaron desde las 6 hpi en el tratamiento con el oomiceto, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi, cuando se registró el máximo valor. De igual manera, el gen *EAS*, responsable de codificar para la enzima 5-epi-aristoloqueno sintasa, clave en la síntesis de la fitoalexina capsidiol, se incrementó considerablemente desde las 6 hpi, 16,3 veces respecto al testigo, pero alcanzó la máxima acumulación (23 veces) a las 12 hpi y posteriormente declinó drásticamente

a 9,4 y 5,5 veces a las 24 y 48 hpi, respectivamente.

De los genes que codifican para la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, el gen *POX* destacó con un incremento de 15,4 veces, seguido por *GLU* (10,1 veces) y *PR-1* (8,5 veces) a las 48 hpi con el oomiceto.

### Actividad enzimática

La actividad de las glucanasas y peroxidadas en las raíces de las plantas testigo (no inoculadas), se mantuvo relativamente constante a lo largo de los cuatro tiempos evaluados (Figuras 2a y b); en contraste, en las plantas de Chile CM-334 inoculadas con el oomiceto la actividad de las enzimas se incrementó desde las 6 hpi y fue acrecentándose a medida que transcurrió el tiempo. Para ambas enzimas el incremento de su actividad fue significativo ( $P \leq 0,05$ ) a las 12, 24 y 48 hpi en raíces inoculadas con *P. capsici*.

### Contenido de capsidiol

El contenido de capsidiol en las raíces de plantas CM-334 no inoculadas se mantuvo más o menos constante sin incrementos significativos durante el período de evaluación; en cambio los niveles de

esta fitoalexina fueron significativamente mayores ( $P \leq 0,05$ ) en las plantas inoculadas con *P. capsici* (Figura 2C). Los incrementos fueron de 69,7%, 165,1%, 259,1% y 386,7% a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente.

## Discusión

Las plantas exhiben defensas tanto constitutivas como inducidas contra el ataque por patógenos. Sin embargo, la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez, y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno (Silvar *et al.* 2008). En general, en las interacciones chile-*P. capsici* tanto de tipo compatibles como incompatibles ocurren cambios en: la acumulación de PRs (Kim y Hwang, 1994; Egea *et al.* 1999; Lee *et al.* 2000), el contenido de capsidiol (Egea *et al.* 1996a), y la expresión de genes (Hong y Hwang, 2005; Silvar *et al.* 2008), así como alteraciones citológicas (Hwang, 2001). Tales cambios son más rápidos y de mayor magnitud en las interacciones incompatibles. En la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* del presente estudio, también hubo diferencias importantes en la expresión de transcritos de genes de defensa, el contenido de la fitoalexina capsidiol, y en la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas y peroxidasas, con respecto a las plantas no inoculadas.

En la interacción incompatible CM-334-*P. capsici*, hubo una mayor expresión de los

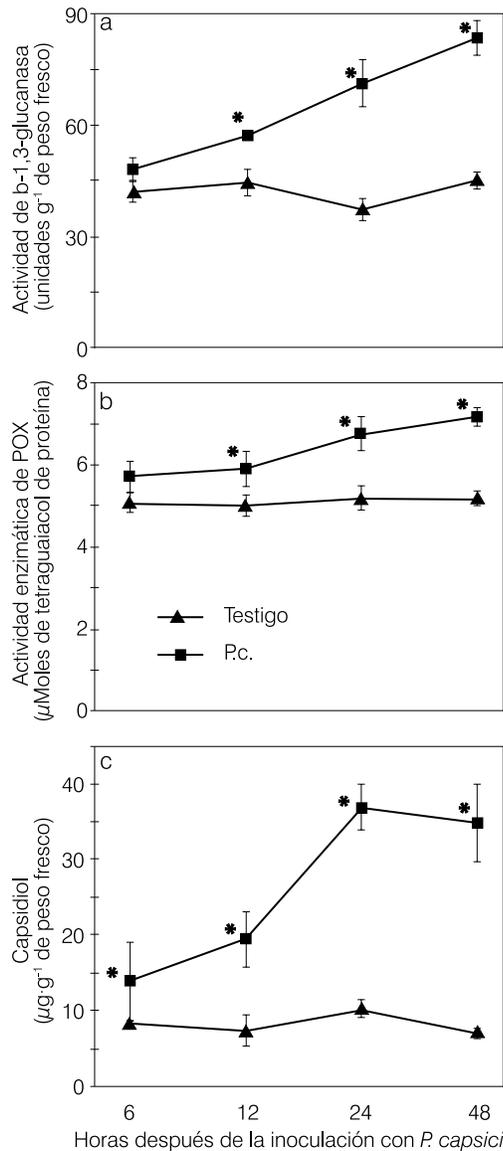


Figura 2. Actividad enzimática total de  $\beta$ -1,3-glucanasas (a), peroxidasas (b) y contenido de la fitoalexina capsidiol (c) en raíces de chile CM-334 inoculadas (P.c.) y no inoculadas con *P. capsici* (testigo). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes, de cada uno se realizaron dos extracciones y de cada extracción se hicieron tres lecturas; la línea en cada punto representa la desviación estándar. Para cada tiempo el asterisco indica diferencias significativas (Tukey,  $P \leq 0,05$ ) entre el testigo y el infectado por el oomiceto.

transcritos de los genes *GLU* y *POX*, la cual se asoció con incrementos significativos en la actividad de las enzimas para las que codifican. También se obtuvieron incrementos significativos de transcritos de los genes *PR-1* y *EAS*, y de la fitoalexina capsidiol. En concordancia con lo reportado por varios investigadores para otros genotipos de chile resistentes al oomiceto (Egea *et al.*,

1999; Jung y Hwang, 2000; Lee *et al.*, 2000; Do *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008) los presentes resultados soportan la idea de que tales genes y compuestos podrían estar directamente involucrados en la resistencia de CM-334 a *P. capsici*.

La acumulación de transcritos del gen *POX* y el correspondiente incremento en la actividad de peroxidasas sugiere que este gen está involucrado en la respuesta de defensa de CM-334 contra *P. capsici*. Se ha consignado que la expresión de *POX* y la actividad de peroxidasas se incrementa en las plantas como resultado del ataque por patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Las peroxidasas contribuyen a la resistencia de las plantas al crear un ambiente tóxico por la acumulación de especies reactivas de  $O_2$  y al participar en el reforzamiento de la pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.*, 2005). Silvar *et al.* (2008), al inocular plantas de chile (cv. CM-331) resistente a *P. capsici*, encontraron que a las 24 hpi la expresión del RNAm del gen *CAPOI*, que codifica para peroxidasa, se incrementó 11,6 veces respecto a las plantas sin inocular, mientras que en las plantas del cv. susceptible Yolo Wonder, la expresión del gen *CAPOI* fue tres veces menor que en el cultivar resistente. De igual forma, Do *et al.* (2003) reportaron que en plantas de chile del cv. Hanbyul inoculadas con los aislamientos de *P. capsici* S197 (compatible) y CBS178.26 (incompatible), la expresión del gen *CAPOI*

fue más rápida y abundante en la interacción incompatible en comparación con la compatible.

El incremento significativo en la expresión de transcritos del gen *PR-1* en la interacción del presente estudio concuerda con los resultados consignados por Kim y Hwang (2000), quienes observaron un incremento en los niveles de los RNAm del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1 básica de Chile, en la interacción incompatible Chile cv. Hanbyul-*P. capsici* aislamiento CBS 178.26; el incremento fue mayor a los 3 y 4 días posteriores a la inoculación (dpi), mientras que en la interacción compatible Chile cv. Hanbyul-*P. capsici* (aislamiento S197) la acumulación del gen empezó a declinar gradualmente a partir de los 3 dpi. La función y el mecanismo de acción de las proteínas PR-1 en la patogénesis es todavía desconocida; sin embargo, el hallazgo consignado por Lee *et al.* (2000) respecto a que las proteínas PR-1 se acumularon en los espacios intercelulares y en la interfase entre el patógeno (*P. capsici*) y las células de la planta de Chile (cv. Hanbyul), sugiere que éstas podrían participar en la defensa contra el oomiceto, ejerciendo un efecto tóxico directo que retrasa el desarrollo del patógeno.

Por un lado, el incremento tanto de la acumulación de transcritos del gen *GLU* como de la actividad de la enzima correspondiente en la interacción Chile-*P. capsici*, y por el otro, el marcado incremento que ocurre en las interacciones incompatibles comparado con el de las compatibles, sustentan la idea de que las  $\beta$ -1,3 glucanasas están asociadas con las respuestas de defensa (Kim y Hwang, 1997; Jung y Hwang, 2000). Egea *et al.* (1999) al contrastar la expresión del gen que codifica para  $\beta$ -1,3 glucanasa en la interacción incompatible Smith-5-*P. capsici* con la compatible Yolo Wonder-*P. capsici*, encontraron que la expresión fue de mayor mag-

nitid y más duración en las plantas del cv. Smith-5 con respecto a la interacción compatible, la cual disminuyó a los 3 dpi; también la actividad total de  $\beta$ -1,3 glucanasas fue mayor en la interacción incompatible en comparación con la compatible y, en esta última, la acumulación tardía de  $\beta$ -1,3 glucanasas no previno el crecimiento del patógeno. Las  $\beta$ -1,3 glucanasas degradan la pared celular de los oomicetos al hidrolizar la  $\beta$ -1,3 glucana que es su mayor componente. Además del efecto directo sobre el patógeno, la enzima también puede mediar las respuestas de defensa de las células vecinas, ya que los fragmentos de glucana liberados de la pared celular del patógeno o de la planta pueden funcionar como elicitores para activar otras respuestas de defensa (Takeuchi *et al.*, 1990).

De los genes estudiados, *EAS* destacó por su mayor y más rápida acumulación, sugiriendo que es uno de los primeros genes que se expresa en las plantas CM-334 en respuesta a la inoculación con *P. capsici*. La expresión del gen *EAS* como consecuencia de la inoculación con *P. capsici* en plantas de Chile de diferentes cultivares ha sido reportada por varios autores (Zavala *et al.*, 2000; Sun-Hwa *et al.*, 2003). Zavala *et al.* (2000) mencionan que la inoculación de *P. capsici* en plantas de Chile var. Sonora Anaheim indujo una expresión fuerte del gen *EAS* (*PEAS*) a las 24h de haber sido inoculadas con el oomiceto, mientras que en las plantas no inoculadas no se detectó la expresión del gen. Por su parte, Mandujano *et al.* (2000) en estudios con cultivos celulares de tabaco tratados con un elicitador fúngico, determinaron que a las 36h posteriores a la estimulación se incrementó la actividad de una sesquiterpeno ciclasa, la cual se correlacionó con la acumulación de capsidiol.

La continua acumulación del capsidiol en raíces de CM-334 inoculadas con *P. capsici*,

registrada a lo largo de las evaluaciones, indica la importancia de la fitoalexina como parte de los mecanismos de resistencia de este genotipo al oomiceto. Se considera que el capsidiol es la principal fitoalexina sintetizada en Chile, y la magnitud de su acumulación se asocia con el grado de resistencia a *P. capsici* en diversos genotipos de Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La toxicidad del capsidiol a *P. capsici* ha sido demostrada en varios trabajos (Ward *et al.*, 1974; Egea *et al.*, 1996a).

Las proteínas PRs no solo son inducidas en los tejidos de plantas en respuesta a la infección por patógenos sino también como respuesta al estrés abiótico (Hong y Hwang, 2005). En el presente estudio, en raíces de Chile CM-334 de las plantas testigo se observó una expresión constitutiva leve de los diferentes genes en estudio. Al respecto, se ha documentado que las  $\beta$ -1,3 glucanasas, peroxidases y proteínas PR-1 también intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas tales como maduración y desarrollo de frutos (Gaspar *et al.*, 1982), división celular (Fulcher *et al.*, 1976), embriogénesis (Dong y Dunstan, 1997), germinación de semillas (Leubner-Metzger y Meins, 1999), rompimiento de dormancia (Krabel *et al.*, 1993) y respuestas a luz UV (Green y Fluhr, 1995; El Ghaouth *et al.*, 2003), entre otros. Por ello, la resistencia de CM-334 a *P. capsici* podría deberse también, en parte, a la expresión constitutiva que sumada a la expresión rápida de genes que codifican para proteínas PRs, crean un ambiente perjudicial para la infección y/o establecimiento del oomiceto.

En la interacción incompatible Chile CM-334-*P. capsici* estudiada, las plantas inoculadas con el oomiceto mostraron un incremento significativo en la acumulación de transcritos de los genes *GLU* y *POX*, hecho que se asoció con incrementos considerables

en la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas y peroxidases, respectivamente. De igual manera, los transcritos de los genes *PR-1* y *EAS* (5-epi-aristolóqueno sintasa) y el contenido de la fitoalexina capsidiol, se incrementaron significativamente como respuesta a la inoculación con *P. capsici*.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Diana Sanzón Gómez por su ayuda en el establecimiento de los ensayos y apoyo técnico en laboratorio, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al primer autor y el apoyo brindado a través del proyecto de investigación 46331-Z.

#### REFERENCIAS

- Abeles FB, Forrence LE (1970) Temporal and hormonal control of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 45: 395-400.
- Bonnet J, Danan S, Boudet C, Barchi L, Sage-Palloix AM, Caromel B, Palloix A, Lefebvre V (2007) Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. *Theor. Appl. Genet.* 115: 253-264.
- Candela EM, Alcázar DM, Espín A, Egea C, Almela L (1995) Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 44: 116-123.
- Candela EM, Egea C, García MDP, Costa J, Candela M (2000) Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.
- Chávez MMP, Lozoya GE (1996) Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Rep.* 15: 360-366.
- Do HM, Hong JK, Jung HW, Kim SH, Ham JH, Hwang BK (2003) Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 196-205.
- Dong JZ, Dunstan DI (1997) Endochitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes are developmentally

regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201: 189-194.

- Egea C, Alcazar MD, Candela ME (1996a) Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98: 737-742.
- Egea C, Garcia MDP, Candela ME (1996b) Capsidiol accumulation in resistant and susceptible reaction to *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 149: 762-764.
- Egea C, Dickinson MJ, Candela M, Candela ME (1999)  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 107: 312-318.
- El Ghaouth A, Wilson CL, Callahan AM (2003) Induction of chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-treatment. *Phytopathology* 93: 349-355.
- Fernández A, Peteira B, Solórzano E, Díaz M, León O (1998) Mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción hospedante-patógeno. *Rev. Protec. Veg.* 13: 1-12.
- Fernández PS (1997) *Host-Pathogen Interactions In The Root Rot Phytophthora capsici/Capsicum annuum Resistant CM-334 Pathosystem*. Tesis. New México State University. EEUU. 109 pp.
- Fulcher RG, Mc Cully ME, Setterfield G, Sutherland J (1976)  $\beta$ -1,3 glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. *Can. J. Bot.* 54: 459-542.
- Gaspar T, Penel C, Greppin H (1982) *Peroxidases 1970-1980. A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*. University of Geneva Press. Ginebra, Suiza. 324 pp.
- Gayoso C, Martínez de Iarduya O, Pomar F, Merino F (2007) Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 118: 199-209.
- Glosier BR, Ogundiwin EA, Sidhu GS, Sischo DR, Prince JP (2008) A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162: 23-30.
- González E, Yáñez MM, Santiago VS, Montero AP (2004) Biodiversidad fungosa en la mar-

- chitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia* 38: 653-661.
- Green R, Fluhr R (1995) UV-B induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7: 203-212.
- Hammerschmidt R, Nuckles EM, Ku F (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20: 73-82.
- Hong JK, Hwang BK (2005) Functional characterization of PR-1 protein,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annum*. *Plant Pathol. J.* 21: 195-206.
- Hwang BK (2001) Cytology, physiology and molecular genetics of resistance to Phytophthora blight in pepper plants. *Plant Pathol. J.* 17: 9-21.
- Jung HW, Hwang BK (2000) Pepper gene encoding a basic  $\beta$ -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate. *Plant Sci.* 159: 97-106.
- Kim SG, Kim YH (2009) Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *Plant Pathol. J.* 25: 113-120.
- Kim YJ, Hwang BK (1994) Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 45: 195-209.
- Kim YJ, Hwang BK (1997) Isolation of a basic 34-kDa  $\beta$ -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 103-115.
- Kim YJ, Hwang BK (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol. Plant.* 108: 51-60.
- Krabel D, Eschrich W, Wirth S, Wolf G (1993) Callase ( $1,3\text{-}\beta\text{-D}$ -glucanase) activity during spring reactivation in deciduous trees. *Plant Sci.* 93: 19-23.
- Lee YK, S Hippe-Sanwald S, Lee SC, Hohenberg H, Hwang BK (2000) In situ localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma* 211: 64-75.
- Leubner-Metzger G, Meins F (1999) Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3 glucanases (PR-2). En Datta SK, Muthukrishnan S (Eds.) *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 49-66.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25: 402-408.
- Mandujano CA, Schoenbeck MA, Ralston LF, Lozoya GE, Chappell J (2000) Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Arch. Biochem. Biophys.* 381: 285-294.
- Oelke ML, Bosland PW, Steiner P (2003) Differentiation of races specific resistance to Phytophthora root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128: 213-218.
- Pan SQ, Ye SX, Kuc J (1991) Association of  $\beta$ -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 25-39.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Duanand C (2005) Peroxidases have more functions than army knife. *Plant Cell Rep.* 24: 255-265.
- Pérez, L, Medina LO, Salinas, GJG (1990) Control genético y químico de la marchitez del chile *Capsicum annum* L. causada por el hongo *Phytophthora capsici* Leo., en la región de Irapuato, Guanajuato, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 8: 71-76.
- SAS (1999) *SAS User's Guide: Statistics*. Ver. 8.0. SAS Institute, Inc. Cary, NC, EEUU. 956 pp.
- Sepúlveda JG, Porta DH, Rocha SM (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 355-363.
- Silvar C, Merino F, Díaz J (2008) Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165: 1120-1124.
- Sun-Hwa H, Kim JB, Hwang YS, Lee SW (2003) Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 form pepper (*Capsicum annum*). *Biochim. Biophys. Acta* 1625: 253-260.
- Takeuchi Y, Yoshikawa M, Takeba G, Kunisuke T, Shibata D, Horino O (1990) Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiol.* 93: 673-682.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Villar LE, Reyes TB, Rojas MRI, Gómez RÓ, Hernández AAM, E Zavaleta-Mejía (2009) Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39: 143-155.
- Ward EWB, Unwin C, Stoessl A (1974) Post infectious inhibitors from plants. III. Fungitoxicity of the phytoalexin capsidiol and related sesquiterpenes. *Can. J. Bot.* 52: 2481-2488.
- Zavala PG, Chávez MMP, García PE, Yin S, Chappell J, Lozoya GE (2000) Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*Gpeas1*) from chilli pepper (*Capsicum annum*). *Physiol. Plant.* 110: 410-418.