

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA  
DE PLANTAS**

**Modificación en las poblaciones de transcritos  
durante la infección de plántulas de *Capsicum  
chinense* con el oomiceto *Phytophthora capsici***

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias presenta:**

**Ing. Bioq. María Goretty Caamal Chan**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Mérida, Yucatán, México**

**2011**





## INDICE

|  |      |
|--|------|
| <b>RECONOCIMIENTOS</b>   | IX   |
| <b>DEDICATORIA</b>   | XII  |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | XIII |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | XIV  |
| <b>RESUMEN</b>   | XV   |
| <b>ABSTRACT</b>  | XVII |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 1    |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 3    |
| <b>CAPÍTULO I. Antecedentes</b>  | 5    |
| <b>1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE</b><br><i>Capsicum chinense</i> Jacq.      | 5    |
| 1.1.2. Importancia económica   | 5    |
| 1.1.3. El oomiceto <i>Phytophthora capsici</i> como patógeno del<br>género <i>Capsicum</i> | 6    |
| <b>1.2. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO</b>  | 8    |
| 1.2.2. Los inductores como moléculas de reconocimiento                                     | 10   |
| 1.2.3. Receptores celulares  | 11   |
| 1.2.4. Respuestas tempranas ante el reconocimiento de un<br>patógeno                       | 17   |
| 1.2.5. Resistencia sistémica adquirida   | 18   |
| 1.2.6. El ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y el ácido<br>jasmónico (JA)              | 19   |
| 1.2.7. La regulación de la expresión de genes de defensa                                   | 21   |
| <b>1.3. IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA<br/>DIFERENCIAL</b>                          | 21   |
| <b>1.4. JUSTIFICACIÓN</b>  | 23   |
| <b>1.5. HIPÓTESIS</b>  | 24   |
| <b>1.6. OBJETIVOS</b>  | 24   |
| 1.6.1. Objetivo general  | 24   |
| 1.6.2. Objetivos específico  | 24   |

|  |    |
|--|----|
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 25 |
| <b>CAPITULO II. Análisis fisiológicos y moleculares de la respuesta de <i>Capsicum chinense</i> durante la infección producida por <i>Phytophthora capsici</i></b> | 31 |
| <b>2.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 31 |
| <b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 32 |
| 2.2.1. Plántulas de chile habanero   | 32 |
| 2.2.2. Inoculación de plántulas de <i>C. chinense</i> con micelio de <i>P. capsici</i>   | 33 |
| 2.2.3. Extracción de ARN   | 33 |
| 2.2.4. Detección de <i>P. capsici</i> en plántulas inoculadas  | 34 |
| 2.2.5 Detección de micelio intracelular  | 34 |
| 2.2.6. Detección de los transcritos del marcador de defensa PR1 en plántulas inoculadas  | 34 |
| <b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>   | 34 |
| 2.3.1. Obtención de plántulas de <i>C. chinense</i>  | 34 |
| 2.3.2. Inoculación de plántulas de <i>C. chinense</i> con micelio de <i>P. capsici</i>   | 35 |
| 2.3.3. Análisis de transcritos de marcadores de defensa  | 40 |
| <b>2.4. CONCLUSIONES</b>   | 42 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 43 |
| <b>CAPÍTULO III. Análisis de la expresión diferencial de la población de transcritos durante la interacción <i>C. chinense</i> – <i>P. capsici</i>.</b>            | 45 |
| <b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 45 |
| <b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 46 |
| 3.2.1. Material vegetal  | 46 |
| 3.2.2. Análisis por despliegue diferencial   | 46 |
| 3.2.3. Verificación de la expresión diferencial en las clonas  | 47 |

|  |           |
|--|-----------|
| aisladas   |           |
| 3.2.4. Marcaje no isotópico de las sondas  | 47        |
| 3.2.5. Análisis Bioinformático   | 48        |
| <b>3.3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | <b>48</b> |
| 3.3.1. Extracción de ARN   | 48        |
| 3.3.2. Fraccionamiento de las muestras de ADNc por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida   | 52        |
| 3.3.3. Análisis de las bandas diferenciales  | 54        |
| 3.3.4. Reamplificación por PCR de las bandas diferenciales   | 56        |
| 3.3.5. Clonación de los ADNc diferenciales   | 58        |
| 3.3.6. Corroboración de la expresión diferencial   | 60        |
| 3.3.7. Análisis bioinformático de las secuencias de los ADNc clonados  | 63        |
| 3.3.8. Clona CCD-4   | 64        |
| 3.3.9. Clona CCF-6   | 67        |
| 3.3.10. Clona CCG-7  | 70        |
| <b>3.4. CONCLUSIONES</b>   | <b>77</b> |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 78        |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO IV. Systemic induction of A <i>Capsicum chinense</i> nitrate reductase by the infection with <i>Phytophthora capsici</i> and defence phytohormones</b> | <b>81</b> |
| <b>4.1. INTRODUCTION</b>   | <b>82</b> |
| <b>4.2. METHODS</b>  | <b>83</b> |
| 4.2.1. Plant material and treatments   | 83        |
| 4.2.2. Isolation and sequence analysis of the CcNR cDNA  | 83        |
| 4.2.3. Gene expression analysis  | 84        |
| 4.2.4. Protein extraction  | 85        |
| 4.2.5. Nitrate reductase assay   | 85        |
| <b>4.3. RESULTS</b>  | <b>85</b> |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.1. Isolation and analysis of the CcNR cDNA sequence  | 85  |
| 4.3.2. CcNR is expressed in adult tissues and is induced systemically by inoculation with <i>P. capsici</i>  | 88  |
| 4.3.3. <i>CcNR</i> is induced by the exogenous application of defence phytohormones  | 90  |
| 4.3.4. Nitrate reductase activity is modified in pepper leaves by the addition of defence phytohormones and inoculation with <i>P. capsici</i>         | 90  |
| <b>4.4. DISCUSSION</b>   | 92  |
| REFERENCES   | 95  |
| <br>   |     |
| <b>CAPÍTULO V. La actividad de NR de plántulas de <i>Capsicum chinense</i> es inhibida por el tungstato de sodio en etapas tardías de la infección</b> | 99  |
| <b>5.1. INTRODUCCIÓN</b>   | 99  |
| <b>5.2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |     |
| 5.2.1. Tratamiento con Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> para inhibir la actividad de la nitrato reductasa de chile habanero                             | 101 |
| 5.2.2. Inoculación de plántulas previamente tratadas con Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>   | 101 |
| 5.2.3. Extracción de proteínas   | 101 |
| 5.2.4. Análisis de la actividad de la NR   | 102 |
| <b>5.3. RESULTADOS</b>   | 102 |
| 5.3.1. Efecto del Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> en la actividad constitutiva de la NR de chile habanero  | 102 |
| 5.3.2. Efecto del Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> en la actividad de la NR inducida por <i>P. capsici</i>  | 104 |
| <b>5.4. CONCLUSIÓN</b>   | 107 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 108 |
| <br>   |     |
| <b>CAPÍTULO VI. Discusión y conclusiones generales</b>   | 109 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 114 |

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| <b>CAPÍTULO VII. Perspectivas</b> | 115 |
| <b>ANEXO I</b>                    | 117 |
| <b>ANEXO II</b>                   | 118 |
| <b>ANEXO III</b>                  | 119 |

## CONTENIDO DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.1.</b> Ciclo de vida de <i>Phytophthora capsici</i> , agente causal de la marchitez del chile.  | 7  |
| <b>Figura 1.2.</b> Modelos de la interacción entre los productos del gen avr del patógeno y del gen R de la planta  | 16 |
| <b>Figura 1.3.</b> Las respuestas de defensa de la planta al ataque de microorganismos son reguladas a través de complejas redes de rutas de señalización que involucran a tres fitohormonas: SA, JA, y ET. | 20 |
| <b>Figura 2.1.</b> Detección de ARN de <i>P. capsici</i> en hojas de plántulas infectadas con el oomiceto   | 37 |
| <b>Figura 2.2.</b> Inoculación de plántulas de <i>C. chinense</i> con micelio de <i>P. capsici</i>  | 39 |
| <b>Figura 2.3.</b> Detección de transcritos de PR1 en plántulas de <i>C. chinense</i> inoculadas con <i>P. capsici</i> .  | 41 |
| <b>Figura 3.1.</b> Aislamiento de ARN total de plántulas.   | 49 |
| <b>Figura 3.2.</b> Pozas de ARN.  | 50 |
| <b>Figura 3.3.</b> Productos de RT-PCR del despliegue diferencial   | 51 |
| <b>Figura 3.4.</b> Productos del Despliegue Diferencial obtenidos con diferentes combinaciones de oligonucleótidos.   | 53 |
| <b>Figura 3.5.</b> Análisis de las bandas correspondientes a ADNc que se expresan de forma diferencial  | 55 |
| <b>Figura 3.6.</b> Reamplificación de segmentos diferenciales de ADNc   | 57 |
| <b>Figura 3.7.</b> Corroboración de la clonación de ADNc diferenciales  | 59 |
| <b>Figura 3.8.</b> Marcaje no isotópico de la sonda de ADNc   | 61 |
| <b>Figura 3.9.</b> Fraccionamiento de los ADNc diferenciales  | 62 |
| <b>Figura 3.10.</b> Análisis de los niveles de expresión de transcritos modificados por la infección del oomiceto   | 63 |
| <b>Figura 3.11.</b> Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona de CCD-4 de <i>C. chinense</i>   | 64 |
| <b>Figura 3.12.</b> La secuencia de aminoácidos de la clona CCD-4 de <i>C. chinense</i> , fue alineada con la secuencia de  | 65 |

|  |     |
|--|-----|
| aminoácidos de NR de <i>S. tuberosum</i> , <i>S. lycopersicum</i> y <i>P. hybrida</i> .  |     |
| <b>Figura 3.13.</b> Dominios conservados de la clona CCD-4.  | 66  |
| <b>Figura 3.14.</b> Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona CCF-6 de <i>C. chinense</i>   | 67  |
| <b>Figura 3.15.</b> La secuencia de aminoácidos de la clona CCF-6 de <i>C. chinense</i> , fue alineada con la secuencia de aminoácidos de <i>L-asparginasa</i> de <i>V. vinifera</i> , <i>R. communis</i> y <i>P. trichocarpa</i> .          | 68  |
| <b>Figura 3.16.</b> Dominios conservados de la clona CCF-6.  | 69  |
| <b>Figura 3.17.</b> Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona CCG-7 de <i>C. chinense</i> .   | 70  |
| <b>Figura 3.18.</b> La secuencia de aminoácidos de la clona CCG-7 de <i>C. chinense</i> , fue alineada con la secuencia de aminoácidos de proteínas de dirección vacuolar de <i>S. tuberosum</i> , <i>V. vinifera</i> , y <i>R. communis</i> | 72  |
| <b>Figura 3.19.</b> Dominios conservado de la clona CCG-7  | 72  |
| <b>Figura 4.1.</b> Analysis of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the <i>C. chinense</i> clone CCD-4   | 87  |
| <b>Figura 4.2.</b> Expression of CcNR under different treatments.  | 89  |
| <b>Figura 4.3.</b> Activity of nitrate reductase under different treatments  | 91  |
| <b>Figura 5.1.</b> Efecto del $\text{Na}_2\text{WO}_4$ sobre la actividad de la NADH:NR de <i>Capsicum chinense</i> .  | 103 |
| <b>Figura 5.2.</b> Efecto de 500 $\mu\text{M}$ de $\text{Na}_2\text{WO}_4$ sobre la actividad de la NADH:NR de <i>Capsicum chinense</i> .  | 105 |
| <b>Figura 5.3.</b> Efecto del $\text{Na}_2\text{WO}_4$ sobre la actividad de la NADH:NR de <i>Capsicum chinense</i> infectada con <i>P. capsici</i>  | 106 |
| <b>Figura 6.1.</b> La infección con <i>Phytophthora capsici</i> afecta la expresión génica en plántulas de <i>C. chinense</i> de manera sistémica  | 112 |

## CONTENIDO DE TABLAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Cuadro 1. Genes de resistencia aislados de diferentes plantas.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>Cuadro 3.1.-ADNc Numero de bandas identificadas como diferenciales por combinación de cebadores .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Cuadro 3.2. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCD-4.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>Cuadro 3.3. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCF-6. ....</b>  | <b>68</b> |
| <b>Cuadro 3.4. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCG-7. ....</b>  | <b>71</b> |
| <b>Cuadro 3.5. Análisis de la identidad y de la expresión diferencial de transcritos aislados por despliegue diferencial de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. infectado con <i>Phytophthora capsici</i>.....</b> | <b>73</b> |

## RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., haciendo uso de sus equipos e instalaciones, bajo la asesoría y dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) financió el trabajo a través del proyecto P-48831.

La autora recibió la beca crédito No. 12345 otorgada por el CONACYT para los estudios de Doctorado.

Mérida, Yucatán, México; a 22 de Agosto de 2011

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Nombre: María Goretty Caamal Chan

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.**



## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“Modificación en las poblaciones de transcritos durante la infección de plántulas de *Capsicum chinense* con el oomiceto *Phytophthora capsici*”** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del (los) Dr. **José Juan Zúñiga Aguilar.**, dentro de la Opción **Doctorado Directo**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

**Atentamente**

**Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela**

**Director Académico**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.**

## DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti, Dios que me diste la oportunidad de vivir esta hermosa experiencia y de regalarme una familia maravillosa.

A mi amada madre, un ser de decisión y carácter, esto ha sido por tí, con tu ejemplo me has enseñado que un objetivo se puede lograr si tienes la perseverancia y el suficiente valor.

A mi padre.

## AGRADECIMIENTOS

Con esto concluyo una de las etapas más lindas de mi vida, ha sido maravilloso ya que experimenté todo tipo de situaciones que complementan mi formación tanto en el ámbito profesional como de ser humano. Son tantas las personas con las que he interactuado a lo largo de este proceso de formación, y deseo agradecer de forma especial a:

Dr. Gregorio Godoy Hernández y a la Dra. Claudia Ivonne Muñoz Sánchez por aportar ideas a lo largo de este proyecto.

Mi asesor de tesis Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, ha sido un gran ejemplo de rigor científico en este proceso; te doy gracias por la libertad de permitirme decidir como realizar y plantear parte del proyecto que con este escrito concluye, por guiarme en momentos en que no sabes el porqué de los resultados, el tiempo dedicado a escuchar y aportar tu opinión en las ideas planteadas, lo aprendido de ti me será útil en mi futuro laboral, por ello gracias.

Ramón Souza, por la ayuda técnica durante el desarrollo de este proyecto, por las diversas discusiones académicas y de temas interesantes que a lo largo de este proceso hemos compartido.

Mis amados hermanos que han soportado todas mis etapas, fueron apoyo en mis momentos de estrés, fueron fortaleza en mis momentos de angustia, y son mi felicidad en mis momentos de logro, siempre nos apoyaremos en cualquier momento.,

Mis amados padres, son tantas las cosas que han hecho por mí no sólo en esta etapa, que escribirlo no es suficiente ya que no podría expresar con simples palabras lo agradecida que estoy.

Mis amigas Fátima Medina Lara, Nancy Ruiz Lau, Rocío Canche Moo, Naivy Gamboa Tec, con las cuales he compartido cosas muy significativas, las cuales atesoro; han sido consejeras, compañía, y apoyo. Vaya momentos que hemos vivido en corto tiempo que describirlos no es posible.

A mis compañeros de laboratorio tanto a los ausentes como a los presentes, en especial a Rosalía Nuñez, la cual fue mi hermana académica hemos pasado al mismo tiempo varias etapas de esta formación; Adolfo Guzmán que me ha permitido tener discusiones de interés y por su guía en partes estadísticas; a Yumi por sus consejos; David que en la parte final de la escritura de este trabajo estaba trabajando hasta tarde y me hacía compañía sin quererlo; Gabriel que contribuyo con sus opiniones mucho antes de iniciar este proceso que ya concluye; a los chicos que han pasado parte de su formación en este laboratorio y han compartido varios momentos en el (Nallely, Carlos, Martha, Doribet, Daniel, Eunice).

## ABREVIATURAS

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ADN                             | Ácido desoxirribonucleico                |
| ARN                             | Ácido ribonucleico                       |
| ADNc                            | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| NO                              | Óxido nítrico                            |
| DD                              | Despliegue diferencial                   |
| MS                              | Murashige y Skoog                        |
| PDA                             | Papa dextrosa agar                       |
| DEPC                            | Dietilpirocarbonato                      |
| RT                              | Transcripción Reversa                    |
| PCR                             | Reacción en Cadena de la Polimerasa      |
| dATP                            | Desoxiadenosina trifosfato               |
| dGTP                            | Desoxiguanosina trifosfato               |
| dCTP                            | Desoxicitidina trifosfato                |
| dTTP                            | Desoxitimidina trifosfato                |
| TE                              | Tris- EDTA                               |
| EDTA                            | Ácido etilendiamino tetracético          |
| NADH                            | Dinucleótido de nicotinamida y adenina   |
| NEDH                            | N-(Naftil) etilendiamina dihidroclorido  |
| Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> | Tungstato de sodio                       |

## RESUMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo importante en Yucatán, debido a su alto consumo y su potencial para la exportación. A nivel mundial, los rendimientos de los cultivos de chile son reducidos constantemente por una serie de plagas y enfermedades virales y fúngicas. Dentro de estas enfermedades se encuentra la conocida como "marchitez del chile", causada por el oomiceto *Phytophthora capsici*. Esta enfermedad tiene una fase destructiva en la corona del tallo, que resulta en el marchitamiento y en el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad, que generalmente avanza a través del tallo y finalmente mata a las plantas susceptibles. El patógeno causa putrefacción en la raíz y la corona en chile y también forma una lesión distintiva negra en el tallo. *Phytophthora capsici* puede también infectar las hojas y causar lesiones que son circulares de color café.

Para comprender cómo algunas plantas sobreviven ante el ataque de un patógeno mientras que otras de la misma especie y que se encontraban a su alrededor mueren, se han realizado amplios estudios que se conocen como la interacción planta-patógeno. Como resultado de la co-evolución de la interacción hospedero-patógeno, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos para protegerse de las enfermedades. Junto al desarrollo de barreras físicas, las barreras químicas dificultan la infección. Una amplia variedad de respuestas de defensa son inducidas sólo después del ataque del patógeno, cuando estas respuestas son disparadas rápidamente y coordinadamente durante una interacción planta-patógeno, la planta es resistente. En una planta susceptible la respuesta de los mecanismos de defensa es más lenta después de la infección. Así, el tiempo de reconocimiento de un microorganismo invasor con la rápida y efectiva inducción de las respuestas de defensa aparentemente es la clave que marca la diferencia entre las plantas resistentes y susceptibles.

Estudios previos de la interacción entre *Capsicum annuum* y *Phytophthora capsici* permitieron establecer un sistema para el estudio y la medida de factores envueltos en la resistencia de plantas al ataque del oomiceto. En análisis de transcritos de genes relacionados con la defensa, tanto en la interacción compatible como en la incompatible, se observó que si bien se tiene la presencia de genes relacionados con la defensa en ambas interacciones, el tiempo de inducción y el nivel de expresión son diferentes para cada una.

Para obtener evidencias de las modificaciones producidas en el hospedero durante los estados tempranos de la marchitez en el chile habanero de la Península de Yucatán, nosotros identificamos genes de *C. chinense* cuya expresión sistémica es modificada por la infección con *P. capsici*. Para ello, aplicamos la técnica de despliegue diferencial para identificar genes expresado en hojas después de la inoculación *in vitro* con micelio de *P. capsici* en las raíces de plántulas de *C. chinense*.

Para ello, se estableció un modelo de estudio en hidroponía, en donde la sintomatología se pudo observar tres días después de la inoculación, con la presencia de una necrosis en la base del tallo. Se observó cambios a nivel transcripcional en tejido sistémico de plántulas infectadas. Dos de los ADNs identificados tienen alta identidad con proteínas que participan en el metabolismo del nitrógeno, otra participa en el proceso de endositosis y una más se une al ADN.

Se observó un incremento a nivel de transcritos y en la actividad enzimática de una nitrato reductasa (nitrato reductasa de *Capsicum chinense*, CcNR), con un alto porcentaje de identidad con otras NRs de solanáceas, desde tiempos tempranos después de la interacción, al igual que *P. capsici*. Las fitohormonas de defensa, ácido salicílico y etileno pero no jasmonato de metilo modifican tanto los transcritos como la actividad enzimática de la CcNR. Ya que la aplicación de las fitohormonas de defensa induce la actividad diferencial de CcNR, es posible que la actividad de CcNR esté relacionado con la respuesta de defensa del hospedero.

## ABSTRACT

Yucatan has greater diversification of hot pepper in Mexico, among which is the Habanero (*Capsicum chinense* Jacq). The habanero pepper is an important crop in Yucatan, due to its high consumption and export. The crop yields are reduced consistently pepper a range of pests, fungal and viral diseases. Among these diseases is known as the "blight" caused by the oomycete *Phytophthora capsici*. This disease has a destructive phase to the crown of the stem resulting in wilting and the development of hypersensitivity reaction, which generally progresses through the stem and eventually kills plants susceptible.

Pathogen causes putrefaction in the root and crown in hot pepper and are also distinctive black lesions on the stem. *P. capsici* can also infect the leaves and causes lesions that are circular brown.

To understand some plants survive the attack of a pathogen while others of the same species that were dying around him there have been extensive studies are known as plant- pathogen interaction. As a result of host-pathogen coevolution, plants have developed sophisticated mechanisms to protect themselves from disease. Besides preformed physical and chemical barriers that hinder infection, a wide variety of defense responses is induced only after pathogen attack. When these induced responses are triggered rapidly and coordinately during a given plant-pathogen interaction, the plant is resistant to disease. A susceptible plant responds more slowly with an onset of defense mechanisms after infection. Thus, the timely recognition of an invading microorganism and the rapid and effective induction of defense responses appear to make a key difference between resistant and susceptible plants.

Previous studies of interaction between *P. capsici*- *Capsicum annum* and allowed to establish a system to the study and measurement factors involved in plant resistance to oomycete attack. In transcript level analysis of defense- related genes in both the compatible and incompatible interactions, it was observed that while there is the presence of defense-related genes in both interaction time and the level of expression are different for each one.

The aim of this study was to identify and isolate genes that are induced in varieties with some degree of tolerance of *Capsicum chinense* by detecting change in gene expression patterns in response to the addition of mycelium of *P. capsici*.

For this purpose, established a model to study hydroponics where the symptoms could be observed three days after inoculation, with the presence of necrosis at the base of the stem. Changes were observed at the transcriptional level in systemic tissue of infected seedlings. Two of the ADNc identified had high identity with proteins involved in nitrogen metabolism, another part in the endocytosis process.

An increase was observed at the transcript and enzyme activity of nitrate reductase (*Capsicum chinense*, CcNR), with a high percentage of identity

with other solanaceae NRs, from early times after interaction, salicylic acid and ethylene but not methyl jasmonate modified both the transcripts and the enzymatic activity of the CcNR, since the application, it is possible that the activity of CcNR this related to a specific host defense response

## INTRODUCCIÓN

Las plantas son utilizadas como fuente de alimento y refugio por un amplio rango de parásitos, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos e insectos. El chile habanero es una hortaliza de importancia comercial en el estado de Yucatán, cuya producción se ve constantemente afectado por varias plagas y enfermedades.

El oomiceto *Phytophthora capsici* afecta un amplio rango de solanáceas y cucurbitáceas a nivel mundial, causa la enfermedad conocida como marchitez del chile en los cultivos de chile, lo cual resulta devastador. Los oomicetos incluyen un único grupo de patógenos de plantas, que desarrollaron la habilidad para infectar plantas, independientemente de los hongos verdaderos. Esto sugiere que los oomicetos pueden tener distintos mecanismos genéticos y bioquímicos para interactuar con las plantas. En estudios de interacción de *Capsicum annuum* - *P. capsici* se ha observado que tanto en las plantas resistentes como susceptibles se inducen genes relacionados con la patogénesis; sin embargo, la intensidad y la velocidad en que éstos lo hacen es lo que determina la resistencia al patógeno (Kim y Hwang, 2000; Lee *et al.*, 2001). También se ha observado que variedades resistentes de *Capsicum* presentan una mayor producción de óxido nítrico (NO), una molécula señalizadora relacionada con las respuestas tempranas de la interacción (Requena *et al.*, 2005).

El reconocimiento de un microorganismo invasor y la rápida y efectiva inducción de las respuestas de defensa son aparentemente la clave que marca la diferencia entre plantas resistentes y susceptibles. La resistencia en las plantas es manifestada por la incapacidad del patógeno para crecer o multiplicarse y extenderse, con frecuencia toma la forma de una reacción de hipersensibilidad (Agríos, 1988). Todo esto es altamente regulado y la modificación de los niveles de transcritos de diversos genes juega un gran papel en las modificaciones inducidas por el reconocimiento del patógeno.

Por lo antes mencionado, el objetivo de este trabajo es demostrar si durante el desarrollo de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en la especie *Capsicum chinense* se modifica la expresión de genes de defensa y del metabolismo en el hospedante. Para ello se evaluó la sintomatología presentada durante la infección y el avance del micelio intracelular durante el transcurso de la enfermedad. Se observó la presencia de una necrosis del tallo al tercer día después de la inoculación y se determinó que en esa etapa de la infección no se tiene contaminación de micelio intracelular. Investigamos si existe la modificación de transcritos en tejido sistémico de plántulas infectadas con el oomiceto, empleando la técnica del despliegue diferencial de transcritos. Los resultados demostraron pocas diferencias en los patrones de transcritos en el tejido sistémico, los cuales codifican genes que participan en diversos procesos metabólicos. Entre los genes

expresados diferencialmente se identificó uno cuya secuencia presentó un nivel alto de similitud con una nitrato reductasa, por lo que se le denominó nitrato reductasa de *Capsicum chinense* (CcNR). La NR es una enzima clave en la asimilación de nitrato y recientemente se ha demostrado que tiene un papel en la respuesta de defensa, participando en la síntesis de NO.

Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se planteó el objetivo de caracterizar con más detalle la regulación de esta enzima en los niveles transcripcional y postraducciona, durante el proceso de infección con *Phytophthora capsici* y en presencia de fitohormonas de defensa, así como su posible participación en la síntesis de NO.

Los resultados demostraron que los transcritos de la CcNR se encuentran presentes en niveles basales en prácticamente en todos los tejidos de la planta. Su nivel de expresión se incrementa rápidamente en tejidos sistémicos cuando las raíces de la plántula son inoculadas con *P. capsici* y al analizar como se ve modificado el patrón de expresión de este gen ante la inducción con diversas fitohormonas, se observó que bajo las condiciones experimentales empleadas, el ácido salicílico (SA) y el etileno (ET) tienen un efecto positivo en los transcritos de CcNR, mientras que el ácido jasmónico (como jasmonato de metilo, MeJa) no tiene un efecto apreciable. Con relación al nivel postraducciona, encontramos que la enzima se activa con una cinética similar a la regulación transcripcional, tanto por la infección como por la adición de las fitohormonas. En cuanto a su papel en la síntesis de NO, parece que en el modelo experimental empleado no tiene una contribución apreciable.

Estos datos sugieren un papel de la CcNR en la defensa del chile habanero durante la infección con el oomiceto *P. capsici*. Sin embargo, debido a que todas las plántulas mueren, es posible que la inducción de la CcNR sea parte de un sistema de defensa que resulta ineficiente, ya sea porque se presenta tardíamente o porque no alcanza un nivel umbral para responder eficientemente ante el ataque del patógeno.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agríos G.N.** (1988) Plant Pathology. Third Edition. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (2000). Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108: 51-60
- Lee S. C., Kim Y. J., Hwang B. K.** (2001) A pathogen-induced chitin-binding protein genes from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. *Plant Cell Physiology*, 42:1321-1330.
- Requena M. E., Gilabert C. E., and Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* 124:50-60.



## CAPÍTULO I. Antecedentes

### 1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ESPECIE *Capsicum chinense* Jacq.

La especie *Capsicum chinense* pertenece al reino *Plantae*, del orden *Solanales*, familia *Solanaceae*. Su centro de diversidad se ubica en la Amazonia, Sur América, con un centro secundario en América Central y las islas del Caribe (Prohens y Nuez, 2008). Se cree que esta especie fue introducida a la Península de Yucatán desde Cuba en tiempos precolombinos a través del comercio de los mayas. Éstas son plantas de ciclo anual, semiperenne, sus frutos son bayas huecas con 3 o 4 lóbulos, los cuales pueden ser de 2-6 cm, en general son de color verde en etapas tempranas y se tornan posteriormente en naranjas, amarillos o rojos en la etapa madura (Soria *et al.*, 2002).

#### 1.1.2. Importancia económica

El chile habanero es un cultivo que se produce en dos ciclos agrícolas y forma parte del grupo de los principales productos hortofrutícolas exportados de Yucatán, Estado con una gran diversidad de chiles criollos en el país, entre los que se encuentra el habanero. La variedad naranja del chile habanero es la que tiene mayor demanda a nivel mundial, ya sea como producto fresco o procesado,

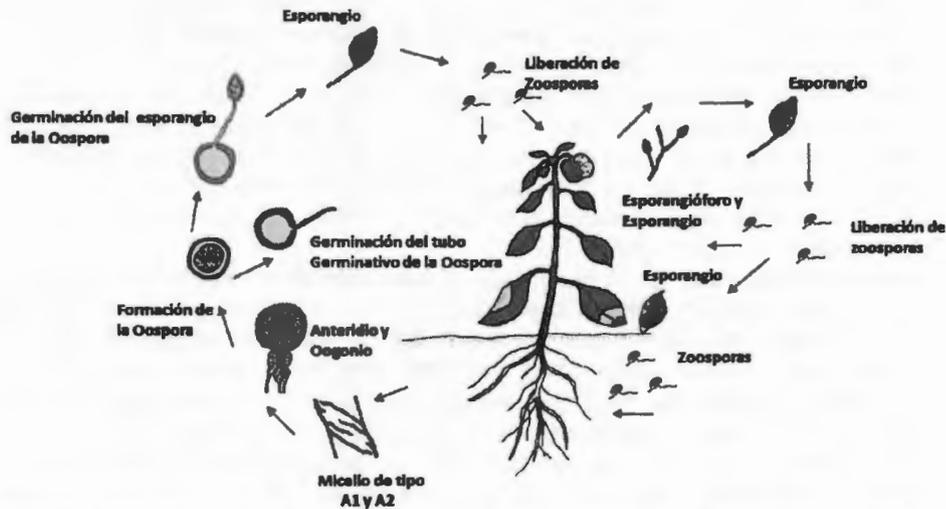
El chile habanero sigue siendo una hortaliza apreciada por los mexicanos. En el ciclo 2009 se produjeron 5,433 toneladas en la Península de Yucatán, con un valor de producción de más de 91 millones de pesos. La producción fue de 2,904 toneladas para Yucatán, de 2,103 para Quintana Roo y de 424 toneladas para Campeche (SAGARPA, Octubre de 2010).

Una característica de esta hortaliza es su importancia social, debido a la enorme cantidad de obra que requiere durante todo su ciclo, reportándose una demanda de 120 a 150 jornales por hectárea. A nivel mundial, los rendimientos de los cultivos de chile son reducidos constantemente por una serie de plagas y enfermedades virales y fúngicas. Dentro de estas últimas la más importante es la conocida como "marchitez del chile", causada por el oomiceto *Phytophthora capsici*. Se estima que la incidencia de la enfermedad en diversas zonas productoras pueden reducir hasta en 50% la población de plantas cultivadas; no obstante, en algunas regiones se ha observado una pérdida total del cultivo cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del patógeno (Vargas *et al.*, 1996).

### 1.1.3. El oomiceto *Phytophthora capsici* como patógeno del género *Capsicum*

Los oomicetos forman parte de un grupo de microorganismos que incluyen algunos de los más notorios patógenos de plantas. Entre estos miembros, el género *Phytophthora* causan enormes pérdidas económicas en cultivos de ciertas especies. Los oomicetos consiguen la colonización de la planta mediante el bloqueo de los circuitos de defensa de la célula hospedera, a través de proteínas conocidas como efectores. Los oomicetos secretan dos clases de efectores con blancos en diferentes sitios en la planta hospedera. Los efectores apoplásticos son secretados en el espacio extracelular; éstos interactúan con blancos extracelulares y receptores de la superficie. El otro tipo de efectores son los citoplásmicos, los cuales son translocados a la célula, presumiblemente a través de estructuras especializadas como vesículas infectivas y haustorios que se invaginan dentro de la célula del hospedero (Kamoun, 2006).

En las plantas susceptibles, estos efectores promueven la infección por supresión de las respuestas de defensa, aumentando la susceptibilidad o induciendo los síntomas de la enfermedad. Alternativamente, en plantas resistentes, los efectores son reconocidos por los productos de los genes de resistencia de la planta, conduciendo a la muerte celular en los tejidos del hospedero que entran en contacto con el patógeno y en una efectiva respuesta conocida como respuesta de hipersensibilidad. Los oomicetos causan enfermedades devastadoras en numerosas plantas de cultivo, ornamentales y silvestres. Entre los oomicetos se incluyen a más de 60 especies del género *Phytophthora*, posiblemente el patógeno más devastador de plantas dicotiledóneas. *Phytophthora* spp. causa enormes pérdidas económicas en importantes especies de cultivo tales como papa, jitomate, chile y alfalfa. La infección por el género *Phytophthora* inicia generalmente cuando zoosporas liberadas del esporangio alcanzan la superficie de hojas o raíces, forman quistes y germinan (Kamoun, 2003). Después de germinar, las zoosporas penetran directamente al tejido del hospedador con la ayuda de enzimas que degradan la pared celular de la planta (Figura 1) (Adorada *et al.*, 2000).



**Figura 1.1.** Ciclo de vida de *Phytophthora capsici*, agente causal de la marchitez del chile. Este patógeno se reproduce de forma sexual como asexual; en la primera forma de reproducción requiere la presencia de dos tipos de micelio para la formación de los gametos masculino y femenino los cuales se fusionan para dar lugar a la Oospora de la cual germinará el esporangio si las condiciones son adecuadas germina el esporangio o el tubo germinativo de la Oospora, el esporangio maduro libera a las zoosporas las cuales son dispersadas y prácticamente infectan cualquier tipo de tejido. Para la reproducción asexual, del micelio de un solo tipo emerge el esporangioforo que luego da lugar a la formación de la esporangia la cual en estado maduro libera zoosporas.

El oomiceto *Phytophthora capsici* causa la enfermedad conocida como marchitez del chile. Esta enfermedad tiene una fase destructiva en la corona del tallo que resulta en marchitamiento y el desarrollo de una reacción de necrosis, la cual generalmente avanza a través del tallo y finalmente las plantas susceptibles mueren. El patógeno causa putrefacción en la raíz y la corona en chile y también forma una lesión distintiva negra en el tallo. *P. capsici* puede también infectar las hojas y causar lesiones que son circulares de color café grisáceo. Lesiones en hoja y tallo son comunes cuando el inóculo es dispersado por salpicadura del suelo a las porciones bajas de la planta. El patógeno también causa infección en fruto y lesiones que son típicamente cubiertas por esporas blancas, lo cual es una señal de la presencia del patógeno (Ristaino y Johnson, 1999).

Por décadas se ha intentado controlar la marchitez del chile mediante el uso de fungicidas y algunas prácticas culturales que en ocasiones han resultado en cierto control; sin embargo, se considera que la mejor forma de controlar

la marchitez del chile es con el uso de variedades resistentes. A nivel mundial, diversos grupos han tratado de desarrollar algunas variedades de chile resistentes a *P. capsici* (Egea *et al.*, 1996; Ristiano y Johnson, 1999)

Estudios previos de la interacción entre *C. annuum* y *P. capsici* permitieron establecer un sistema de estudio de los factores envueltos en la resistencia de plantas al ataque del oomiceto. En esta interacción, el tipo de resistencia es probablemente debido a la reacción de hipersensibilidad que ocurre a nivel del tallo, que detiene la infección inhibiendo el crecimiento del oomiceto (Egea *et al.*, 1996).

En los últimos años se ha observado la inducción de la expresión de genes de defensa tanto en plantas susceptibles como en tolerantes. Kim y Hwang (1994; 1997) reportaron que en tallos de *C. annuum* infectados con *P. capsici* se inducen genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis, como las  $\beta$ -1,3 glucanasas y las quitinasas, las cuales pueden proteger a la planta al degradar la pared celular del oomiceto. Egea *et al.* (1996) demostraron que la acumulación de la fitoalexina capsidiol en las zonas necróticas de *C. annuum* infectadas con *P. capsici*, está aparentemente relacionada con la resistencia.

Se ha observado que los niveles de expresión de genes como el de la proteína PR1 (CaBPR1) o el gen CaSAR8.2, que son inducidos tanto por estrés biótico y abiótico, así como los que codifican a una proteína de unión a quitina (CBP), ascorbato peroxidasa (CAPOA1), tioredoxina peroxidasa (CAPOT1), peroxidasa (CAPO1), y de una proteína transportadora de lípidos (CALTPIII) se expresan tanto en la infección compatible como en la incompatible; sin embargo, se observa una mayor expresión de la mayoría de ellos en la interacción incompatible (Kim y Hwang, 2000; Lee y Hwang, 2003; Lee *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003; Do *et al.*, 2003). En todos los casos anteriores, los autores sugieren la posible participación en la defensa de cada gen estudiado, debido a que se expresa con mayor nivel en la interacción incompatible, proponiendo que la intensidad y la rapidez de la respuesta es la que determina la susceptibilidad o la resistencia al patógeno (Requena *et al.*, 2005).

Sin embargo, los oomicetos están incluidos en un único grupo de patógenos eucariotes de plantas, que ha desarrollado una habilidad de infectar independiente de los hongos verdaderos. Se sugiere que los oomicetos pueden tener un mecanismo distinto de interactuar con la planta (Osborn, 1996). Por tanto, a pesar de que ya se tienen estudios sobre la interacción hospedero-oomiceto, aún se tiene una gran brecha sobre los mecanismos que se ven involucrados en este patosistema, sobre todo a nivel hospedero.

## 1.2. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas son atacadas por muchos microorganismos patógenos, incluyendo bacterias, hongos, virus y nematodos. Las enfermedades de las

plantas pueden causar serias pérdidas a los cultivos, y el aplacamiento químico de estas enfermedades es muy costoso. El control de las enfermedades de plantas es de fundamental importancia y es uno de los objetivos de la investigación de plantas, los programas de patología y la industria química agrícola.

Plantas como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* son modelos para el estudio de la interacción planta-patógeno, gracias a estos modelos se han podido identificar componentes de resistencia del hospedero y vías de señalización relacionadas con la defensa. Según Hammond y Jones (1996), son tres las razones por las que un patógeno falla en la colonización:

- a) La planta no es el nicho que el patógeno requiere (No hospedero).
- b) Las plantas poseen barreras estructurales preformadas o compuestos tóxicos que limitan con éxito a una especie de patógeno (No hospedero resistente).
- c) Sobre el reconocimiento del ataque del patógeno, mecanismos de defensa son elaboradas y la invasión se mantiene localizada (No hospedero resistente).

La primera línea de defensa de las plantas frente al patógeno la constituye su propia superficie que el patógeno debe penetrar para producir la infección. Las defensas estructurales presentes en la planta antes de que se produzca el reconocimiento del patógeno están constituidas por diferentes ceras epicuticulares que con diferentes densidades cubren las células epidérmicas, por la estructura de la pared celular de éstas células, por el tamaño, la localización y la forma de los estomas y las lenticelas, así como por la presencia de estructuras especiales en la epidermis que dificultan la penetración de patógeno, tales como los tricomas y las espinas. Una cutícula gruesa podría incrementar la resistencia a la infección en aquellos casos en los que el patógeno es capaz de producir la infección sólo cuando penetra en el hospedante.

El reconocimiento del invasor tanto en plantas como en animales es mediado por receptores extra e intracelulares. Se ha hipotetizado que las primeras plantas de la tierra contenían receptores transmembranales en su superficie, capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), tales como fragmentos de paredes celulares, quitina o péptidos del flagelo de bacteria. El reconocimiento de los PAMPs dispara la inducción de la respuesta de defensa primaria o basal. La evolución de este sistema inmune puso un obstáculo en las poblaciones de patógenos microbianos, ya que limitó su gama de hospederos y los obligó a desarrollar estrategias para superar la defensa basal. Esta presión de selección dio como resultado el desarrollo de proteínas efectoras de virulencia por parte del patógeno, las cuales suprimen la defensa basal de la planta. En una subsecuente etapa de la evolución en la lucha para combatir estos agentes patogénicos, las plantas desarrollaron los medios para reconocer las proteínas efectoras y establecer una sólida y amplificada respuesta de

defensa. Este tipo de defensa es referida como inmunidad disparada por efectores y es mediada por proteínas R, la cuales son específicas para un patógeno en una variedad específica del hospedero; esto es conocido también como interacción gen a gen (He Ping *et al.*, 2007; Tameling y Takken, 2008).

Diversas evidencias indican que receptores de alta afinidad a señales derivadas del patógeno, median la conversión de la señal extra-membranal en una señal intra-membranal. Subsecuentemente, una transducción de señales es iniciada, disparando la activación de un arsenal de defensas en la célula del hospedero (Nürnberger, 1999).

La defensa de las plantas es un complejo evento fisiológico, como muchos otros procesos biológicos; la complejidad aumenta para el caso de la resistencia contra patógenos, en donde no se sigue la interacción gen-gen, pero que está influenciada por genes inducidos por las moléculas efectoras del patógeno. La respuesta de defensa de la planta ante un patógeno involucra la regulación transcripcional de un gran número de genes. Muchos de estos genes regulados diferencialmente codifican proteínas que participan en las rutas del metabolismo, tanto primario como del secundario, y los cambios en la síntesis de sus productos pueden conducir a la reprogramación del metabolismo celular. Por ejemplo, en el análisis de los cambios transcripcionales durante la interacción incompatible *A. brassicola*-*A. thaliana* por medio de micro-arreglos, se observó la alteración en la transcripción de genes involucrados en la percepción del patógeno, la transducción de señales, la modificación de la pared, el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo secundario. La inducción de estos genes puede activar procesos claves asociados con la defensa de la planta (Schenk *et al.*, 2003; Chen y Chen, 2002).

### **1.2.2. Los inductores como moléculas de reconocimiento**

El reconocimiento del patógeno juega un papel central en la interacción hospedero-patógeno. Las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para detectar a un patógeno potencial y activar varios y diversos mecanismos de defensa. Las moléculas que inducen el reconocimiento son conocidas como inductores. El término "inductor" se utiliza comúnmente para denominar a aquellas moléculas naturales (bióticas), procedentes de la planta (inductor endógeno) o del fitopatógeno (inductor exógeno), que son capaces de inducir respuestas estructurales y/o bioquímicas asociadas a la resistencia de la planta frente al organismo que la ataca (Radman *et al.*, 2003). Los inductores pueden ser clasificados en dos grupos: "inductores generales" (PAMPs), e "inductores raza-específicos" (proteínas de avirulencia). Mientras que los inductores generales son capaces de disparar la defensa, tanto en un hospedero como en un no hospedero, los inductores raza específicos inducen las respuestas de

defensa sólo en los cultivares hospedero específico (Hahn, 1996; Montesano *et al.*, 2003).

La penetración de la pared celular expone a la membrana plasmática del hospedero al microorganismo; sin embargo, los receptores extracelulares reconocen los PAMPs. Al ser percibido el microorganismo, se inicia una inmunidad disparada por los PAMPs, también conocida como sistema inmune basal. La inducción del sistema inmune basal está asociado con la señalización mediado por las MAP cinasas y la inducción de la transcripción de genes de respuesta contra el patógeno. Los PAMPs, inductores generales que forman parte de un elemento estructural del microorganismo (el cual puede o no ser patogénico), son moléculas altamente conservadas que son esenciales para la viabilidad de una amplia clase de organismo. Muchas de estas moléculas se encuentra presentes en la pared celular como componentes estructurales, tal como los glucanos y la quitina, como bien la flagelina y los lipopolisacáridos de bacterias (Ausebel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Mackey y McFall, 2006; Jones y Dangl *et al.*, 2006).

Los microorganismos patogénicos han desarrollado medios que suprimen el sistema de defensa basal, interfiriendo el reconocimiento o secretando proteínas efectoras en el citosol del hospedero, las cuales presumiblemente alteran la señalización de resistencia o manifestación de la respuesta de resistencia. Los efectores son moléculas derivadas del patógeno cuya actividad intrínseca promueve la virulencia mediante la interacción con alguna proteína del hospedero. Sin embargo, algunos efectores tienen una participación antagonista, al promover la virulencia del patógeno por inducir la defensa del hospedero; estos efectores son conocidos como "inductores raza específicos", los cuales son producto de un gen *avr* del patógeno. La inmunidad disparada por un efector involucra el reconocimiento directo o indirecto de la proteína usada para suprimir la defensa basal, por una proteína codificada por un gen *R* del hospedero. La inmunidad disparada por un efector es acelerada y amplifica la defensa basal, resultando en una resistencia contra la enfermedad, usualmente, se tiene una respuesta de hipersensibilidad en el sitio de la infección (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl *et al.*, 2006).

### **1.2.3. Receptores celulares**

Diversos elicitores estructurales de varios patógenos se ha visto que disparan el mecanismo de defensa en plantas. Se asume que los elicitores son reconocidos por receptores. Los receptores de plantas que reconocen elicitores derivados de hongo aparentemente residen preferentemente en la membrana plasmática, mientras que los elicitores virales y bacterianos pueden entrar a la célula de la planta y son preferentemente intracelularmente (Nurnberge, 1999).

La función de un receptor comprende el percibir la señal y subsecuentemente activar elementos debajo de la transducción de señales. El reconocimiento de un patógeno puede ser raza-específico o raza-no específico.

Los receptores que tienen participación en el reconocimiento raza-no específica tienen afinidad por moléculas conocidas como inductores generales estimulando la defensa en todos los cultivares de, al menos, una especie de planta a un amplio rango de patógeno.

Durante la última década, varios tipos de receptores raza-no específico han sido identificados en plantas. De acuerdo con sus características estructurales, éstos han sido clasificados en diferentes categorías incluyendo receptores tipo cinasas (RLKs), receptores de histidina- cinasa y receptores con diferente número de dominios transmembranales (Satterlee y Sussman, 1998; Walker, 1994; Grignon, 1999). Los receptores RLK se caracterizan por tener un dominio extra-membranal que probablemente esté involucrado en la percepción de la señal, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático, que puede iniciar la transducción de señales en la célula. Entre los receptores RLKs ampliamente estudiados está FLS2, el cual reconoce un fragmento de 22 aminoácidos altamente conservado de la proteína flagelina y el receptor EFR que reconoce al factor de elongación bacteriana EF-TU.

Por el contrario, los receptores que tienen participación en el reconocimiento raza-específico están acorde con la hipótesis gen-gen, ya que éstos reconocen a moléculas inductoras raza-específico, las cuales son producto de los genes de avirulencia (*avr*) del patógeno, confiriendo resistencia sólo al hospedero que tenga el correspondiente gen de resistencia (*R*), el cual codifica al receptor (Nürnberg, 1999).

Especies de *Phytophthora* secretan pequeñas proteínas extracelulares llamadas elicinas. Estas proteínas disparan una respuesta de defensa local (respuesta de hipersensibilidad) y distante en ciertas plantas de la familia de las *Solanaceae* y *Cruciferae* (Kamoun *et al.*, 1994). Se han aislado de filtrados de cultivo de *P. cryptogea* y *P. capsici* elicinas llamadas criptogefina y capsiceína, respectivamente. El tratamiento de plantas de tabaco con purificados de elicinas o la expresión de algún gen de elicina en tabaco transgénico inducen resistencia a *P. parasitica*, lo cual demostró que este SAR es eficiente contra otros fitopatógenos de tabaco, ante esto se consideró que las elicinas son inductores poderosos y confieren una protección específica a tabaco ante una amplia variedad de patógenos.

Cuando un patógeno interactúa con una planta potencialmente hospedera, puede colonizar exitosamente a la planta y causar la enfermedad; en este caso se dice que el patógeno es virulento, la planta es susceptible, y la interacción es compatible. Alternativamente, la planta puede responder contra el patógeno con una rápida activación de una batería de respuestas de defensa, interfiriendo con la multiplicación del patógeno, y previniendo la

enfermedad. En este caso se dice que el patógeno es avirulento, la planta es resistente y la interacción es incompatible.

El resultado de estas interacciones es apropiado con el modelo gen a gen acuñado por Flor (1947), durante sus primeros estudios de genética clásica del lino. En este modelo la resistencia resulta cuando un patógeno posee un particular gen de avirulencia (gen *avr*), cuyo producto interactúa con el correspondiente producto de un gen particular de resistencia en el hospedero (gen *R*). En general, cada gen *R* confiere resistencia sólo al patógeno que lleva el correspondiente gen *avr*. Las respuestas de resistencia fueron observadas en interacciones de plantas con una gran variedad de patógenos, incluyendo hongos, bacterias y virus. Una simple explicación molecular de la resistencia gen a gen es que el gen *avr* codifica ligandos que pueden unirse a receptores codificados por los genes *R* de las plantas. Al unirse, los ligandos disparan la activación de cascadas de transducción de señales culminando en la expresión de respuestas de defensa que inhiben al patógeno y confieren resistencia (Glazebrook *et al.*, 1997).

La mayoría de las proteínas codificadas por los genes *R* caen dentro de cinco clases basadas principalmente en la presencia de un número limitado de motivos estructurales.

- La clase 1 consiste de simplemente un miembro, Pto de jitomate, el cual tiene una región catalítica de cinasa de serina/treonina y un motivo de miristoilación en su dominio N terminal.
- La clase 2 comprende un gran número de proteínas que tienen una región repetida rica en leucinas (LRRs), un sitio de unión a nucleótidos (NBS), y un cierre de leucina (LZ) u otra secuencia coiled-coil (CC).
- La clase 3 es similar a la clase 2 pero en lugar de la secuencia CC estas proteínas tienen una región con una similitud a la región N terminal del receptor Toll de interleucina 1 (IL-1R) que es por consiguiente llamada la región TIR.
- La clase 4 está formada por las proteínas Cf de tomate. Éstas carecen de un dominio NBS y en cambio tienen un dominio TM, un dominio LRR extracelular y pequeños motivos putativos citoplasmáticos.
- La clase 5 consiste en la proteína Xa21 de arroz, que, además de un dominio LRR extracelular y un dominio TM, tiene una región de cinasa de serina/treonina citoplasmática.

Las proteínas *R* de las primeras tres clases carecen de dominio transmembranal (TM) y se piensa que todas están localizadas intracelularmente. Las proteínas *R* que no encajan en ninguno de los cinco grupos antes mencionados se clasifican en un grupo 6 (Martin *et al.*, 2003). El cuadro 1 (Modificación de Martin *et al.*, 2003) muestra diferentes clases de genes *R* y los correspondientes genes *avr*, junto con los organismos que poseen dichos genes.

**Cuadro 1.1. Genes de resistencia aislados de diferentes plantas.**

| <b>Clase</b> | <b>Gen R</b>      | <b>Planta</b>   | <b>Patógeno</b>                              | <b>Gen Avr</b>            |
|--------------|-------------------|-----------------|--|---------------------------|
| 1            | Pto               | <i>Jitomate</i> | <i>P. syringae</i>                           | AvrPto,<br>AvrPtoB        |
| 2            | Bs2               | Chile           | <i>X. campestris</i>                         | AvrBs2                    |
|              | Dm3               | Lechuga         | <i>B. lactucae</i>                           |                           |
|              | Gpa2 <sup>a</sup> | Papa            | <i>Globodera pallida</i>                     |                           |
|              | Hero              | Papao           | <i>G. rostochiensis</i><br><i>G. pallida</i> |                           |
|              | HRT <sup>b</sup>  | Arabidopsis     | Turnip Crinkle<br>Virus                      | Proteína de la<br>cápside |
|              | I2                | Jitomate        | <i>Fusarium</i><br><i>oxysporum</i>          |                           |
|              | Mi                | Jitomate        | <i>Meloidogyn</i><br><i>incognita</i>        |                           |
|              | Mi                | Jitomate        | <i>Macrosiphum</i><br><i>uphorbiae</i>       |                           |
|              | Mla               | Cebada          | <i>Blumeria graminis</i>                     |                           |
|              | Pib               | Arroz           | <i>Magnaporthe</i><br><i>grisea</i>          |                           |
|              | Pi-ta             | Arroz           | <i>M. grisea</i>                             | AVR-Pita                  |
|              | R1                | Papa            | <i>Phytophthora</i><br><i>infestans</i>      |                           |
|              | Rp1               | Maiz            | <i>Puccinia sorghi</i>                       |                           |
|              | RPM1              | Arabidopsis     | <i>P. syringae</i>                           | AvrRpm1,<br>AvrB          |
|              | RPP8 <sup>b</sup> | Arabidopsis     | <i>Peronospora</i><br><i>parasitica</i>      |                           |
|              | RPP13             | Arabidopsis     | <i>P. parasitica</i>                         |                           |
|              | RPS2              | Arabidopsis     | <i>P. syringae</i>                           | AvrRpt2                   |
|              | RPS5              | Arabidopsis     | <i>P. syringae</i>                           | AvrPphB                   |
|              | Rx1a              | Papa            | Potato Virus X                               | Prteína de la<br>cápside  |
|              | Rx2               | Papa            | Potato Virus X                               | Proteína de la<br>cápside |

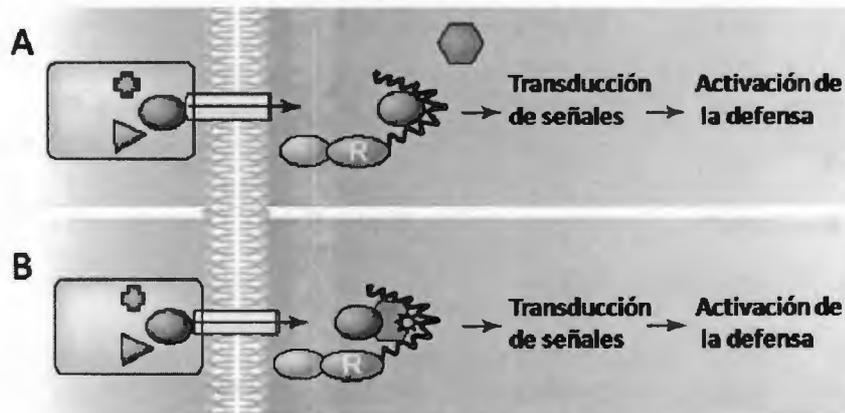
**Cuadro 1.1. Genes de resistencia aislados de diferentes plantas.**

| <b>Clase</b> | <b>Gen R</b>                       | <b>Planta</b> | <b>Patógeno</b>                   | <b>Gen Avr</b> |
|--------------|------------------------------------|---------------|-----------------------------------|----------------|
|              | Sw-5                               | Jitomate      | Tomato Spotted<br>Wilt Virus      |                |
|              | Xa1                                | Arroz         | <i>X. oryzae</i>                  |                |
| <b>3</b>     | L                                  | Lino          | <i>Melampsora lini</i>            |                |
|              | M                                  | Lino          | <i>M. lini</i>                    |                |
|              | N                                  | Tabaco        | Virus Mosaico del<br>tabaco       | Helicase       |
|              | P                                  | Lino          | <i>M. lini</i>                    |                |
|              | RPP1                               | Arabidopsis   | <i>P. parasitica</i>              |                |
|              | RPP4                               | Arabidopsis   | <i>P. parasitica</i>              |                |
|              | RPP5                               | Arabidopsis   | <i>P. parasitica</i>              |                |
|              | RPS4                               | Arabidopsis   | <i>P. syringae</i>                | AvrRps4        |
| <b>4</b>     | Cf-2 <sup>c</sup>                  | Jitomate      | <i>Cladosporium<br/>fulvum</i>    | Avr2           |
|              | Cf-4 <sup>d</sup>                  | Jitomate      | <i>C fulvum</i>                   | Avr4           |
|              | Cf-5 <sup>c</sup>                  | Jitomate      | <i>C fulvum</i>                   |                |
|              | Cf-9 <sup>d</sup>                  | Jitomate      | <i>C. fulvum</i>                  | Avr9           |
| <b>5</b>     | Xa21                               | Arroz         | <i>Xanthomonas<br/>oryzae</i>     |                |
| <b>6</b>     | Hm1                                | Maíz          | <i>Cochliobolus<br/>carbonum</i>  |                |
|              | HS1 <sup>pro-1</sup>               | Betabel       | <i>Heterodera<br/>schachtii</i>   |                |
|              | Mlo                                | Cebada        | <i>B. graminis</i>                |                |
|              | Rpg1                               | Cebada        | <i>Puccinia graminis</i>          |                |
|              | RPW8                               | Arabidopsis   | <i>Erisyphe<br/>chicoracearum</i> |                |
|              | RRS1-R                             | Arabidopsis   | <i>Ralstonia<br/>solanacearum</i> |                |
|              | RTM1                               | Arabidopsis   | Tobacco Etch<br>Virus             |                |
|              | RTM2                               | Arabidopsis   | Tobacco Etch<br>Virus             |                |
|              | Ve1 <sup>o</sup> ,Ve2 <sup>o</sup> | Jitomate      | <i>Verticillium<br/>alboatrum</i> |                |

Como la mayoría de los genes R aislados codifican proteínas que poseen dominios característicos de proteínas receptoras de mamíferos, insectos y levaduras, se sugiere que estas proteínas (productos de los genes R) actúan como receptores de las proteínas Avr de los patógenos iniciando una señal, activando las respuestas de defensa y por ende evitando la propagación del patógeno (Gachomo *et al.*, 2003).

La simple versión del modelo clásico receptor–elicitor predice una interacción directa entre la proteína R y la correspondiente proteína Avr, aunque intensos esfuerzos con numerosos genes R y proteínas Avr han revelado sólo dos interacciones directas. La falta de demostraciones de la interacción directa gen R-gen Avr, lleva a la formulación de la hipótesis del guardián. Este modelo predice que la proteína R activa la resistencia cuando ésta interactúa con otra proteína de la planta (guardián), la cual es blanco del patógeno, el cual la modifica (Figura 2).

Evidencias de este modelo fueron reportados para una proteína R (RPM1) de (Guardia) y su posible interacción con una proteína R (RIN4) ambas de *Arabidopsis* que se ve modificada por proteínas avr de *Pseudomonas syringae* (Mackey *et al.*, 2002).



Modificado de McDowell and Woffenden, 2003..

**Figura 1.2.** Modelos de la interacción entre los productos del gen avr del patógeno y del gen R de la planta. (A) La hipótesis clásica, interacción directa entre los productos del gen R y de los genes avr (*Pita/AVRPita*; *Pto/AVRPto*) (B) La hipótesis del guardián, en el cual una molécula del hospedante detecta la unión, directa o indirecta, entre los productos de los genes R y avr (*RIN4/AvrRpm1/RPM1*).

Existen loci río abajo de las secuencias de los genes R y los genes que codifican proteínas de las vías de transducción de señales, en donde se

localizan genes para la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis y con enzimas involucradas en la generación de fitoalexinas, en la protección contra el estrés oxidativo, en la reparación de tejidos y en la lignificación. Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis de diferentes especies de plantas han sido caracterizadas y clasificadas de acuerdo a la similitud entre sus secuencias (Loon, 1997).

#### **1.2.4. Respuestas tempranas ante el reconocimiento de un patógeno**

Dentro de los cambios observados en etapas tempranas después del reconocimiento del patógeno se encuentran un estallido oxidativo (resultando en la producción de especies reactivas de oxígeno) y un rápido flujo de iones a través de la membrana plasmática. Mediante el reconocimiento con receptores en el sitio de la infección se inicia un proceso sistemático y celular de señalización que activa múltiples procesos de defensa a nivel local y sistemático. La resistencia local ocurre en forma rápida, mientras que el desarrollo de la resistencia sistémica posterior es lenta (Scheel, 1998). Las reacciones tempranas de las células de las plantas incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana, principalmente en el influjo de calcio y protones y del eflujo de potasio y cloro, con una subsecuente producción extracelular de intermediarios de oxígeno reactivo, como el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y de radicales de hidroxilo (McDowell y Dangl, 2000). Por otro lado, en la década de los 90's el óxido nítrico (NO) fue blanco en la investigación vegetal. Como en mamíferos, el NO funciona como señal de amplio espectro en procesos fisiológicos en las plantas. Publicaciones recientes proveen evidencias de la función del NO como señal en células de plantas expuestas a estrés abiótico y biótico (Wendehenne *et al.*, 2005). El incremento de la producción de NO ocurre durante varias interacciones planta-patógeno. La adición de inductores específicos y generales de defensa de plantas produce NO en tejido de planta y cultivo celular. El NO junto con las especies reactivas de oxígeno, están involucrados con la muerte celular localizada en tejido del hospedero durante la interacción planta-patógeno de tipo incompatible.

La respuesta de hipersensibilidad (HR) es una de las respuestas tempranas, la cual es caracterizada por una muerte programada, localizada de células y tejidos en el sitio de la infección (Van, 1997). Como resultado, el patógeno es confinado en el sitio de infección. Un aro de células alrededor de la lesión necrótica vuelve a esta zona totalmente refractaria en una subsiguiente infección, conocida como resistencia adquirida localizada (Fritig *et al.*, 1998). Entre las alteraciones metabólicas que se incluyen en la resistencia adquirida localizada se encuentran el reforzamiento de la pared celular, la estimulación de síntesis de metabolitos secundarios con actividad

antimicrobiana, y de reguladores tales como el ácido salicílico, el etileno y diversos metabolitos derivados de lípidos (Fritig *et al.*, 1998; Hahn, 1996).

### 1.2.5. Resistencia sistémica adquirida

Las respuestas de defensa locales, específicamente las desarrolladas por las células del aro que bordea al sitio de la infección, a menudo disparan la señalización química a nivel sistémico, para el establecimiento de una resistencia no específica por toda la planta, proporcionando una protección durable contra infecciones de un amplio rango de patógenos (Pieterse *et al.*, 2009; Sticher *et al.*, 1997). Esta resistencia sistémica a la enfermedad de larga duración y de amplio espectro es referida como resistencia sistémica adquirida (SAR).

Es claro que el ácido salicílico (SA) juega un importante papel en el establecimiento de la SAR. Para el establecimiento de SAR se requiere del movimiento de una señal a través del floema del tejido infectado al tejido sistémico. Diversas controversias se tienen sobre cual es la molécula señal de movimiento sistémico para establecimiento de SAR. Inicialmente, el SA fue la molécula propuesta como la señal móvil, debido a que estudios como los realizados por Ryals *et al.*, (1995) proponen que la acumulación de SA es requerido para la inducción de SAR. Aunque el SA no es aparentemente la señal de traslocación, está involucrado en la transducción de la señal. Park *et al.*, (2007) proponen que el salicilato de metilo (MeSa) es la señal que se mueve a través del floema para el establecimiento de SAR y a la proteína SAPB2 como el receptor de ésta en el tejido sistémico. Sin embargo, ellos comentan que pueden ser dos las señales que se translocan para inducir SAR: proponiendo a una molécula de un derivado lipídico y a MeSa.

Existen varios trabajos que sugieren que una molécula de base lipídica puede ser la señal móvil para SAR. Maldonado *et al.*, (2002) observaron que plantas mutantes de *Arabidopsis* defectuosas en inducir resistencia (*dir1*) tienen un desarrollo normal local de la resistencia a patógenos, pero es incapaz de desarrollar SAR o la expresión de genes PR en hojas sistémicas. DIR1 codifica una putativa proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), proponiéndose que DIR1 interactúa con moléculas derivadas de lípidos para promover la señal de larga distancia.

Moléculas lipídicas tal como oxilipinas, ácido fosfatídico, y las N-aceletanolaminas son sintetizados o liberados de la membrana después del ataque del patógeno o el insecto. Algunos actúan como mensajeros secundarios en la señal de defensa en la planta. En *Arabidopsis* PAD4 y EDS1 codifican putativas lipasas y pueden iniciar la liberación de señales móviles derivados de lípidos. DIR1 puede ser una coseñal o actuar como un translocador para liberar la señal móvil en el sistema vascular o acompañar

la señal atra ves de la planta y haber con ello el desarrollo de SAR (Maldonado *et al.*, 2002).

#### **1.2.6. El ácido salicílico (SA), el etileno (ET) y el ácido jasmónico (JA)**

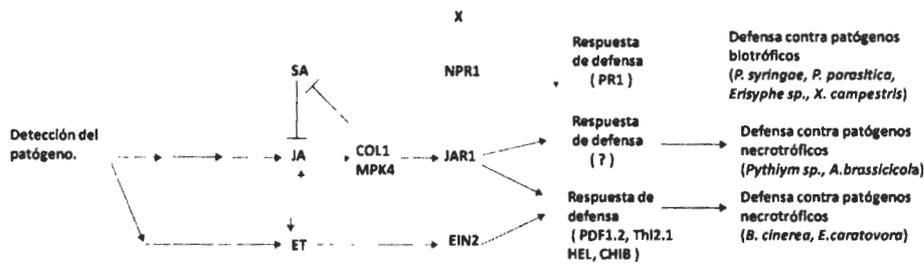
La infección por el patógeno estimula la síntesis de una o más fitohormonas señalizadoras, dependiendo del tipo de ataque (Pieterse *et al.*, 2009).

Se ha observado a lo largo de varios estudios que las rutas de señalización de la defensa de las plantas ante el estrés biótico no son lineales. El reconocimiento y la respuesta al ataque de patógenos e insectos involucran, en muchos casos, circuitos paralelos que activan múltiples componentes de defensa. Las rutas de señalización activan respuestas de defensa contra diferentes estímulos que no son independientes pero están interconectados y cooperativamente estables, como interacciones sinérgicas o antagonistas. El entrecruzamiento de rutas de señalización agrega plasticidad a las respuestas de defensa.

Tres reguladores del crecimiento vegetal, u fitohormonas específicas de plantas, el SA, el JA y el ET, son las mayores señales endógenas involucradas en comunicar sistémicamente la presencia de la infección y disparar la respuesta de defensa de la planta. Los niveles de etileno aumentan en plantas al ser dañadas o al ser infectadas por algún patógeno, incluso al ser tratadas con algún inductor (Setterblad *et al.*, 2000). También, el JA (o el jasmonato de metilo) se acumula local y sistémicamente durante la respuesta a las heridas o al tratar a la planta con algún inductor. Estas moléculas señalizadoras están involucradas en lo que aparentemente son dos caminos de señalización de defensa contra patógenos: un camino dependiente del SA y otro independiente de él, que envuelve al JA y al ET. Estas rutas no funcionan de forma independiente, sino que influyen uno con el otro en una compleja red de regulación.

El SA está vinculado con la respuesta contra virus como el virus del mosaico del tabaco (TMV), las bacterias biotróficas y algunos hongos. Estas interacciones están asociadas en muchos casos con el desarrollo de la HR, que resulta en la muerte de la célula privando de nutrientes a los patógenos biotróficos. Por lo contrario, la HR puede no ser eficiente contra patógenos necrotróficos.

Por otro lado, el ET y el MeJA están asociados con mecanismos de defensa contra patógenos necrotróficos; sin embargo, este comportamiento no es universal, ya que se ha observado que estas fitohormonas están envueltas también en la defensa de algunos patógenos biotróficos.



Modificación de Kunkel y Brooks, 2002.

**Figura 1.3.** Las respuestas de defensa de la planta al ataque de microorganismos son reguladas a través de complejas redes de rutas de señalización que involucran a tres fitohormonas: SA, JA, y ET. Las rutas de señalización mediados por SA y JA son mutuamente antagonicos. Esta regulación cruzada puede estar involucrada en la afinada inducción de la planta de las respuestas de defensa a diferentes patógenos de una forma precisa.

Varios estudios proveen evidencias de interacción positiva entre las rutas de señalización del JA y el ET (Kunkel y Brooks, 2002). La interacción entre estas dos vías pueden ser secuencial, cooperativa o sinérgica, dependiendo del agente causal de la infección. Por ejemplo, el JA y el ET actúan sinérgicamente para inducir algunas proteínas relacionadas con la defensa como es la defensina (PDF1.2), la quitinasa básica (b-CH), la osmotina y otros.

Existen evidencias que sugieren una regulación tanto positiva como negativa en las interacciones entre las rutas de señalización mediadas por el ET y por el SA. Interesantemente, muchos de los casos reportados del entrecruzamiento entre los caminos de señalización del SA y del JA/ET son interacciones negativas, de tal manera que la inducción de la defensa activada por uno, inhibe la defensa activada por el otro. Un ejemplo de esto es observado en las mutantes *eds4* y *pad4* de *A. thaliana*, que son incapaces de acumular SA y exhiben una mayor expresión de los genes dependientes de JA.

Efectos negativos del JA en la síntesis o señalización del SA han sido documentados. Una señalización constitutiva del JA en las mutantes *cev1* de *Arabidopsis* suprime la expresión de genes de defensa dependientes del SA, además de tener una activación de la ruta de señalización JA/ET por la sobreexpresión del factor transcripcional de respuesta al etileno (ERF1), resultando en una reducción de la resistencia contra bacterias biotróficas.

También se ha observado una regulación negativa entre el ET y el SA. Se ha reportado que el tratamiento con SA inhibe la expresión inducida por ET de los genes de glucanasa básica y de osmotina en jitomate.

### 1.2.7. La regulación de la expresión de genes de defensa

La inducción de genes ante un estrés ocurre primero a nivel de la transcripción. La regulación de la expresión de genes específicos, tanto temporal como espacial, es una parte importante de la respuesta de la planta ante determinado estrés. Como componentes de las moléculas de señalización, se encuentran los factores transcripcionales. Un factor transcripcional es una proteína compuesta de un dominio de unión al ADN y un dominio efector responsable para activar o reprimir la actividad de algún gen. El genoma de *Arabidopsis* codifica alrededor de 1500 factores de transcripción (Singh *et al.*, 2002; Rojo *et al.*, 2003). Los factores transcripcionales desempeñan una función importante en la regulación de la expresión de genes de defensa y la respuesta de resistencia. Se han identificado cuatro familias de factores de transcripción en plantas asociados con la respuesta de defensa, los cuales son AP2/EREBP, bZIP, Myb y WRKY.

Otros elementos que participan en la regulación de la expresión de genes son los elementos en *cis*, que ocurren en diferente número y combinación en los promotores génicos. Varios elementos de regulación en *cis* de los promotores que median la expresión de los genes PR han sido identificados. Estos elementos de regulación en *cis* incluyen la caja W(TTGACC), la caja GCC (AGCCGCC), la caja G (CACGCC), la secuencia MRE, y elementos de respuesta al ácido salicílico como as-1(TGACGTCA). En el promotor del gen relacionado con la respuesta a patógenos defensina (PDF1.2) se ha identificado un elemento de la caja GCC seguido por un elemento de la caja G, el factor transcripcional de respuesta a ET (ERF1) se puede unir a la primera caja y el factor de respuesta a JA (AtMYC2) se une a la caja G. La posible competencia de unión de los factores transcripcionales determinan la expresión del gen ante el estímulo por ET o por JA (Boter *et al.*, 2004).

Al combinar a los elementos de regulación en *cis* con los de *trans*, se tiene un sistema complejo de regulación, en donde el promotor de un mismo gen que se expresa ante estrés, tiene varios elementos en *cis*, y en donde los elementos en *trans* compiten uno a otro según el estímulo.

### 1.3. IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

En vista de que un análisis de los patrones de expresión génica para identificar genes individuales puede relacionar las funciones de genes específicos con procesos del desarrollo o del establecimiento de actividades metabólicas o moleculares, los métodos experimentales desarrollados para analizar la expresión génica diferencial han tenido un gran avance en los últimos años. Algunos genes cuya expresión es modificada durante la infección codifican diferentes tipos de proteínas, involucradas tanto en

mecanismos celulares, así como también en respuestas de defensa, entre las que podemos mencionar factores de transcripción (Lin *et al.*, 2004) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (He *et al.*, 1999), entre otras.

Se han realizado estudios sobre la expresión diferencial durante la respuesta contra patógenos con la finalidad de identificar genes que se inducen o reprimen durante la interacción planta-patógeno, para la cual se han empleado técnicas como el despliegue diferencial de ARN (DD), el análisis de polimorfismo de fragmentos de ADNc amplificados (AFLP), análisis serial de la expresión génica (SAGE), la hibridación substractiva y el análisis por microarreglos.

La flexibilidad del despliegue diferencial para comparar varios subconjuntos de la población de transcritos simultáneamente en un solo gel hace de este método una alternativa atractiva para estudiar las complejas interacciones planta-patógeno (Seehaus y Tenhaken, 1998; Yamazaky y Saito, 2002).

Un ejemplo de la aplicación de esta técnica para identificar genes es el reportado por Sanabria y Dubery (2006), en donde se identificaron los ADNc de genes inducidos por un liposacárido de *Burkholderia cepacia* en células de tabaco, entre los que se incluye homólogos de un receptor tipo cinasa, una proteína de unión para proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III, el gen N de resistencia contra virus, así como la cinasa *Pto*, el único miembro de la clase 1 de los genes R.

#### .1.4. JUSTIFICACIÓN

El chile es una hortaliza muy apreciada a nivel mundial. El Estado de Yucatán es uno de los productores más importantes de esta solanácea, siendo el chile habanero el cultivo de más arraigo.

Los cultivos de chile se ven afectados por diversos patógenos, entre los que destaca el oomiceto *P. capsici*, agente causante de la marchitez del chile por *Phytophthora* (*Phytophthora blight*). La marchitez del chile por *Phytophthora* causa grandes pérdidas del cultivo en todo el mundo. A pesar de que existen numerosos estudios sobre la interacción hospedero-oomiceto, todavía existe una gran brecha sobre el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales *P. capsici* bloquea la respuesta de defensa en prácticamente todos los miembros del género *Capsicum*.

Se sabe que durante la interacción con un patógeno, en el hospedero son modificadas un gran número de proteínas que tienen participación en diversas rutas metabólicas necesarias para el establecimiento de la defensa; sin embargo, a pesar de que algunas proteínas de defensa se expresan tanto en la interacción compatible como en la incompatible, al parecer el tiempo y la intensidad con que estas proteínas se expresan es importante para el establecimiento de la defensa. En estudios realizados en *C. annuum*, se ha observado la expresión de algunos genes relacionados con la defensa contra *P. capsici*, tanto en la interacción compatible como en la incompatible. No obstante, son pocos los estudios moleculares desarrollados en este patosistema, por lo que es de particular interés el estudio de los cambios de la expresión de la población de transcritos en la interacción *Capsicum chinense-Phytophthora capsici*.

El conocimiento de las variaciones en la población de transcritos durante esta interacción podría ayudar a comprender el por qué aún no se cuenta con una planta del género *Capsicum* resistente a este oomiceto.

## 1.5. HIPÓTESIS

Dado que la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en *Capsicum chinense* produce la muerte del hospedante, la síntesis de transcritos correspondientes a genes de defensa y del metabolismo vegetal podrían modificarse durante la infección.

## 1.6. OBJETIVOS

### 1.6.1. Objetivo general

Demostrar si durante el desarrollo de la enfermedad causada por *Phytophthora capsici* en la especie *Capsicum chinense* se modifica la expresión de genes de defensa en el hospedante.

### 1.6.2. Objetivos específicos

- 1) Establecer un sistema para la inoculación con *P. capsici* en plántulas de *C. chinense*.
  - a. Establecer un cultivo hidropónico de chile habanero.
  - b. Inducir la enfermedad *in vitro* mediante la inoculación con el oomiceto en las raíces.
- 2) Identificar transcritos acumulados diferencialmente durante el desarrollo sistémico de la marchitez del chile.
  - a. Aplicar la técnica del despliegue diferencial de ARNm.
- 3) Analizar las posibles funciones de los transcritos identificados en la resistencia contra patógenos.
  - a. Corroborar su inducción durante el desarrollo de la enfermedad.
  - b. Comparación sus secuencias en bancos de datos.
  - c. Caracterizar los efectos de las fitohormonas SA, JA, y ET sobre ellas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adorada D.L., Biles C.L., Liddell C.M., Fernández P., Waugh K.O., Waugh M.E.** (2000) Disease development and enhanced susceptibility of wounded pepper roots to *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 49:719-726.
- Ausubel F. M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animal conserved?. *Nature Immunology*, 6:973-979.
- Boter M., Ruíz O., Abdeen A., Prat S.** (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Gene and Development*, 18:1577-1591.
- Chen C., Chen Z.** (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiology*, 129: 1–11.
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814.
- Do H. M., Hong J. K., Jung H. W., Kim S. H., Ham J. H., Hwang B. K.** (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*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 16:196–205.
- Egea C., Alcázar M. D., Candela M. E.** (1996) Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum*, 98: 737-792.
- Fritig B., Heitz T., Legrand M.** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, 10:16-22.
- Gachomo E.W., Shonukan O.O., Kotchoni S.O.** (2003) The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal of Biotechnology* 2:26-32.
- Glazebrook J., Rogers E. E., Ausubel F.M.** (1997) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review Genetics*, 31: 547–69
- Grignon C.** (1999) Recent advances on proteins of plant terminal membranes. *Biochimie*, 81: 577-596.
- Hahn M.G.** (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annual Review Phytopathology*, 34: 387-412.

- Hammond-Kosack K. E., Jones J. D. G.** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8: 1773-1791.
- He C., Fong SH, Yang D., Wang G.L.,** (1999) BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12:1064-1073
- He P., Shan L. Sheen J.** (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology*, 9:1385-1396.
- Jung H. W., Kim W., Hwang B. K.** (2003). Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell and Environment*, 26: 915–928.
- Jones J. D. G., Dangl J. L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, 444: 323-329.
- Kamoun S., Young K., Forster H., Coffey M. D., Tyler B. M.,** (1994) Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:1593-1598.
- Kamoun S.** (2003) Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*, 2:191-199.
- Kamoun S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 41-60.
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (1994) Differential accumulation of  $\beta$ -1-3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45:195–209.
- Kim, Y. J., Hwang B. K.** (1997) Isolation of a basic 34 kiloDalton  $\beta$ -1-3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50: 103–115.
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108: 51–60.
- Kunkel B. N. and Brooks D. M.** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 325–331
- Lee S. C., Kim Y. J., Hwang B. K.** (2001) A pathogen-induced chitin-binding protein genes from pepper: its isolation and differential expression in

- pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. *Plant Cell Physiology*, 42:1321-1330.
- Lee S. C., Hwang B. K.** (2003) Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Planta*, 216: 387–396.
- Lin J., Brader G., Palva ET.** (2004) The WRKY 70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate mediated and salicylate mediated signal in plant defense. *The Plant Cell*, 16: 319-331.
- Loon L.C.** (1997) Induced resistance in plants and role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103:235-270.
- Mackey D., Holt B. F. III, Wiig A., Dangl J. L.** (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1 mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108:743-754.
- Maldonado A. M., Derner P., Dixon R. A., Lamb C. J., Cameron R. K.** (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419: 399 – 403.
- Mackey D., McFall A. J.** (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, 61: 1365–1371.
- Martin G. B., Bogdanove A. J., Sessa G.** (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins *Annual Review of Plant Biology*, 54:23–61.
- McDowell J. M., Dangl J. L.** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:79-82.
- Montesano M., Brader G. and Palva T.** (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4:73-79.
- Nürnberger T.** (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55: 167–182.
- Osborn A.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, 8: 1821-1831.
- Park S. W., Kaimoyo E., Kumar D., Mosher S., Klessig D.** (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318: 113-115.
- Pieterse C. M. J., Reyes A. L., Van D. S., Van W. S.** (2009) Networking by small – molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5: 308 – 316.

- Prohens J., Nuez F.** (2008) Vegetables II; Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae. Springer, First published pp. 223.
- Radman R., Saez T., Bucke C., Keshavans T.** (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 37:91-102
- Requena M. E., Gilabert C. E., and Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* 124: 50-60.
- Ristaino J. B., Johnston S. A.** (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on Bell pepper. *Plant Disease*, 83: 1080-1089.
- Rojo E., Solano R., Sánchez-Serrano J. J.** (2003) Interactions Between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22: 82–98.
- Ryals J., Lawton K., Delaney T., Friedrich L., Kessmann H., Neuenschwander U., Uknes S., Veroij B., Weymann K.** (1995) Signal transduction in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92:4202-4205.
- Sanabria N. M., Dubery I. A.,** (2006) Differential display of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 344:1001-1007.
- Satterlee J. S., Sussman M. R.** (1998) Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *Journal of Membrane Biology*, 164: 205-213
- Scheel D.** (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 305-310.
- Schenk P. M., Kazan K., Manners J. M., Anderson J. P., Simpson R. S., Wilson I. W., Somerville S. C., Maclean D. J.** (2003) Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 132: 999–1010.
- Seehaus K., Tenhaken R.,** (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Molecular Biology*, 38: 1225-1234.
- Setterblad C. N., Vidal S., Palva E. T.** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-

- degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 13: 430–438.
- Singh K. B, Foley R. C., Oñate-Sánchez L.** (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 430–436
- Soria F. M, Trejo R. J. A., Tun S. J. M., Terón S. R.** (2002) Paquete tecnológico para la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Instituto tecnológico agropecuario; No. 2 Conkal, Yucatán pp75.
- Sticher L., Mauch-Mani B., Metraux J.P.** (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 235-270.
- Tameling W., Takken F.** (2008) Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *European Journal of Plant Pathology*, 121: 243-255.
- Walker J.C.** (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinase of higher plants. *Plant Molecular Biology*, 26:1599-1609.
- Wendehenne D., Gould K., Lamotte O., Durner J., Vandelle E., Lecourieux D., Courtois C., Barnavo L., Bentejac M., Pugin A.** (2005) NO signaling function in the biotic and abiotic stress responses. *BMC Plant Biology*, 5:1-2.
- Yamazaki M., Saito K.** (2002) Differential display analysis of gene expression in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 1246-1255.



## **CAPÍTULO II. Análisis fisiológicos y moleculares de la respuesta de *Capsicum chinense* durante la infección producida por *Phytophthora capsici***

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Las plantas usan estrategias de defensa complejas, llamados colectivamente defensa basal, que las protege de diversos patógenos. Para inducir la defensa basal la planta debe poseer la habilidad para reconocer moléculas asociadas al patógeno (PAMPs) y de esta manera responder adecuadamente a cada uno. En años recientes el término MAMP (Patrones moleculares asociados a los microbios) se ha ido adoptando, ya que microorganismos no patogénicos también poseen PAMPs (Truman *et al.*, 2007). Estas PAMPs son moléculas altamente conservadas asociadas a un amplio rango de patógenos. Se ha observado que la defensa basal es sólo parcialmente eficaz en la restricción de los agentes patógenos (Bent y Mackey, 2007).

Los oomicetos incluyen un único grupo de microorganismos biotróficos y hemibiotróficos patógenos de plantas. Estos patógenos establecen una íntima relación con su hospedero por la formación del haustorio durante la infección, el cual es una estructura usada para obtener nutrientes de la planta, redireccionando el metabolismo del hospedero y suprimiendo su defensa en la fase biotrófica (Tör, 2008). Entre las PAMPs identificadas en los oomicetos están, por ejemplo, los  $\beta$ -glucanos de la pared celular. El tratamiento con suspensiones celulares de soya con  $\beta$ -glucanos induce la reacción de defensa, incluyendo un incremento en la concentración de calcio citosólico, la producción de especies reactivas de oxígeno y la activación de genes tal como las MAP cinasas, que juegan un rol crucial en la traducción de señales (Tör, 2008).

Se ha propuesto que los oomicetos poseen proteínas efectoras que les permiten colonizar al hospedero mediante la reprogramación de su circuito de defensa. Gracias al estudio de oomicetos como los del género *Phytophthora* se sabe que existen dos clases de efectores, los apoplásticos y los citoplásmicos, que son secretados por estructuras especializadas del patógeno, como las vesículas y el haustorio invaginándose a la célula viva del hospedero jugando un gran papel (Kamoun, 2006).

*Phytophthora capsici* es un patógeno devastador que causa grandes pérdidas en cultivos de diversos miembros de las solanáceas y las cucurbitáceas. La enfermedad de la marchitez del chile fue reportada por primera vez en Nuevo México, en 1922 (Leonian, 1922). *P. capsici* puede infectar virtualmente cualquier parte de la planta. El patógeno causa una pudrición de la raíz y de la corona del tallo en chile y también forma lesiones

oscuras en el tallo. Las lesiones en hoja y tallo son comunes cuando se inocula por la dispersión del agua de riego por salpicadura en las porciones más bajas de la planta (Ristiano y Johnston, 1999). En estudios de la interacción *C. annuum*-*P. capsici* se ha observado el estímulo de la biosíntesis de etileno. También, en el análisis del marcador de defensa PR1 se observó una fuerte inducción tanto en la interacción compatible e incompatible desde las 24 horas, aunque la expresión se mantuvo muy intensa desde las 48 hasta la 96 horas después de la inducción en ambas interacciones. A las 96 horas ya se observaba menos transcritos (Kim y Hwang, 2000).

Con fundamento en lo anterior, en la primera parte de este proyecto se decidió establecer un modelo para el estudio *in vitro* de la infección del chile habanero con *P. capsici*, esperando reproducir los síntomas reportados en la bibliografía para la marchitez del chile. Para ello, se realizaron análisis para determinar los tiempos y la confiabilidad del tejido que se emplearon para los análisis de expresión diferencial, mediante la determinación del avance intratisular del micelio del patógeno con el fin de evitar la contaminación de las muestras de ARN con transcritos del patógeno. Además, se evaluó la factibilidad del establecimiento de una respuesta de defensa, mediante la detección del transcrito del gen que codifica a la proteína PR1, debido a que este gen es un marcador molecular de defensa.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Plántulas de chile habanero**

En este estudio se emplearon variedades criollas de *Capsicum chinense* Jacq. colectadas y donadas por el Dr. Ignacio Islas y colaboradores; con éstas se han realizado estudios de inoculación de tallos de plantas de chile con micelio del oomiceto y se ha evaluado la sintomatología presentada ante estas condiciones (Islas-Flores, comunicación personal). Las plantas empleadas para este estudio presentaron la mayor tolerancia del análisis anterior, las cuales fueron auto-fecundadas y se obtuvieron semillas.

Para su germinación en agua, las semillas fueron tratadas con etanol al 70 % por 5 minutos e hipoclorito de sodio al 30% por 15 minutos para asegurar su desinfección. Las semillas fueron germinadas sobre algodón húmedecido con agua en oscuridad a 25 °C. Después de germinar, las semillas fueron transferidas a medio sólido MS y posteriormente transferidas a frascos especiales para su cultivo en hidroponía.

### 2.2.2. Inoculación de plántulas de *C. chinense* con micelio de *P. capsici*

Para la inoculación se tomó un disco de micelio de *P. capsici* cultivado por 20 días en medio PDA y se colocó en la raíz de plántulas de un mes de edad (**Plántulas inoculadas: P.I**). La plántula control fue inoculada con un disco de medio PDA (**Plántulas Testigo: P.T**). Se monitoreó la sintomatología en diferentes períodos después de la inoculación con base en reportes de la literatura (Lamour y Hausbeck, 2000).

### 2.2.3. Extracción de ARN

La extracción del ARN total de hojas de plántulas de 4 semanas de *Capsicum chinense* se efectuó con el protocolo comercial Trizol, el cual es una modificación del método de extracción desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987), como se describe a continuación: se maceraron 50 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido en un mortero y un pistilo libres de RNAsas. Se adicionó 1.5 mL de amortiguador de extracción y se homogeneizaron con el pistilo hasta que se obtuvo un tejido descongelado. Se transfirió la muestra a un tubo eppendorf limpio y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos. Se centrifugó a 12,000 x g a TA por 10 minutos para separar los restos celulares. Se transfirió el sobrenadante (SN) a tubos nuevos y se le adicionó 300 µL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49 / 1;V/V). Se agitó en forma vigorosa por 10 segundos y posteriormente se centrifugó a 10,000 x g 4 °C por 10 minutos. Se transfirió a un tubo nuevo la fase acuosa, se adicionó 375 µL de isopropanol y 375 µL de una mezcla de citrato de sodio 0.8 M /cloruro de sodio 1 M, se mezclaron minuciosamente y se dejaron a TA por 10 min. Se centrifugaron a 12,000 x g a 4 °C por 10 minutos, se eliminó el SN y se lavó el precipitado con 1 mL de etanol al 70 % con una temperatura de - 20 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g a 4 °C por 10 minutos. Se decantó el SN, el precipitado se seco a TA y se disolvió con 50 - 100 µL de agua tratada con DEPC. Se adicionó 187 µL de LiCl 4 M y se incubó por 2 h a 4 °C. Se centrifugó la muestra a 16,000 x g a 4 °C por 20 minutos. Se eliminó el SN y se lavó la pastilla con etanol al 70 % a una temperatura de - 20 °C. Finalmente, se secó la pastilla por 10 minutos a TA y se resuspendió con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC.

#### **2.2.4. Detección de *P. capsici* en plántulas inoculadas**

Cebadores específicos para *P. capsici* fueron empleados para su detección en tejido de plántulas 72 horas después de la inoculación. Los cebadores son los reportados por Silvar *et al.* (2005). La amplificación se realizó por RT-PCR, se partió de 2 µg de ARN total, la mezcla de reacción se elaboró según lo descrito en el manual "super script III one –step RT-PCR system with platinum Taq DNA polymerase" de Invitrogen.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 55 °C por 30 minutos (1 ciclo), seguido de 95 °C por 2 minutos; 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto (30 ciclos), concluyendo con 72 °C por 15 minutos.

#### **2.2.5. Detección de micelio intracelular**

El tallo de plántulas de 72 y 144 horas después de la inoculación fue separado de la raíz y las hojas para posteriormente ser esterilizado en hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos. Fue seccionado en fragmento de 0.5 cm iniciando en la parte que se encontraba por arriba de la necrosis. Cada fragmento fue colocado en medio PDA de forma secuencial de acuerdo a que tan distante se encontraban de la necrosis. Las placas fueron incubadas a temperatura del cuarto y observadas a los 48 horas después del procedimiento (Requena *et al.*, 2005).

#### **2.2.6. Detección de los transcritos del marcador de defensa PR1 en plántulas inoculadas**

Para la detección de los transcritos del gen PR1 2 µg de ARN proveniente de tejido de hoja de P.I y de P.T fueron empleados como muestra para la amplificación por RT-PCR utilizando como cebadores 5'-TACGGTTCACCAGCCCATCA-3', 5'-CCTCCACAACCAGCAACA-3'.

La mezcla de reacción se elaboró según lo descrito en el manual "Super Script III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase" de Invitrogen. Las condiciones de amplificación son las a continuación descritas, 55 °C por 30 minutos (1 ciclo), seguido de 95 °C por 2 minutos; 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto (30 ciclos) concluyendo con 72 °C por 15 minutos.

### **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **2.3.1. Obtención de plántulas de *C. chinense***

En la primera parte de este trabajo se planteó obtener un sistema adecuado de inoculación *in vitro*, que permitiera obtener tejido de chile libre de

patógenos para analizar los cambios transcripcionales ocasionados durante la infección. Para la obtención de plántulas de *Capsicum chinense* se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos, el cual consiste en germinar las semillas embebidas en agua estéril. Las semillas germinadas fueron transferidas en placas con medio sólido lo cual asegura un mayor desarrollo de la raíz. Al cabo de una semana las plántulas fueron transferidas al sistema de hidroponía *in vitro*. Este sistema permitió la manipulación segura de la plántula para inocular la parte de la raíz embebida en el medio líquido; con esto se consiguió tener un contacto directo con el oomiceto sin el riesgo de contaminar las hojas, que más tarde se utilizaron para el análisis de expresión.

Como se puede observar en Anexo 1 (A), en las plántulas transferidas a medio sólido no existe proliferación ni desarrollo de raíces secundarias, evitando con esto un menor daño al ser transferidas al sistema de hidroponía. En Anexo 1 (B y C) se puede observar el desarrollo de las plántulas en el medio líquido, así como la exposición de la raíz, ideal para el propósito de la inoculación con el patógeno.

### **2.3.2. Inoculación de plántulas de *C. chinense* con micelio de *P. capsici***

El objetivo del presente trabajo fue establecer un sistema para la inoculación *in vitro* con *P. capsici* de plántulas de *C. chinense*, para el posterior análisis de los cambios en la expresión génica en el nivel sistémico, después de la inoculación con el oomiceto en la raíz de la plántula. Por ello, una vez que se inóculo *in vitro* mediante la colocación de un disco de micelio en la raíz de la plántula, se prosiguió al análisis de la sintomatología presentada en *C. chinense* durante la infección con el oomiceto *P. capsici*. Este punto del análisis fue de gran importancia, ya que permitió determinar varios factores como el período en que se presenta el primer síntoma visible y el período en que se completa la invasión del tejido por el micelio del oomiceto. Con estos datos se pudo establecer el intervalo de tiempo para realizar el análisis de expresión diferencial. Para el análisis de la sintomatología se tomó como referencia a Ristaino y Johnston (1999), quienes reportan que el principal síntoma de la enfermedad "marchitez del chile" es el necrosamiento progresivo de la raíz y la corona del tallo, formando una lesión distintiva oscura. Basándonos en estos antecedentes, se evaluó la sintomatología en un período de 20 días después de la inoculación. En Anexo 2 se observó la proliferación del micelio en la superficie de la raíz desde el segundo día (aérea H). Para el tercer día se observó una ligera lesión color café en el tallo (aérea C), que en el transcurso de los días avanzó a través de él confiriéndole un color oscuro (aérea D-E). Para el décimo día se observó una completa invasión del micelio afectando también a las hojas.

Una vez que se corroboró la presencia de los síntomas reportados en la literatura y que se determinó el período en que se presenta la primera sintomatología visible, los siguientes pasos fueron verificar que no se estaba tomando tejido contaminado con micelio intracelular y elegir los períodos de tiempo en los que se debía realizar el análisis de la expresión génica. Ya que el sitio de la inoculación es la raíz de la plántula, se decidió determinar el grado de avance del micelio a través del tallo. Para ello, se desarrollaron dos metodologías complementarias para determinar la presencia del micelio en los tejidos evaluados.

En primera instancia, se evaluó el grado de avance de micelio biológicamente activo y posteriormente se corroboró la ausencia del patógeno en los tejidos en estudio. En el primer caso se siguió la metodología propuesta por Requena *et al.* (2005). Para ello, se utilizaron plántulas de tres y seis días después de la inoculación. Para el análisis, se colectó el tejido de tallo que se encontraba por arriba de la necrosis, todas las hojas fueron retiradas y fue desinfectado con hipoclorito. Posteriormente, el tallo fue segmentado en secciones de 0.5 cm que se colocaron en cajas petri con medio PDA.

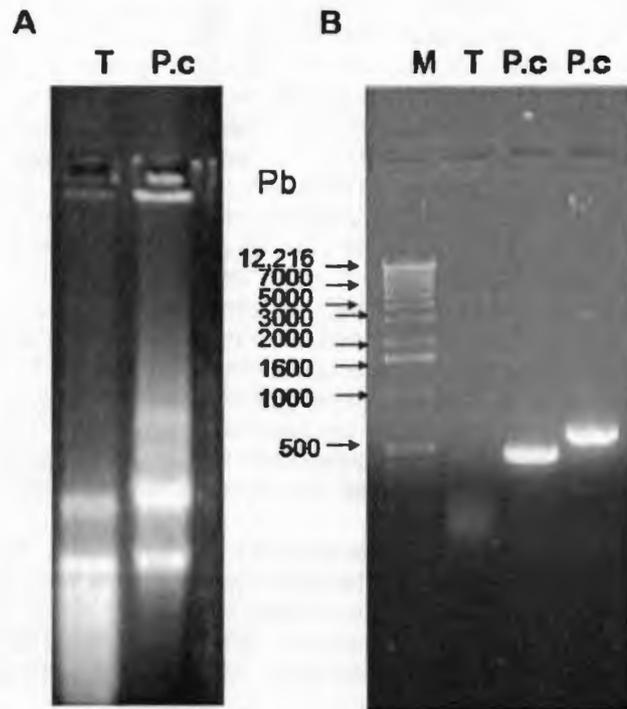
Los resultados obtenidos de este análisis se presentan en Anexo 3. Como se observa en las secciones A, C, y D, al tercer día después de la inoculación se tuvo un avance intracelular del micelio de aproximadamente 0.5 cm por arriba de la necrosis en tejido aparentemente sano. En el sexto día después de la inoculación se tuvo un crecimiento del micelio de aproximadamente 1.5 cm por arriba de la necrosis, como se observa en la sección (B, E y F). Estos resultados sugirien que a las 72 horas no se encuentra micelio activo en todo el tejido aéreo. En este período ya se tiene un nivel alto de infección en las raíces, mismo que pudo ser corroborado por medio de microscopía electrónica de barrido (Cocom Chan, 2011).

En segunda instancia se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del patógeno. La PCR ha sido una herramienta exitosa para la identificación y detección de patógenos fúngicos de plantas. Para la identificación de estos patógenos fúngicos se ha empleado las regiones del espacio interno de los transcritos (ITS) del ADN ribosomal, así como las de los genes ribosomales 18S, 5.8S, y 28S, que están altamente conservados. Con fundamento en esto, proseguimos a la corroboración por PCR de la ausencia de micelio intracelular de *Phytophthora capsici* en el tejido de hoja de plántulas 72 horas después de la inoculación. Empleamos los cebadores específicos para *P. capsici* reportados por Silvar *et al.*, (2005).

Como se puede observar en la Figura 2.1 (B), no se detectaron productos de PCR en el tejido, por arriba de 0.5 cm de la lesión necrótica, a las 72 horas después de la inoculación. En el control positivo el cual es la amplificación empleando el ARN de *P. capsici* se observa la presencia de

un fragmento de aproximadamente 500 pb correspondiente a la amplificación de una parte de ARNr 5.8S de *P. capsici*.

Con fundamento en los dos resultados anteriores, se determinó que coleccionar muestras de hojas de plantas tres días después de la inoculación no representa un riesgo de llevar tejido infectado, evitando un resultado no confiable en la amplificación por PCR.

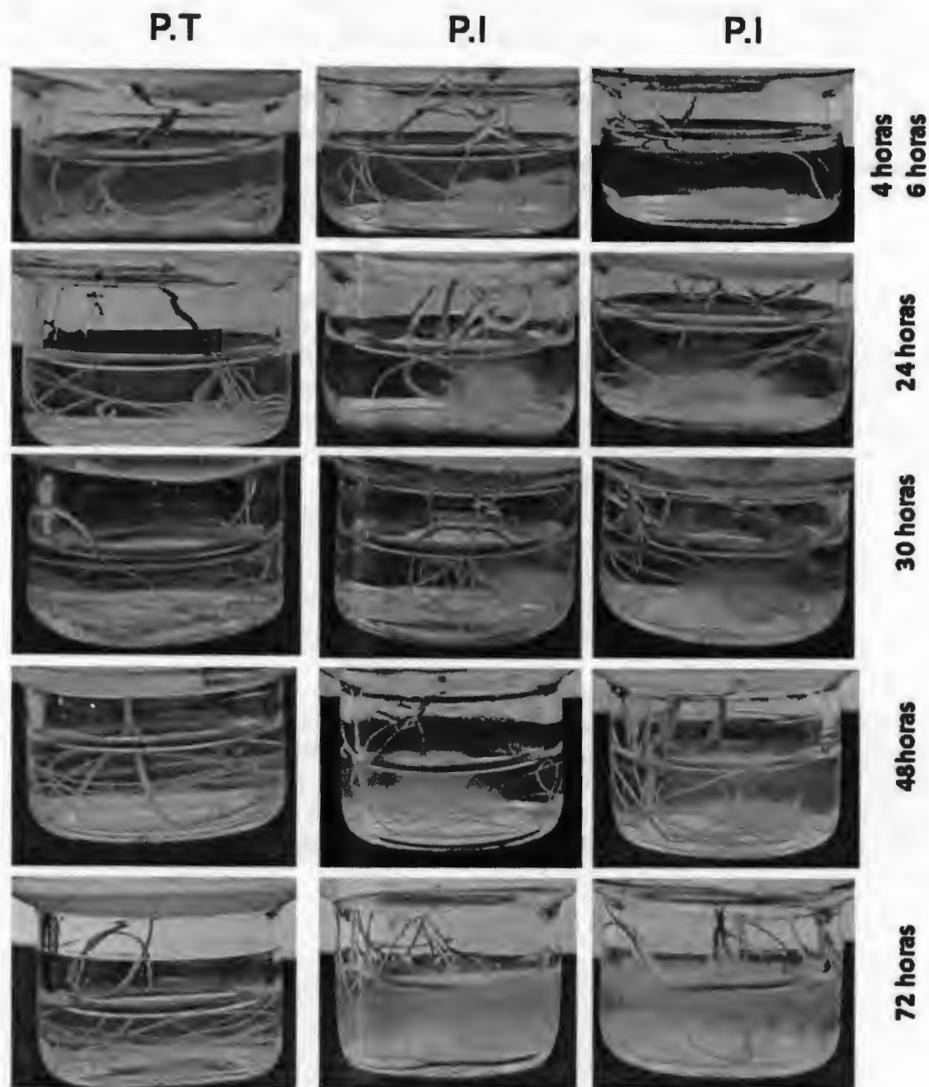


**Figura 2.1.** Detección de ARN de *P. capsici* en hojas de plántulas infectadas con el oomiceto. **A)** Fraccionamiento de ARN total obtenidas a partir de hojas de plantas infectadas (P.I) por 72 horas o de micelio de *P. capsici* como testigo positivo (P.c); **B)** Una alícuota de los productos de RT-PCR obtenidos con cebadores específicos a partir de 2  $\mu\text{g}$  de muestras de fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio.

Con los datos antes descritos se decidió realizar el análisis de la expresión diferencial dentro de las primeras 72 horas. Para poder incluir en el análisis las modificaciones tempranas y tardías en la expresión génica se decidió tomar un rango de tiempo entre las 4 y las 72 horas. La decisión del rango

de tiempos tempranos se basó en reportes como los de Kim y Hwang (2000), quienes observaron un incremento en la biosíntesis de etileno con respecto al control, así como un incremento en los transcritos del gen PR1 después de inocular plántulas de *C. annuum* de 6 a 8 hojas verdaderas, con una suspensión de  $1 \times 10^5$  zoosporas·mL<sup>-1</sup> de *P. capsici* en una herida del tallo. A las 36 horas después de la inoculación se produjo la mayor cantidad de etileno, por lo que concluyeron que su biosíntesis y la acumulación de los transcritos de PR1 eran estimuladas por la inoculación con *P. capsici*. Se sabe que otros genes se expresan en tiempos aún más tempranos. Do *et al.* (2003), observaron la inducción de tres posibles genes de peroxidasa a partir de las 12 horas después de la inoculación de plantas de *C. annuum* con una cepa virulenta de *P. capsici*, mientras que la inoculación con una cepa avirulenta promovió la inducción hasta las 24 horas. La mayor acumulación de los transcritos se presentó a las 36 horas después de la inoculación, observándose un decremento a las 48 horas para la interacción incompatible. Otro ejemplo es el de Park *et al.*, (2006), quienes reportaron que un factor transcripcional WRKY de *C. annuum* es inducido durante la respuesta de hipersensibilidad como respuesta a la infección con el *virus mosaico del tabaco* y con *X. campestris*. Pensando que algo similar pudiera pasar en nuestro sistema, se decidió tomar muestras a las 4, 6, 24, 30, 48, y 72 horas después de la inoculación con los discos de *P. capsici*. Por tanto, plántulas de *C. chinense* de cuatro semanas de edad, fueron inoculadas con micelio de *P. capsici* de 6 días de crecimiento (P.I). Como testigo, plántulas de la misma edad fueron inoculadas con un disco de medio de cultivo PDA (P.T).

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2.2, en donde se muestran las raíces en diferentes tiempos después de la inoculación con el micelio del oomiceto. Cada foto fue tomada justo antes de la colecta de la parte aérea de la plántula. En ningún período del muestreo las hojas presentaban marchitez del chile ni se vieron afectadas de manera severa.



**Figura 2.2.** Inoculación de plántulas de *C. chinense* con micelio de *P. capsici*. El correspondiente inóculo fue colocado en el medio líquido en contacto con las raíces de plántulas (P.I), como testigo se colocó en el medio un disco del medio PDA (P.T), cada imagen corresponde al tiempo después de la inoculación que va desde las 4 hasta las 72 horas.

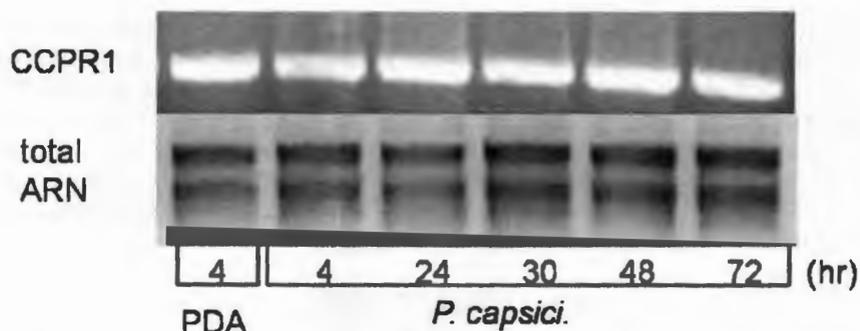
Como puede apreciarse, el micelio comienza a crecer en el medio de cultivo desde las primeras horas (4-6 horas). Este crecimiento es gradual y para las 24 horas ya se observaba micelio adherido a las raíces. El micelio continuó creciendo masivamente y en el período comprendido entre las 48 y las 72 horas se observó el avance de la necrosis en la raíz primaria. Como ya se mencionó, en ninguno de estos tiempos ocurrió el marchitamiento de las hojas ni el decaimiento de la plántula.

### **2.3.3. Análisis de transcritos de marcadores de defensa**

Si bien es probable que la infección del oomiceto en la plántula esté induciendo una respuesta, ésta debió de ser ineficiente pues todas las plántulas inoculadas murieron al cabo de 10 días. Por ello, el análisis de la presencia de transcritos de genes marcadores de defensa es de gran importancia. Su detección permitiría verificar que la planta está percibiendo al patógeno y así poder determinar si se está estableciendo una defensa aunque no sea eficiente para contener al patógeno. Entre estos marcadores de defensa se encuentra el gen que codifica a la proteína PR1, por lo que se decidió analizar la presencia de los transcritos del gen PR1; esta decisión fue basada en reportes como los de Kim y Hwang (2000), en donde observaron que la infección de *C. annuum* con *P. capsici* induce la expresión de PR1 tanto en una interacción compatible como en una incompatible..

Como se observa en la Figura 2.3, el gen PR1 se expresa de manera homogénea tanto en tiempos tempranos como en tardíos después de la inoculación; sin embargo, la presencia de transcritos de PR1 también se encuentran en el control por lo que el análisis por RT-PCR solo nos indica que los transcritos de PR1 están presentes y no podemos decir que se comportan en forma diferencial debido al tipo de análisis.





**Figura 2.3.** Detección de transcritos de PR1 en plántulas de *C. chinense* inoculadas con *P. capsici*. Una alícuota de cada producto de RT-PCR obtenidos a partir de muestras de ARN, extraídas en diferentes períodos de tejido sistémico de plántulas inoculadas con el oomiceto (*P. capsici*) o con el medio de cultivo (PDA) fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa y tefidos con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio.

Estos resultados sugieren que genes relacionados con la defensa se están expresando tanto en la P.T como en la P.I, indicando en forma indirecta que la planta en condiciones *in vitro* se encuentra estresada. Resultados de la literatura muestra que al comparar mediante ensayos de RT-PCR los niveles de transcritos de la familia de defensinas de *Arabidopsis* (Zimmerli *et al.*, 2004), se observó, con excepción de la PDF1.1, la presencia de transcritos de todas las defensinas en plántulas inoculadas con patógenos, aunque se observó una menor intensidad de los transcritos en las plantas testigo tratadas con  $\text{H}_2\text{O}$ . Las defensinas, especialmente PDF1.2, han sido asociadas con la respuesta molecular contra patógenos. Se dice que la expresión de la resistencia a la enfermedad durante el desarrollo del hospedero es solo un aspecto de la conexión entre defensa y desarrollo en plantas, ambos procesos involucran en muchos de sus puntos fitohormonas, Otro aspecto de la relación entre desarrollo y defensa consiste en que conservan moléculas que regulan procesos de las rutas de señalización. Así diferentes miembros de una misma familia pueden estar involucrados en la respuesta de defensa o en el proceso de desarrollo (Develey y Galiana, 2007). Se sabe que en *Arabidopsis* un simple gen PR1 (At2g14610) es inducido por infección, ataque de insectos, o tratamientos químicos, mientras que diez y ocho diferentes genes de tipo PR1 son constitutivamente expresados en raíz y polen respectivamente (Loon *et al.*, 2006).

Zimmerli *et al* (2004) lograron observar la diferencia de los niveles de transcritos entre plantas inoculadas y tratadas con agua, en nuestro caso no se logró observar la diferencia entre los niveles de los transcritos de PR1 en las plantas inoculadas con el patógeno y las tratadas con el medio PDA,

probablemente por el número de ciclos usados, ya que en nuestro caso fue de 30 ciclos para la amplificación de PCR y la acumulación de productos ya se encontraba en la fase estacionaria, en donde no se puede observar la diferencia de los transcritos entre una muestra y otra, para estas condiciones PR1 no resulta un buen marcador control de la inducción de defensa, A pesar de no haber diferencias en PR1, se va a analizar por despliegue diferencial si existe modificaciones a nivel transcritos durante la infección de *C. chinense* con el omiceto *P. capsici*.

## 2.4. CONCLUSIONES

Con el modelo experimental propuesto de inoculación *in vitro* de plántulas de chile habanero con *P. capsici* se pudo observar la sintomatología de la enfermedad reportada en la literatura, detectándose necrosis en el tallo alrededor del tercer día después de la inoculación, ocurriendo la completa invasión de la plántula para el décimo día.

Mediante los estudios de detección de micelio biológicamente activo, así como de detección del ARN ribosomal 5.8 S de *P. capsici* mediante RT-PCR se pudo determinar que para las 72 h después de la inoculación el micelio está presente a una distancia de 0.5 cm por encima de la línea visible de necrosis, mientras que para las 144 h el avance fue de 1.5 cm por arriba de esta línea. Estos experimentos demostraron que para las 72 h no existe presencia de micelio de *P. capsici* en las hojas. Por ello se decidió realizar los análisis de expresión génica diferencial a las 72 h postinoculación.

Al parecer, las plántulas cultivadas *in vitro* en condiciones de hidroponía sufren un estrés debido a la forma de cultivo, ya que se detectó la presencia, en niveles similares, del transcrito de PR1 tanto en las plántulas control como en las inoculadas. Con base en los resultados obtenidos se decidió que para la evaluación del despliegue diferencial se tomará los tiempos comprendidos entre las cuatro y las 72 horas después de la inoculación, con el objeto de poder incluir en el análisis las modificaciones tempranas y tardías en la expresión génica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bent A. and Mackey D.** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45:399–436.
- Cocom Chan Nallely Dolores,** (2011) Analisis histologico de la infección de la planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con el oomiceto *Phytophthora capsici*. Instituto tecnológico superior del sur del estado de Yucatán.
- Chomczynski P. and Sacchi N.** (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156–159.
- Develey M. P. and Galiana E.** (2007) Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*, 175:405–416.
- Do H. M. , Hon J. K., Jung H. W., Kim S. H., Ham J. H., Hwang B. K.** (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*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 16: 196–205.
- Kamoun S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 41–60.
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108:51 – 60.
- Lamour K.H., Hausbeck M.K.** (2000) Mefenoxan insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan Cucurbit Fields. *Phytopathol*, 90:396 – 400.
- Leonian L.H.,** (1922) Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species. *Phytopathol*, 12:401–408.
- Loon L. C., Rep M., and Pieterse C. M. J.** (2006) Significance of inducible defense – related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-162.
- Park C. J., Shin Y. C., Lee B. J., Kim K. J., Kim J. K., Paek K. H.** (2006) A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to Tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*. *Planta*, 223: 168 –179.

- Ristaino J. B., Johnston S. A.** (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on Bell pepper. *Plant Disease*, 83: 1080–1089.
- Requene M. E., Egea G. C., Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 124:50–60.
- Silvar C., Duncan J.M., Cooke D.E.L., Williams N.A, Díaz J., Merino F.** (2005) Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology*, 112:43–52.
- Tör M.** (2008) Taping into molecular conversation between oomycete plant pathogens and their hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 122:57–69.
- Truman W., Bennett M., Kubigsteltig I., Turnbull C., Grant M.** (2007) Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 1075–1080.
- Zimmerli L., Stein M., Lipka V., Schulze I. P., Somerville S.** (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 40: 633–646.

## **CAPÍTULO III. Análisis de la expresión diferencial de la población de transcritos durante la interacción *C. chinense*-*P. capsici***

### **3.1. INTRODUCCIÓN**

Como muchos otros procesos biológicos complejos, las respuestas de defensa contra una invasión por microorganismos patógenos involucran la regulación transcripcional de un gran número de genes de la planta hospedera. Muchos de los genes regulados diferencialmente codifican enzimas participantes en una variedad de rutas metabólicas, cuyos cambios pueden conducir a la reprogramación del metabolismo celular. Esta regulación transcripcional tiene un papel crítico en la inducción de la respuesta de defensa de la planta hospedera (Chen y Chen, 2002).

Para poder comprender cómo algunas plantas sobreviven el ataque de un patógeno mientras que otras de la misma especie y que se encuentran a su alrededor mueren, se han realizado estudios amplios que en conjunto se conocen como la interacción planta-patógeno. Estudios previos de la interacción entre *C. annuum* y *P. capsici* permitieron establecer un sistema para el estudio y la medida de factores envueltos en la resistencia de plantas al ataque del oomiceto. En ese modelo se reportó que en tallos infectados con *P. capsici* se indujo la actividad de  $\beta$ -1,3 glucanasas y de quitinasas, las cuales pueden proteger a la planta al degradar la pared celular del oomiceto. En *C. annuum* también se han realizado análisis a nivel molecular de diversos genes relacionados con la defensa, como los genes CAPR1 y CASAR8.2, cuya expresión fue identificada inicialmente por despliegue diferencial en tejidos infectados por *X. campestris*. Ambos genes se inducen en tejidos de plántulas resistentes infectados con *P. capsici* (Kim y Hwang, 2000; Lee y Hwang, 2003). Estos son ejemplos de los diversos y continuos estudios que se realizan en el modelo *Capsicum* spp.-*P. capsici*.

Existen diferentes métodos para la identificación de genes expresados diferencialmente durante la interacción planta-patógeno; una de estas metodologías es el despliegue diferencial, el cual permite analizar dos o más poblaciones de manera simultánea (Seehaus y Tenhaken, 1998). La técnica involucra la transcripción reversa de una subpoblación de ARNm con cebadores de anclaje cuyo blanco es la cola de poli-A, seguido por la amplificación por PCR bajo condiciones suaves, con el cebador de anclaje en combinación con un cebador arbitrario. Los productos son separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y visualizados por autorradiografía u otro método de tinción del ADN (Liang y Pardee, 1992). La identificación de un gen expresado diferencialmente es determinada mediante la escisión de su banda del gel y su posterior clonación para secuenciación y corroboración de la expresión diferencial.

El objetivo de este Capítulo es aislar e identificar genes que se induzcan sistémicamente en *C. chinense* como respuesta a la adición de micelio de *P. capsici* a las raíces de las plántulas cultivadas en hidroponía.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1. Material vegetal**

La metodología de la obtención de plántulas, la forma de inoculación y la extracción de ARN se presentan en el capítulo 2. El rango de tiempo empleado para este análisis es el de 4, 6, 24, 30, 48, y 72 horas tanto para las plántulas inoculadas (P.I) así como también las plántulas testigo (P.T).

### **3.2.2. Análisis por despliegue diferencial**

Plántulas de chile habanero fueron inoculadas en las raíces con micelio de *P. capsici* y los cambios producidos en las correspondientes poblaciones de ARNm fueron contrastados mediante el método del despliegue diferencial, con base en los protocolos descritos en el manual del producto "Delta Differential Display" de Clontech, empleando las diferentes combinaciones de oligonucleótidos arbitrarios (Pn) y de anclaje (Tn) descritos en el mismo. La diferencia con relación al protocolo comercial radicó en el uso de las enzimas. En nuestro laboratorio hemos estandarizado el despliegue diferencial mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la PCR en un solo paso (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen), a diferencia de lo recomendado en la mayoría de los productos comerciales. Los productos de la amplificación exponencial fueron fraccionados en geles desnaturizantes de poliacrilamida y teñidos con plata; los ADNc con abundancia diferencial fueron escindidos del gel, reamplificados y clonados en el vector pGEM-T-Easy (PROMEGA). Una vez clonados, los insertos fueron secuenciados y se procedió a verificar su expresión diferencial y a la caracterización de los mismos.

Se utilizó un gel desnaturizante de poliacrilamida-bisacrilamida al 6 % para el fraccionamiento electroforético de los ADNc. Antes de cargar las muestras se les adicionó el equivalente a 1/3 del volumen total de la muestra de amortiguador de corrida, el cual tiene dos colorantes, el azul de bromofenol para los fragmentos de ADN de tamaño pequeño y el xilen-cianol para fragmentos grandes, se desnaturizaron a 94 °C por 4 minutos. Para cargar las muestras en el gel desnaturizante los pozos fueron perfectamente limpiados eliminando el exceso de urea y luego se cargaron 6 µL de muestra, por último se cargó 2 µL de una escalera de ADN. Los fraccionamientos se realizaron a 1,700 volts y con un tiempo de corrida de aproximadamente 5

horas. Después de analizar las bandas que son diferenciales, se prosiguió a la hidratación del gel por 10 minutos en agua desionizada, esto permitió que se cortaran con facilidad las bandas. Las bandas cortadas fueron manejadas con el cuidado preciso para evitar que éstas se fragmentaran. Tomando como referencia a Frost y Guggenheim (1999), se decidió probar tres diferentes eluyentes para bandas de un tamaño mayor de 500 pb, ya que son con las que mayor dificultad se tenía en la reamplificación. Se probó con el amortiguador TE, con un amortiguador de PCR y con agua. El mejor resultado fue con el amortiguador de PCR; por lo tanto, todas las bandas identificadas como diferenciales se disolvieron con amortiguador de PCR. Las bandas separadas del gel se colocaron en tubos de 1.5 mL y se realizó una centrifugación, posteriormente se resuspendieron en 100 µL de amortiguador de PCR y se incubaron por 90 minutos a 100 °C para posteriormente incubarse a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa para la posterior reamplificación.

Para la clonación de los ADNc identificados como diferenciales se utilizó como sustrato 5 µL de la muestra y la mezcla de reacción de PCR que consistió en 1X de amortiguador 10X PCR, 0.5 mM de cada uno de los dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de cada uno de los oligonucleótidos (Pn:Tn), 0.025 U de Taq DNA polimerasa, realizar una reacción de 20 µL de volumen total.

### **3.2.3. Verificación de la expresión diferencial en las clonas aisladas**

La verificación de la expresión diferencial se realizó mediante ensayos de hibridación Northern blot reverso, como se describe en Lizama *et al.*, (2007). Las sondas fueron generadas como se describe en el siguiente punto. Como blanco, las clonas identificadas como diferenciales fueron fraccionadas en un gel de agarosa al 1% y transferidas a una membrana de nylon para hibridarse con la sonda respectiva. La hibridación positiva se detectó usando un anticuerpo anti-DIG acoplado a una fosfatasa alcalina, Posteriormente la hibridación positiva fue revelada con el reactivo CSPD (3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2-(5-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decan}-4-yl) Fenilfosfato de sodio) como sustrato de quimioluminiscencia (Ryang *et al.*, 2002) y detectada con una película sensible a la fluorescencia.

### **3.2.4. Marcaje no isotópico de las sondas**

Para el marcaje de las sondas de ADNc, 1 µg de ARN total de la P.T o de la P.I fue empleado como molde para la síntesis de una sub-población de ADNc por RT-PCR utilizando la enzima "SuperScript III One Step® RT-PCR System" de Invitrogen. Para la reacción del marcaje se empleó 10 mM de oligo dTT, 190 µM de dTTP, 200 µM de dATP, dGTP, dCTP, y 70 µM de

DIG-11-dUTP, 4  $\mu$ L del amortiguador 5' first strand, 1  $\mu$ L de la mezcla de enzimas, 9.14  $\mu$ L del agua. Para el testigo de marcado se utilizaron todos los componentes antes mencionados exceptuando los nucleótidos los cuales se emplearon a una concentración de 0.4  $\mu$ M respectivamente.

### **3.2.5. Análisis Bioinformático**

Para el análisis bioinformático de cada una de las secuencias de ADNc identificadas se emplearon las siguientes páginas:

<http://cn.expasy.org/>; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>;  
<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

De cada secuencia nucleotídica se sacó su correspondiente secuencia deducida de aminoácidos para posteriormente verificar su identidad en la base de datos.

## **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

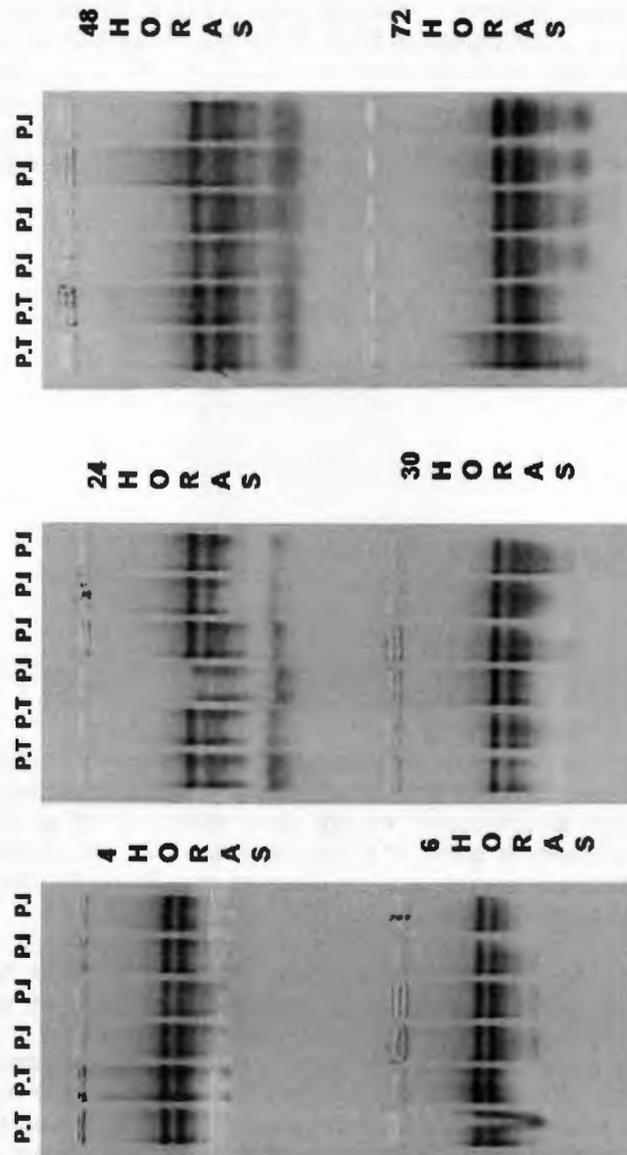
### **3.3.1. Extracción de ARN**

Una vez que se colectaron los tejidos inducidos con el patógeno y el testigo inoculado sólo con el medio PDA, se prosiguió a identificar los transcritos que se expresan diferencialmente durante la infección. El método empleado para lograr este objetivo fue el despliegue diferencial, el cual demanda como primer punto el contar con un ARN de buena integridad.

La extracción de las muestras fue en forma independiente, el método empleado para la extracción se menciona con detalle en el capítulo 2, y posteriormente como parte de la verificación de la integridad cada producto de la extracción fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa al 1.4 % las cuales se presentan en la Figura 3.1.

En la Figura 3.1 puede observarse una buena integridad del ARN total ya que la población de ARN ribosomales 26S y 18S se ven bien definidas, por lo tanto asumimos que las poblaciones correspondientes a los mensajeros también están íntegros.

Cada muestra fue cuantificada a una longitud de onda de 260 nm y se calculó la concentración de cada una.



**Figura 3.1.** Aislamiento de ARN total de plántulas. ARN total extraído de hojas de plántulas de *C. chinense* sometidas a diferentes tratamientos fue fraccionado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. P.T: plántulas con disco de medio de cultivo PDA; P.I: plántula inoculada con un disco de micelio de *P. capsici*, Cada tratamiento fue realizado por duplicado.

Una vez calculada la concentración de cada una de las muestras de ARN se procedió a realizar dos pozas de ARN: P.T contiene los ARN de las hojas de las plántulas testigo de los tiempos de 4, 6, 24, 30, 48, y 72 horas cada una a una concentración de 2  $\mu\text{g}$ , P.I contiene los ARN correspondientes a los tiempos de 4, 6, 24, 30, 48 y 72 horas después de la inoculación..Ambas pozas, que se presentan en la Figura 3.2, tuvieron una concentración de ARN de 2  $\mu\text{g}$  con los ARN ya conjuntados..

**P.T P.I P.I**



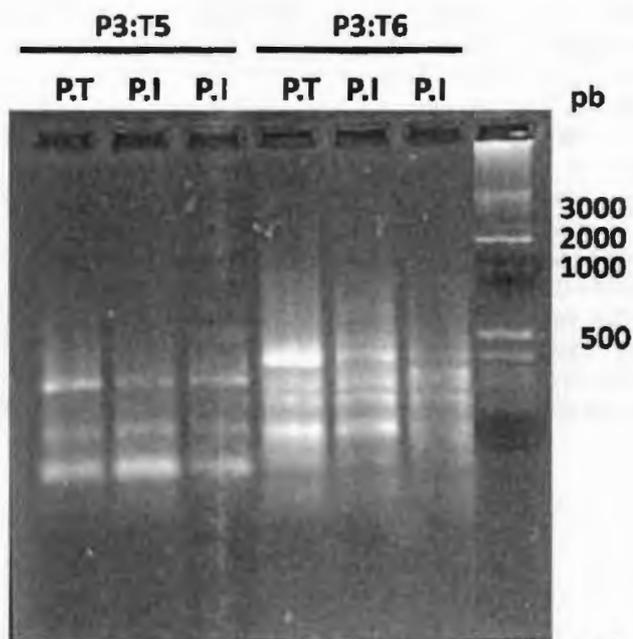
**Figura 3.2.** Pozas de ARN. Una alícuota de las pozas de ARN total de hojas de plántulas de *C. chinense* sometidas a diferentes tratamientos fue fraccionado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. **P.T:** plántulas con disco de medio de cultivo PDA; **P.I:** plántula inoculada con un disco de micelio de *P. capsici*, con su replica correspondiente.

En el análisis del despliegue diferencial mediante RT-PCR se amplifica selectivamente una subpoblación de mensajeros a partir de la población total de transcritos, mediante el uso de diferentes cebadores oligo-[dT] que difieren entre sí por la presencia de diferentes combinaciones de bases ubicadas hacia el extremo 5' del primer adenilato de la cola de poli-A. La amplificación exponencial de esta sub-población se consigue mediante el uso de diferentes cebadores arbitrarios en conjunto con el correspondiente oligo-[dT].

Utilizando como templado cada poza de ARN, se realizaron las amplificaciones de cada subpoblación de ADNc mediante reacciones de RT-PCR de un solo paso, para obtener los productos para el análisis de despliegue diferencial. Como se mencionó con anterioridad, la manipulación de las muestras de ARN fue muy cuidadosa para evitar su degradación, por

ello se optó por dividir en varias alcuotas de 10  $\mu$ L a la vez. Para las reacciones de RT-PCR se utilizó el paquete "SuperScript III One Step RT-PCR System" Invitrogen, obteniendo los productos que luego fueron fraccionados en los geles desnaturalizantes.

En la Figura 3.3 se presenta un fraccionamiento previo de los productos de la RT-PCR en un gel de agarosa al 2 %. Los productos corresponden al sub-grupo de la población de transcritos seleccionados con los cebadores P3:T5 y P3:T6. Como se observa en la figura, la parte más abundante de la sub-población obtenida con las dos combinaciones de cebadores es la de tamaños entre 100 y 500 pb. Si bien hay bandas de hasta 1,500 pb, estos transcritos se encuentran en menor abundancia.



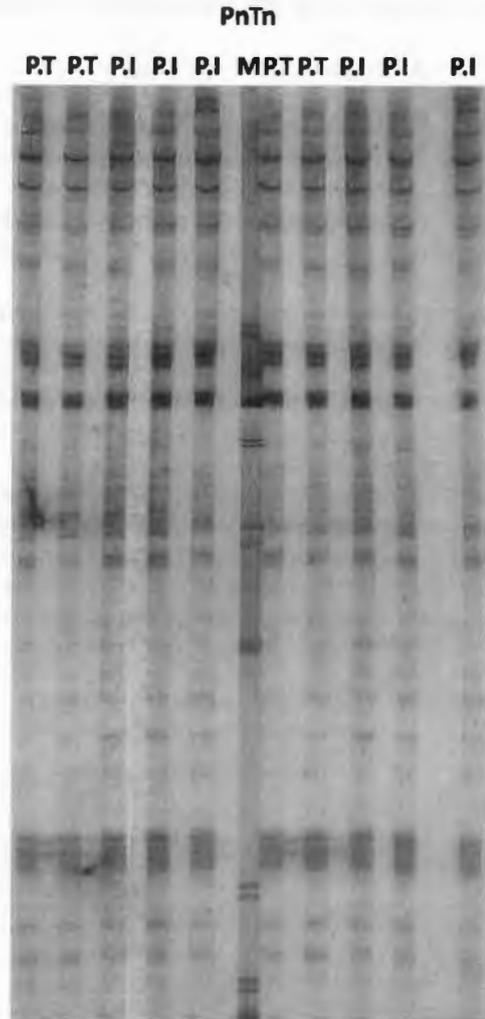
**Figura 3.3.** *Productos de RT-PCR del despliegue diferencial. Una alcuota de los productos de RT-PCR utilizando los cebadores del DD fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y teñidos con 1  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. P.T: población de ADNc de las plántulas testigo, a las que se adicionó un disco del medio de cultivo PDA. P.I: población de ADNc de las plántulas inoculadas con un disco de micelio de *P. capsici* por duplicado.*

### **3.3.2. Fraccionamiento de las muestras de ADNc por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

Si bien existen muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son el pH, la fuerza iónica, el gradiente de potencial, el tiempo de corrida, la concentración de acrilamida y bis-acrilamida, etc., las condiciones óptimas de una buena separación se determinan experimentalmente en la práctica, con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se debe obtener los mejores resultados (García, 2000).

En la Figura 3.4 se muestra un ejemplo de los geles que se obtuvieron con las diferentes combinaciones de cebadores. En general, se puede observar la amplificación de sub-poblaciones de ADNc que van de 100 a 1,000 bp. También se observa un buen fraccionamiento de las muestras con un gel cuyo porcentaje de acrilamida-bisacrilamida fue del 6 %, ya que para separar moléculas por tamaño, es necesario tomar en cuenta la relación entre el poro efectivo del medio y el tamaño de la molécula que se pretenden separar.

La metodología empleada para la visualización del ADN fue el de la tinción con plata. Este método es altamente sensible, detecta hasta 1 pg de ADN. Como se puede observar, las bandas están muy bien definidas, no se observa un fondo inespecífico que complique el análisis de cada una de las muestras. Estos resultados indican que la concentración de formaldehído fue el adecuado ya que bajas concentraciones de éste tienen el efecto de reducir la sensibilidad; por el contrario, altas concentraciones de formaldehído incrementan la sensibilidad pero también el fondo inespecífico.



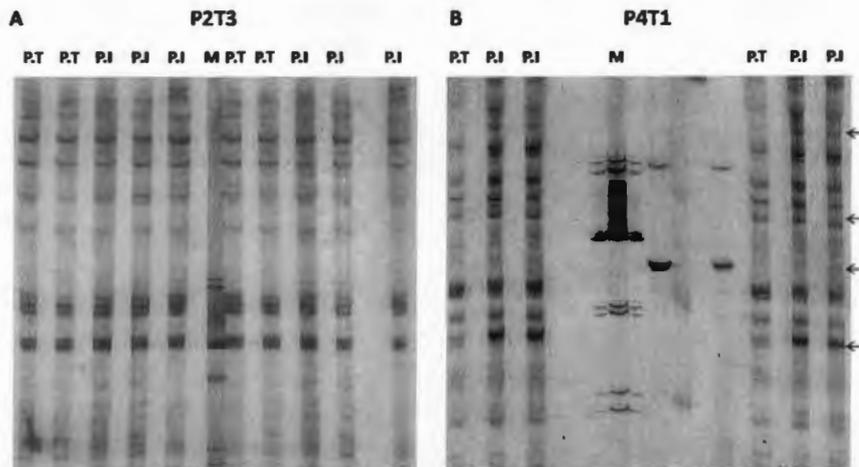
**Figura 3.4.** *Productos del Despliegue Diferencial obtenidos con diferentes combinaciones de oligonucleotidos. Seis  $\mu$ L de los productos del RT-PCR fueron fraccionadas en un gel de poliacrilamida al 6% y urea al 8%, a 1,700 volts por  $\sim$ 3h. M: escalera de ADN de 1kb Carriles P.T: Productos obtenidos a partir de ARN de plántulas tratadas con el disco de medio PDA Carriles P.I: Productos obtenidos a partir de ARN de plántulas tratadas con el disco de micelio de P.capsici. (Pn:Tn) combinación de oligonucleotidos empleados.*

### 3.3.3. Análisis de las bandas diferenciales

Al realizar el análisis de los geles desnaturalizantes, si bien se observó que con algunas combinaciones se obtuvieron sub-poblaciones con muchas bandas no diferenciales como lo presentado en la Figura 3.5 A. En algunas de las combinaciones se observó que la infección por *P. capsici* si induce cambios a nivel de transcritos en tejidos distantes a la zona de infección (Figura 3.5 B). Como se puede observar en esa figura, hay cuatro bandas de ADNc que se acumulan en el tejido como resultado de la infección, que no están presentes en el P.T.

Como resumen, en el cuadro 3.1 se presentan las combinaciones realizadas y el correspondiente número de bandas diferenciales identificadas.

Los resultados obtenidos están respaldados por reportes como el de Schenk *et al.*, (2003), quienes inocularon plantas de *Arabidopsis* de 12 hojas con una suspensión de esporas de *Alternaria brassicicola*. En ese reporte se inoculó en el nodo de una hoja y se colectaron para el análisis de la respuesta sistémica hojas distantes de la parte opuesta al sitio de la inoculación. Ellos observaron cambios en la expresión de transcritos mediante el uso de micro-arreglos, estos transcritos correspondían a genes relacionados con el mantenimiento celular, con la síntesis y modificación de la pared celular, y genes relacionados con la transducción de señales.



**Figura 3.5.** Análisis de las bandas correspondientes a ADNc que se expresan de forma diferencial. **A:** sub-población de ADNc seleccionada con los oligonucleótidos P2:T3; **B:** sub-población de ADNc seleccionada con los oligonucleótidos P4:T1. Las flechas indican bandas identificadas como diferenciales entre la subpoblación de mensajeros correspondientes a las plántulas testigo (P.T) con la subpoblación de mensajeros de las plántulas inoculadas (P.I).

De las 22 combinaciones se detectaron 36 bandas diferenciales.

**Cuadro 3.1.- Numero de bandas identificadas como diferenciales por combinación de cebadores.**

| Cebadores | Bandas diferenciales | oligonucleotidos | Bandas diferenciales |
|-----------|----------------------|------------------|----------------------|
| P1:T1     | ---                  | P4:T1            | <b>4</b>             |
| P1:T2     | 3                    | P4:T5            | ---                  |
| P1:T4     | 5                    | P4:T6            | ---                  |
| P2:T1     | 1                    | P4:T7            | <b>6</b>             |
| P2:T2     | ---                  | P4:T8            | <b>3</b>             |
| P2:T3     | 1                    | P6:T1            | <b>2</b>             |
| P2:T4     | ---                  | P6:T5            | ---                  |
| P2:T5     | ---                  | P8:T1            | ---                  |
| P3:T1     | ---                  | P8:T6            | <b>3</b>             |
| P3:T5     | 3                    | P8:T7            | <b>3</b>             |
| P3:T6     | ---                  | P9:T1            | <b>2</b>             |

Reportes como los de Schenk *et al.*, (2003) donde se observó un total de 100 genes que se expresaban diferencialmente de un total de 2,375 genes en análisis de microarreglos, nos da una idea de que los transcritos acumulados diferencialmente que hemos obtenido hasta el momento son un número razonable.

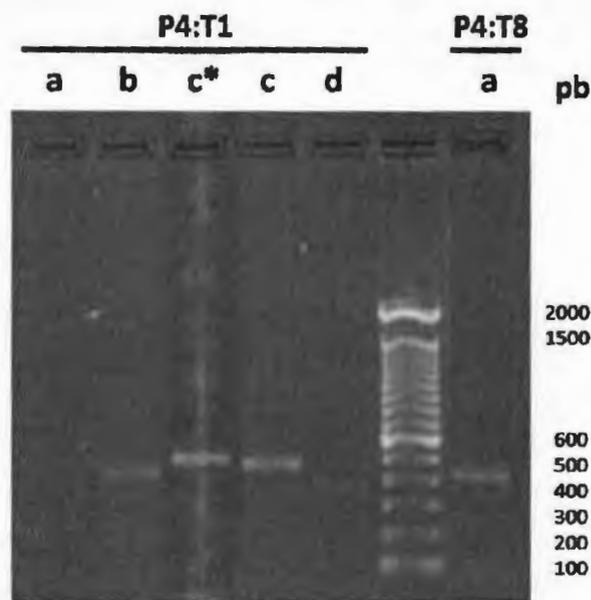
### **3.3.4. Reamplificación por PCR de las bandas diferenciales**

Una banda extraída de un gel de poliacrilamida de despliegue diferencial representa una composición de productos heterogéneos. Una aparente banda extraída de un gel de DDRT-PCR está frecuentemente compuesta de ADNc de idénticos tamaños pero de distinta secuencia. Estos ADNc contaminantes son copurificados con el ADNc diferencial y son responsables de un falso positivo. Este problema es resuelto subclonando la amplificación del material eluido del gel y el inserto correspondiente

identificado como el gen del transcrito diferencial es identificado por análisis de expresión diferencial.

En la Figura 3.6 se presentan los resultados de la reamplificación de las bandas diferenciales. Como se puede observar, la amplificación de algunas bandas no fue muy eficiente. No obstante, se comprobó que los ADNc reamplificados correspondieron al tamaño identificado inicialmente en el despliegue diferencial

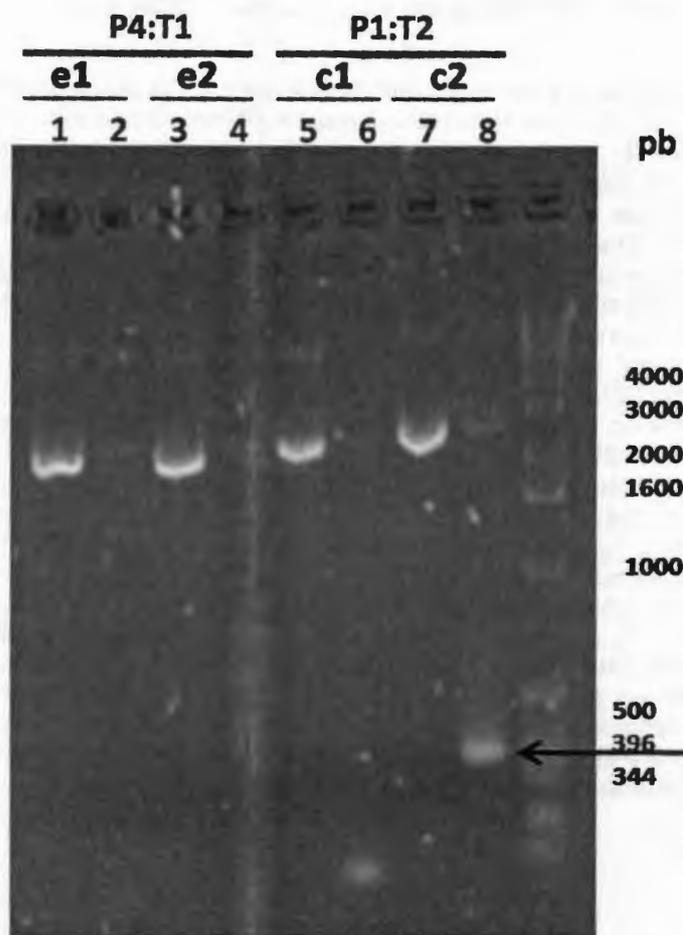
No todos los ADNc identificados como diferenciales fueron reamplificados, ya que de los 36 ADNc identificados en el despliegue diferencial solamente con 10 de ellos se tuvo éxito.



**Figura 3.6.** Reamplificación de segmentos diferenciales de ADNc. Alcuotas de 5 microlitros de los productos de PCR en donde se emplearon los cebadores de anclaje y los cebadores arbitrarios del despliegue diferencial, se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, teñido con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Marcador de tamaño de ADN esta dado en pb. a, b, c\*, c y d, corresponden a la nomenclatura dada a cada banda identificada como diferencial de la subpoblación de mensajeros para cada combinación de cebadores.

### 3.3.5. Clonación de los ADNc diferenciales

Los ADNc que sí pudieron reamplificarse, fueron clonados mediante su ligación en el vector pGEM-T-EASY y la transformación de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. La posterior purificación de los plásmidos no presentó problema alguno con relación a su concentración y a su pureza, lo cual es importante porque la presencia de algún contaminante podría impedir la amplificación por PCR. Para comprobar que el inserto se encontraba en el plásmido purificado se decidió escindirlo mediante corte con la enzima de restricción *Eco* RI, cuya secuencia de reconocimiento se encuentra franqueando el sitio múltiple de clonación. En la Figura 3.7 se presenta el fraccionamiento del plásmido purificado y en el carril continuo el producto de la digestión. Como puede observarse en el carril 8, el plásmido c2 contiene un inserto cuyo tamaño corresponde con el de la banda original purificada del gel de poliacrilamida.

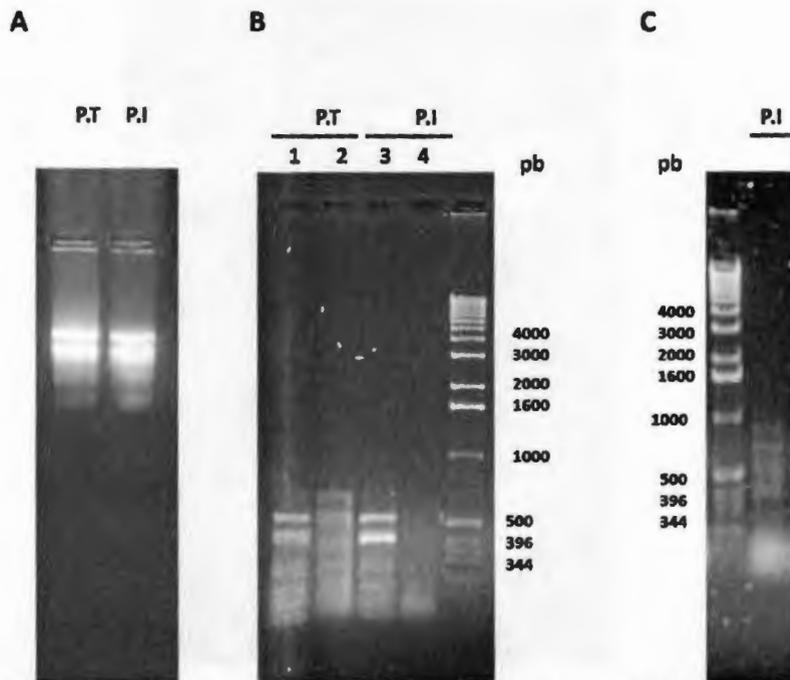


**Figura 3.7.** Corroboración de la clonación de ADNc diferenciales. Los productos de digestión con la enzima *Eco R1* fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa teñido con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: clona e1; carriles 3 y 4: clona e2; carriles 5 y 6: clona c1; carriles 7 y 8: clona c2. Los carriles nones contienen plásmido sin digerir y los carriles pares plásmidos digeridos con *Eco R1*. Marcador de tamaño de ADN en pb.

### 3.3.6. Corroboración de la expresión diferencial

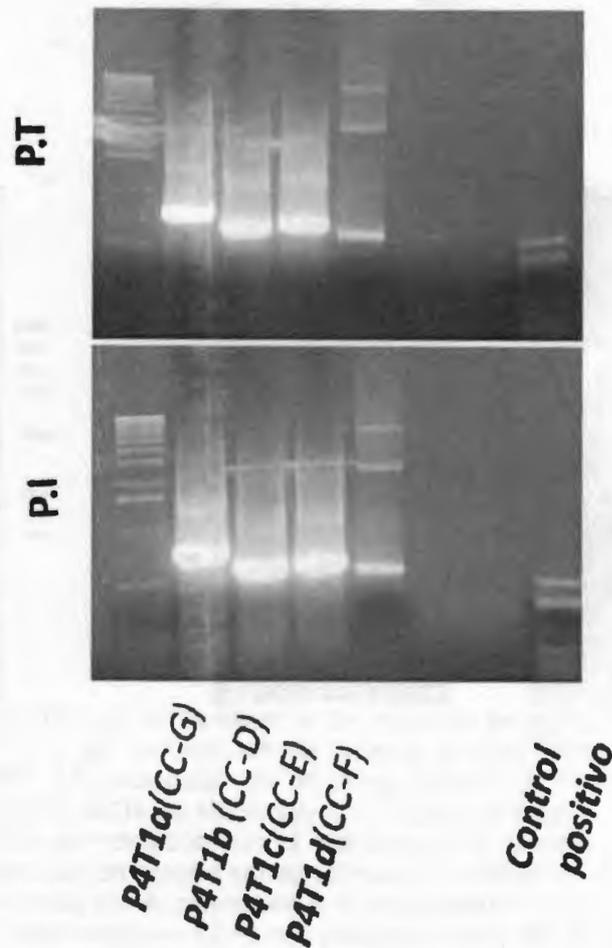
Uno de los puntos que se tienen que realizar cuando se utiliza el método de despliegue diferencial es el corroborar que los ADNc identificados realmente se comportan de manera diferencialmente de acuerdo con lo observado en el DD, o si se trata de falsos positivos. La corroboración de la expresión diferencial puede realizarse mediante los métodos de "Northern blot" o el "Northern blot reverso".

Ya que la mayoría de las clonas obtenidas provienen de la subpoblación de mensajeros enriquecida con los cebadores P4:T1, se decidió analizar sus patrones de expresión con la metodología descrita por Lizama *et al.* (2007). Se utilizó como sonda a la población de ADNc enriquecidos con los cebadores del DD P4:T1. La sonda se marcó con digoxigenina (DIG), el cual es un sistema no radiactivo. El retardamiento de la corrida de las muestras marcadas con DIG es una forma de verificar que éstas tienen o no incorporado el nucleótido marcado. Los resultados de la sub-población marcada son presentados en la Figura 3.8, sección B. Como se puede observar en la figura, el marcaje de la subpoblación del tejido inoculado presentó problemas ya que éste no presenta el mismo patrón de bandeo que el de la población de tejido inoculado, sintetizado sin el nucleótido marcado por lo que se decidió, repetir la reacción de marcaje cuyos resultados se presentan en la Figura 3.8 C. En cuanto al marcaje de la población de las plantas control se tuvo éxito ya que al fraccionar tanto al control de marcaje como a la muestra marcada carril 1 y 2 respectivamente de la Figura 3.8 B, se observa ligeramente arriba las bandas de la muestra marcada en comparación de las no marcadas.



**Figura 3.8.** Marcaje no isotópico de la sonda de ADNc. (A) pozas de ARN que se emplearon para la síntesis de las sondas, por RT-PCR con los cebadores P4:T1. P.T: ARN de tejido no inoculado; P.I: ARN de tejido infectado con el oomiceto. (B) 1: Sub-población de ADNc correspondiente a transcritos de plantas no inoculadas; 2: Sub-población de ADNc marcado con DIG correspondiente a transcritos de las plantas no inoculadas; 3: Sub-población de ADNc correspondiente a transcritos de plantas inoculadas; 4: Sub-población de ADNc marcadas con DIG correspondiente a transcritos de plantas inoculadas; Escalera de ADN de 1kb. (C) 1: Sub-población de ADNc correspondiente a transcritos de plantas inoculadas, marcadas con DIG.

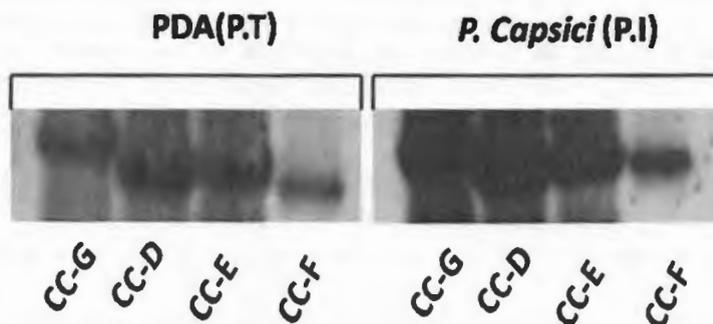
Las secuencias identificadas como diferenciales en el DD fueron amplificadas por PCR. Los productos de las reamplificaciones fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1% (Figura 3.9) y transferidos a una membrana de nylon para hibridarse con la correspondiente sonda de ADNc marcada con DIG (Figura 3.10).



**Figura 3.9.** Fraccionamiento de los ADNc diferenciales. 2  $\mu\text{g}$  de las clonas de ADNc diferencial que se muestran fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y teñido con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. El control positivo es la sub-población amplificada con el cebador P4:T1 sin marcar y diluida 10 veces; PnTn a,b, c,d representan la nomenclatura del ADNc diferencial, en el paréntesis se presenta la nomenclatura de ese ADNc ya clonado.

En la Figura 3.10 se presenta los resultados del Northern reverse, el cual confirma que los niveles de expresión predichos para los transcritos de estas clonas por despliegue diferencial son correctos y no corresponden a falsos positivos. Como se esperaba, el tejido no infectado presenta también

una señal, ya que al realizar el análisis todas estas clonas fueron identificadas como ADNc que se sobre-expresan como resultado del tratamiento.



**Figura.3.10.** Análisis de los niveles de expresión de transcritos modificados por la infección del oomiceto. Las clonas fraccionadas que se muestran en la figura 3.9 fueron transferidas a una membrana de nylon e hibridadas de forma independiente con dos sub-población de ADNc marcado con DIG mediante RT-PCR con los oligonucleotidos P4:T1, partiendo de 1 µg de ARN total proveniente de tejidos de plantas inoculadas con el oomiceto (P.I) o de plantas inoculadas con medio PDA (P.T). La nomenclatura de la parte inferior corresponde a la de cada clona.

### 3.3.7. Análisis bioinformático de la secuencia de los ADNc clonados

Una vez que se corroboró que algunos de los ADNc tienen efectivamente una expresión diferencial, se procedió a su secuenciación y a la comparación de las secuencias en bancos de datos para conocer la identidad de los ADNc correspondientes. Los resultados de la secuenciación de cada una se analizaron en bases de datos; con base en los resultados, podemos agrupar a las secuencias en tres tipos: i) secuencias que no se parecen a ningún segmento de ADN reportado, ii) secuencia que no se parecen a ningún segmento de ADN reportado, pero que parecen corresponder a productos génicos y; iii) secuencias que si tienen similitud con genes reportados en las bases de datos.

A continuación se presenta el análisis de las clonas diferenciales cuyas secuencias si tuvieron similitud con genes reportados en bancos de datos:

### 3.3.8. Clona CCD-4

#### Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos.

Las clonas fueron enviadas a secuenciar a la empresa Davis Sequencing. A partir de la secuencia nucleotídica de la clona CCD-4 se obtuvo su secuencia deducida de aminoácidos mediante la herramienta "Translate Tool" del "ExPASy Proteomics Server" del Swiss Institute of Bioinformatics, localizada en la página <http://cn.expasy.org/> (Figura 3.11).

```
gattgcactgaggaatttgatgcaattcattctgataaggccaagaagctcttggaggac
D C T E E F D A I H S D K A K K L L E D
ttagaattggtgaactcataactactggttacacctctgattcctctccaaacagttct
F R I G E L I T T G Y T S D S S P N S S
gtccatggatcttctccatcagtagctttctagcacctattaaggagcttgttcaaaca
V H G S S S I S S F L A P I K E L V Q T
ccaacaaggagtggtggcccttatcccaagagagaaaatcccttgtaaactcgtcgacaag
P T R S V A L I P R E K I P C K L V D K
caatccatctcccctgatgtaggagattccgttttgcattaccctctgaagatcaagtc
Q S I S P D V R R F R F A L P S E D Q V
ttgggcttgctgttggcaaacacatattcctctgtgccacaattgatgataagctctgc
L G L P V G K H I F L C A T I D D K L C
atgcgcggtacacgc
M R A Y T
```

**Figura.3.11.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona de CCD-4 de *C.chinense*. La clona CCD-4 codifica un fragmento de 376 pb cuya secuencia deducida de aminoácidos de 131 se presenta en la parte inferior.

La comparación de su secuencia deducida de aminoácidos en bancos de datos usando el sitio de INTERNET del "National Center for Biotechnology Information" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), arrojó los resultados que se muestran en el cuadro 3.2. Como se puede observar, la secuencia de la clona se alinea exclusivamente con la secuencia de una nitrato reductasa de diversos miembros de la familia de las solanáceas. Los valores del nivel de confianza umbral de las primeras 10 secuencias similares (desde  $E=4 \times 10^{-63}$  hasta  $E=2 \times 10^{-55}$ ) indican que la clona **CCD-4** corresponde a una nitrato reductasa de chile habanero, por lo que se le nombró **CcNR**.

**Cuadro 3.2. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCD-4. Se muestra únicamente los resultados de las primeras 10 secuencias con mayor identidad, tal como aparece en la página WEB.**

| Accession                  | Description   | Max score | E value |
|----------------------------|---|-----------|---------|
| <a href="#">BAB93534.1</a> | Nitrate reductase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]          | 244       | 4e-63   |
| <a href="#">AAB18985.1</a> | NADH nitrate reductase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]     | 243       | 7e-63   |
| <a href="#">AAB52786.1</a> | NADH nitrate reductase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]     | 243       | 7e-63   |
| <a href="#">BAB93533.1</a> | Nitrate reductase [ <i>Solanum tuberosum</i> ]          | 238       | 2e-61   |
| <a href="#">AAA33712.1</a> | Nitrate reductase apoenzyme [ <i>Petunia hybrida</i> ]  | 234       | 3e-60   |
| <a href="#">P36859.1</a>   | Nitrate reductase [NADH][ <i>Petunia hybrida</i> ]      | 234       | 3e-60   |
| <a href="#">P17570.1</a>   | Nitrate reductase [NADH][ <i>Solanum lycopersicum</i> ] | 232       | 1e-59   |
| <a href="#">ACI01549.1</a> | Nitrate reductase [ <i>Solanum palustre</i> ]           | 220       | 5e-56   |
| <a href="#">CAA29497.1</a> | Unnamed protein [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]            | 219       | 1e-55   |
| <a href="#">P11605.1</a>   | Nitrate reductase [NADH]1[ <i>Nicotiana tabacum</i> ]   | 218       | 2e-55   |

A continuación se alineó la secuencia de la clona CCD-4 con las tres primeras secuencias con las que tuvo el mayor nivel de identidad (Figura 3.12).

|                             |            |                                  |            |
|-----------------------------|------------|----------------------------------|------------|
|                             | 1          |                                  | 50         |
| <i>Capsicum chinense</i>    | DCTEEFDAIH | SDKAKKLED FRIGELITG YTSDSPNSS    | VHGSSISFF  |
| <i>Solanum tuberosum</i>    | DCTEEFDAIH | SDKAKKLED FRIGELITG YTSDSPNTS    | VHGSSISFF  |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | DCTEEFDAIH | SDKAKKLED FRIGELITG YTSDSPNSS    | VHGSSISFF  |
| <i>Petunia hybrida</i>      | DCTEEFDAIH | SDKAKKLED FRIGELITG YTSDSPNSS    | VHGSSFSGF  |
|                             | 51         |                                  | 100        |
| <i>Capsicum chinense</i>    | LAPIKELVQT | PTRSVALIPR EKIPCKLVDK QSISPDVRRF | RFALPSEDQV |
| <i>Solanum tuberosum</i>    | LAPIKELVQT | PTRSVALIPR EKIPCKLVDK QSISHDVRKF | KFALPSEDQV |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | LAPIKELVQT | PTRSVALIPR EKIPCKLVDK QSISHDVRKF | KFALPSEDQV |
| <i>Petunia hybrida</i>      | LAPIKELAPA | -VRSVALIPR EKIPCKLVDK KSISHDVRKF | RFALPSEDQV |
|                             | 101        |                                  | 125        |
| <i>Capsicum chinense</i>    | LGLPVGKHIF | LCATIDDKLC MRAYT                 |            |
| <i>Solanum tuberosum</i>    | LGLPVGKHIF | LCATVDDKLC MRAYT                 |            |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | LGLPVGKHIF | LCATVDDKLC MRAYT                 |            |
| <i>Petunia hybrida</i>      | LGLPVGKHIF | LCATIDDKLC MRAYT                 |            |

**Figura 3.12.** Las secuencia de aminoácidos de la clona CCD-4 de *C. chinense*, fue alineada con la secuencia de aminoácidos de NR de *S. tuberosum*, *S. lycopersicum* y *P. hybrida*.

El código de colores es el siguiente: cuando las secuencias son idénticas se muestran en rojo, cuando las secuencias no son idénticas pero el aminoácido diferente es conservado se muestra en azul. Finalmente, cuando los aminoácidos diferentes no son conservados se muestran en color negro (Figura 3.12).

El análisis BLAST también mostró la presencia de los siguientes dominios conservados en la secuencia peptídica de la clona CCD-4 (Figura 3.13).



**Figura.3.13.** Dominios conservados de la clona CCD-4.

- Superfamilia Cyt-b5. Esta familia incluye los dominios de unión al grupo hemo de un rango amplio de proteínas. Esta familia también incluye proteínas que unen esteroides, como los receptores de progesterona.
- Citocromo b5 reductasas. Estas enzimas catalizan la reducción de 2 moléculas del citocromo b5 usando NADH como donador de electrones. En esta familia se encuentran la ferredoxina y las nitrato reductasas.
- Ferredoxin reductasas de unión a hierro-azufre (FNR). Estas proteínas combinan las regiones de unión al FAD y al NAD(P) de la FNR con dominios de unión a hierro-azufre.
- Además de los demás dominios que se muestran (Figura. 3.13) y que son parecidos entre ellos, la secuencia demuestra un multidominio PLN02252, que ha sido asignado exclusivamente a la nitrato reductasa y que puede incluir varios dominios. Esta es una característica importante que demuestra que la regulación de la actividad de esta enzima es muy compleja.

### 3.3.9. Clona CCF-6

#### Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos.

La comparación de secuencia de la clona CCF-6 se hizo igual que con la clona CCD-4 (Figura 3.14).

```
aggttctgtcctaaccagcaatggtatagtagagatgggagcatgtatcatggatgggatt
  G S V L T S N G I V E M G A C I M D G I
acgaaaaactgtggagctgtttctggcctaaccactggtgtcaatgctatatctctggct
  T K N C G A V S G L T T V V N A I S L A
aggctggtcatggaaaaaactccacatatatcttgcatttgagggagcgggaagcattt
  R L V M E K T P H I Y L A F E G A E A F
gctagagagcaaggggttgaaaccatagactcaagccattttgttacgccacgaaatc
  A R E Q G V E T I D S S H F V T P R N I
gaaagactaaagcaagcaaaaagaagcaacaaagtccaggtagactataatacacgacct
  E R L K Q A K E A N K V Q V D Y N T R P
atacctaaaggtgacaaa
  I P K G D K
```

**Figura.3.14.** *Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona CCF-6 de C.chinense. La clona CCF-6 codifica un fragmento de 319 pb con una secuencia deducida de aminoácidos de 106 la cual se presenta en la parte inferior.*

La comparación de su secuencia deducida de aminoácidos en bancos de datos usando el sitio de INTERNET del "National Center for Biotechnology Information" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), arrojó los resultados que se muestran en el cuadro 3.3. Como se puede observar, la secuencia de la clona se alinea con un número de proteínas desconocidas y con tres asparaginidas de diversas familias, lo que sugiere que no existen muchos reportes de secuencias de esta proteína. Los valores del nivel de confianza umbral de las primeras 10 secuencias similares (desde  $E=1 \times 10^{-43}$  hasta  $E=6 \times 10^{-38}$ ) sugieren fuertemente que la clona **CCF-6** corresponde a una L-asparaginasa de chile habanero, por lo que se le nombrará **CcASP**.

**Cuadro 3.3. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCF-6.** Se muestra únicamente los resultados de las primeras 10 secuencias con mayor identidad, tal como aparece en la página WEB.

| Accession  | Description  | Max score | E value |
|------------|--|-----------|---------|
| X00P226657 | Hypothetical protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]                 | 179       | 1e-43   |
| XP00251460 | L-asparaginase, putative [ <i>Ricinus communis</i> ]           | 178       | 2e-43   |
| XP00233204 | Predicted protein [ <i>Populus trichocarpa</i> ]               | 175       | 2e-42   |
| CAN82634.1 | Hypothetical protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]                 | 169       | 2e-40   |
| ACU20315.1 | Unknown [ <i>Glycine max</i> ]                                 | 167       | 6e-40   |
| NP00105060 | transposon protein [ <i>Oryza sativa Japonica Group</i> ]      | 166       | 7e-40   |
| EEC75690.1 | Hypothetical protein [ <i>Oryza sativa Indica Group</i> ]      | 166       | 1e-39   |
| NP00114987 | Transposon protein [ <i>Zea mays</i> ]                         | 162       | 1e-38   |
| NP196427   | L-asparaginase [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]                 | 162       | 1e-38   |
| XP00287333 | L-asparaginase [ <i>Arabidopsis lyrata</i> sp. <i>lyrata</i> ] | 160       | 6e-38   |

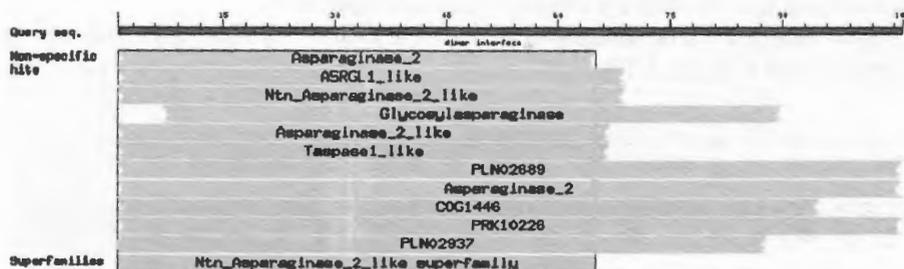
A continuación se alineó la secuencia de la clona CCF-6 con las tres primeras secuencias con las que tuvo el mayor nivel de identidad (Figura 3.15).

|                            |   |     |
|----------------------------|---|-----|
|                            | 1   | 50  |
| <i>Capsicum chinense</i>   | GSVLTSNGIV EMGACIMDGI TKKCGAVSGL TTVVNAISLA RLVMEKTPHI  |     |
| <i>Vitis vinifera</i>      | GSVLTTDGTV EMEACIMDGN TKKCGAVSGL TTVVNPISLA RLVMEKTPHI  |     |
| <i>Ricinus communis</i>    | GSVLTTGTV EMEACIMDGN TKKCGAVSGL TTVVNAISLA RLVMEKTPHI   |     |
| <i>Populus trichocarpa</i> | GSVLTSRGTV EMEACIMDGN SKKCGAVSGL TTVVNAISLA RLVMDNTPHI  |     |
|                            | 51  | 100 |
| <i>Capsicum chinense</i>   | YLAFEGAEAF AREQGVETID SSHFVTPRNI ERLKQAKEAN KVQVDYNTRP  |     |
| <i>Vitis vinifera</i>      | YLAFDGAEEAF AREQGVETVD ASHFITPENI ERLKQAKEAN RVQIDY.TQP |     |
| <i>Ricinus communis</i>    | YLAFDGAEEAF AREQGVETVD SSQFVTPENV ERLKQAKEAN RVQIDY.TQP |     |
| <i>Populus trichocarpa</i> | YLGFDGAEEAF AREQGVETVD SSHFITPENI ERLKQAKEAD RVQMDY.TQP |     |
|                            | 101   |     |
| <i>Capsicum chinense</i>   | IPKGDK  |     |
| <i>Vitis vinifera</i>      | ITKDTK  |     |
| <i>Ricinus communis</i>    | IQKNEE  |     |
| <i>Populus trichocarpa</i> | IQKDEK  |     |

**Figura. 3.15.** La secuencia de aminoácidos de la clona CCF-6 de *C. chinense*, fue alineada con la secuencia de aminoácidos de L-asparaginasa de *V. vinifera*, *R. communis* y *P. trichocarpa*.

El código de colores es el siguiente: cuando las secuencias son idénticas se muestran en rojo, cuando las secuencias no son idénticas pero el aminoácido diferente es conservado se muestra en azul, finalmente, cuando los aminoácidos diferentes no son conservados se muestran en color negro..

El análisis BLAST también mostró la presencia de los siguientes dominios conservados en la secuencia peptídica de la clona CCF-6 (Figura 3.16).



**Figura.3.16.** Dominios conservados de la clona CCF-6.

La base de datos reporta varios dominios en la secuencia deducida de aminoácidos; sin embargo, existe un dominio de una superfamilia con las siguientes características:

- Superfamilia Ntn-hidrolasa y enzimas L-asparaginasa tipo 2. La familia incluye a las enzimas Glucosil-asparaginasa, la Taspasa-1 y a la L-Asparaginasa tipo 2.
  - La Glucosil-asparaginasa cataliza la hidrólisis del enlace glucosamida de las glucoproteínas unidas a la asparagina.
  - La Taspasa cataliza la ruptura de la proteína nuclear de la Leucemia de Linaje Mixto (MLL por sus siglas en inglés) y el factor transcripcional TFIIA.
  - La L-asparaginasa tipo 2 cataliza la hidrólisis de la L-asparagina produciendo L-aspartato y amonio. Las proenzimas de esta familia sufren ruptura autocatalítica antes de una Treonina para generar las subunidades alfa y beta. La Treonina se convierte en el residuo N-terminal de la subunidad beta y es el residuo catalítico.

### 3.3.10. Clona CCG-7

#### Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos.

La comparación de la secuencia de la clona CCG-7 se hizo igual que con la clona CCD.4 (Figura 3.17)

```
atagttgaatatcaagacttcgtgggtgcgcaactatactccgcctccatcaatcaacaat
I V E Y Q D F V V R N Y T P P P S I N N
agtattaagatggaagtcggtattgaagattgcctccatattgagtttgagtacaacaaa
S I K M E V G I E D C L H I E F E Y N K
agcaagtatcatctgaaagatgttatcatagggaaaatatatcttctccttgtaagaatt
S K Y H L K D V I I G K I Y F L L V R I
aagataaagaacatggatcttgagatcagacgccgagaatcgacaggttctggggcaaat
K I K N M D L E I R R R E S T G S G A N
acctatggtgaaacagagacactggccaagtttgagttgatggatgggtgctccagtcaga
T H V E T E T L A K F E L M D G A P V R
ggtgaatcaatacccattagactcttccttagtccatatagaactgacaccaacatatcgc
G E S I P I R L F L S P Y E L T P T Y R
aatatcaacaacaagtttagcgtgaaatactatttgaatcttgcttcttggtgacgaagag
N I N N K F S V K Y Y L N L V L V D E E
gaccgctcgttacttcaaacagcaagagatcacaatggtccgcctggcagaaacttctga
D R R Y F K Q Q E I T M F R L A E T S X
ataaatgaagagatggtggcacttgagattcgctta
I N E E M L A L E I R L
```

**Figura.3.17.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la clona CCG-7 de *C.chinense*. La clona CCG-7 codifica un fragmento de 517 pb, incluyendo el extremo carboxilo, que en este caso es un residuo de Serina, marcado en rojo en la secuencia. La secuencia deducida de aminoácidos es de 172 la cual se presenta en la parte inferior de la secuencia nucleotídica.

La comparación de su secuencia deducida de aminoácidos en bancos de datos usando el sitio de INTERNET del "National Center for Biotechnology Information" (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), arrojó los resultados que se muestran en la cuadro 3.4. Como se puede observar, la secuencia de la clona se alinea con un número de proteínas desconocidas y con tres proteínas de dirección vacuolar de diversas familias. Al igual que para la clona CCF-6, al parecer no existen muchos reportes de secuencias de esta proteína. Los valores del nivel de confianza umbral de las primeras 10 secuencias similares (desde  $E=7 \times 10^{-86}$  hasta  $E=3 \times 10^{-80}$ ), lo cual indica que sin duda la clona **CCG-7** corresponde a una proteína 26 asociada a la proteína de dirección vacuolar de chile habanero, por lo que se le nombró **CcVsp26**.

**Cuadro 3.4. Análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCG-7. Se muestra únicamente los resultados de las primeras 10 secuencias con mayor identidad, tal como aparece en la página WEB.**

| <b>Accession</b>   | <b>Description</b>  | <b>Max score</b> | <b>E value</b> |
|--------------------|---|------------------|----------------|
| <b>ABA46760.1</b>  | vacuolar protein sorting-associated protein 26-like protein [Solanum tuberosum] | <u>319</u>       | 7e-86          |
| <b>XP002274585</b> | PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]                                | <u>313</u>       | 3e-84          |
| <b>CBI23055.3</b>  | unnamed protein product [Vitis vinifera]  | <u>313</u>       | 5e-84          |
| <b>XP002515678</b> | vacuolar protein sorting 26, vps26, putative [Ricinus communis]                 | <u>311</u>       | 2e-83          |
| <b>XP002331388</b> | predicted protein [Populus trichocarpa]   | <u>311</u>       | 2e-83          |
| <b>XP002308142</b> | predicted protein [Populus trichocarpa]   | <u>310</u>       | 3e-83          |
| <b>XP002532583</b> | vacuolar protein sorting 26, vps26, putative [Ricinus communis]                 | <u>305</u>       | 2e-81          |
| <b>XP002269444</b> | PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]                                | <u>301</u>       | 2e-80          |
| <b>XP002865977</b> | hypothetical protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]                         | <u>300</u>       | 3e-80          |
| <b>ABK27154.1</b>  | unknown [Picea sitchensis]  | <u>300</u>       | 3e-80          |

A continuación se alineó la secuencia de la clona CCG-7 con las tres primeras secuencias con las que tuvo el mayor nivel de identidad (Figura 3.18).



A continuación se muestra una tabla conteniendo un resumen de algunas características de los transcritos expresados diferencialmente que se pudieron clonar, incluyendo su clave, su tamaño, su identidad y el efecto de la infección sobre sus niveles de expresión (Cuadro 3.5).

**Cuadro 3.5. Análisis de la identidad y de la expresión diferencial de transcritos aislados por despliegue diferencial de *Capsicum chinense* Jacq. infectado con *Phytophthora capsici*.**

| Clona | Tamaño | Identidad                      | Expresión |
|-------|--------|--------------------------------|-----------|
| CC-A  | 390    | No reportado en bases de datos | ↑         |
| CC-B  | 510    | No reportado en bases de datos | ↓         |
| CC-C  | 490    | No reportado en bases de datos | ↓         |
| CC-D  | 490    | Nitrato reductasa              | ↑         |
| CC-E  | 460    | Proteína de unión al ADN       | ↑         |
| CC-F  | 480    | L-Asparaginasa                 | ↑         |
| CC-G  | 380    | Proteína de ubicación vacuolar | ↑         |
| CC-H  | 500    | Proteína putativa              | ↑         |
| CC-I  | 350    | No reportado en bases de datos | ↑         |
| CC-J  | 350    | No reportado en bases de datos | ↑         |

Como se puede observar, las secuencias tienen identidad con proteínas que participan en transporte y la asimilación de nitrógeno, así como en el tráfico vesicular y la regulación de la transcripción.

Al revisar la identidad de las secuencias, se pudo entender por qué para ellos solamente hubo cambios en la expresión, pues las proteínas correspondientes participan en procesos metabólicos que están activos en condiciones normales. Ésta podría ser la razón por la que se observó un nivel basal en las plantas no inoculadas al realizar el análisis del Northern blot reverso.

A continuación se presentan datos de la literatura sobre las funciones de las proteínas cuyos transcritos fueron identificados en este trabajo.

#### **Fijación y asimilación de nitrógeno**

En plantas, L-asparagina es el mayor forma de transporte de nitrógeno y almacenamiento de aminoácidos durante la germinación, así como en la

asimilación y la fijación de nitrógeno. La L-asparaginasa cataliza la hidrólisis del grupo amida de la L-asparagina, liberando L-aspartato y amonio. Estudios del papel de la L-asparaginasa en condiciones de estrés son pocos. Woo *et al.*, (2007) caracterizaron el gen de la L-asparaginasa durante la exposición a estrés abiótico, proponiendo que la L-asparaginasa juega un rol en las respuestas temprana y rápida de la planta contra las bajas temperaturas y el estrés salino. La función precisa de la L-asparaginasa en la respuesta temprana a bajas temperaturas aun permanece incierta. Una posible explicación es que las plantas necesitan incrementar la utilización de nitrógeno para poder contender contra los drásticos cambios ambientales. El amonio producido por la L-asparaginasa puede permitir la síntesis *de novo* de proteínas requeridas para la adaptación celular a varias condiciones ambientales, un proceso similar puede estar pasando ante el estrés biótico producido por *P. capsici*.

La asimilación de nitrógeno es un proceso vital que controla el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Las plantas pueden asimilar el nitrógeno inorgánico, como nitrato o como amonio, o en forma orgánica como urea. La toma inicial de nitrato ocurre a través de la membrana plasmática de las células epidermales y corticales de la raíz. Subsecuentemente el transporte puede ocurrir a través de la membrana del tonoplasto o por las membranas plasmáticas de células del sistema vascular y las hojas (Crawford, 1995). El nitrato es guardado en la vacuola o reducido a nitrito por la nitrato reductasa (NR), el nitrito entra al cloroplasto y es reducido a amonio por la nitrito reductasa (NIR). El amonio puede ser fijado a esqueletos de carbono de aminoácidos como glutamina, glutamato, asparagina y aspartato, que es una forma de asimilar el amonio, que sirve para translocar nitrógeno orgánico (Crawford 1995).

En mamíferos, se conoce el gran papel que juega la oxido nítrico sintasa (NOS) para la síntesis de oxido nítrico y el papel de éste como molécula señalizadora. En años recientes se han incrementado los estudios sobre el rol del NO en las plantas. En el trabajo reportado por Yamasaki y Sakihama (2000), se detectó la habilidad de la NR para producir NO, implicando a esta enzima como emisor inicial de la señalización en la célula vegetal, similar a la de NOS en mamíferos. En cuanto al análisis del papel del NO durante la interacción de un hospedero vegetal y un patógeno, la mayor parte de los estudios se han realizado analizando la actividad de enzimas tipo NOS. Fueron Yamamoto *et al.*, (2003) los primeros en reportar que la señalización ligada a patógenos induce la expresión del gen de la NR. Lo observado por estos autores es que la infección por *Phytophthora infestans* en *Solanum tuberosum* causa un incremento en los transcritos del gen de la nitrato reductasa (NR) en la interacción incompatible, y en forma más leve en la compatible.

Aunque la participación de la NR durante la interacción hospedero-patógeno no ha sido completamente elucidada, sí se sabe que el NO tiene

un papel importante como molécula señalizadora durante este tipo de interacción, ya que se han reportado una elevada producción de NO al inocular plantas con bacterias avirulentas, con virus, o bien tratadas con elicitores. También se ha estudiado la participación del NO como mediador de la muerte celular, y en la síntesis del ácido salicílico, entre otras funciones. Ya que la producción de NO a partir de de L-arginina es catalizada por la NOS, y a partir del nitrato por la NR, es probable que la regulación de estas enzimas durante la interacción hospedero-patógeno tenga un rol en la señalización (Delledonne, 2005; Lamotte *et al.*, 2005). Requena *et al.* (2005) reportaron que en plantas de chile infectadas con *Phytophthora capsici* hay una acumulación de NO, tanto en una interacción compatible como incompatible, pero con mayor intensidad en la interacción incompatible. Si bien la NR no es la única fuente de síntesis de NO, no se puede descartar su contribución en la producción de esta molécula y por tanto la regulación transcripcional de ésta muy posiblemente afecte los niveles de NO, el cual ha sido ampliamente demostrado como un participante de la señalización durante una infección por patógenos.

### **Tráfico vesicular**

Un aspecto clave en el sistema inmune innato de los eucariontes es el reconocimiento de moléculas asociadas a los microorganismos, por medio de receptores llamados "receptores de reconocimiento a patógenos (PPR)". En plantas, el PPR mejor caracterizado es la cinasa tipo receptor FLS2, este receptor reconoce al péptido flg22, altamente conservado en el flagelo bacteriano. Una vez que el FLS2 une a flg22, se dimeriza y cada unidad transfosforila a la otra, exponiendo los sitios catalíticos críticos, con lo que el dominio intracelular de cinasa puede fosforilar a sus sustratos citosólicos para iniciar la cascada de señalización que conducirá finalmente a la respuesta de defensa. Una vez que la cascada de señalización es iniciada, el receptor dimerizado se desfosforila y es endocitado para su destrucción o reciclado.

El proceso de endocitosis en plantas ha sido descubierto sólo recientemente. La endocitosis es el proceso donde la membrana plasmática se invagina formando una vesícula cerrada con el citoplasma en donde las proteínas clatrina tienen una gran participación. Su función puede incluir la remodelación o reparación de la membrana celular, la remoción de receptores de señalización, la entrada de componentes de señalización de la membrana plasmática a organelos internos etc. Los receptores de la membrana citoplasmática tienen dos posibles destinos al ser endocitados: su retorno a la superficie o su degradación en el lisosoma. Solo una pequeña fracción de receptores de señalización puede migrar al núcleo u otros organelos para continuar la transducción de la señal (Low y Chandra, 1994). Un modelo que ejemplifica los posibles caminos que toma un receptor al ser endocitado es el propuesto por Robatzek *et al.*, (2007). Estos

autores proponen que el receptor con repeticiones ricas de leucina FLS2 que reside en la membrana plasmática, al unirse en forma específica a su ligando flg22 y activar la transducción de señales es internalizado en un compartimento endosomal, el cual puede ir a la vacuola para su degradación o dirigirse al aparato de Golgi para su posterior retorno a la membrana.

Las células eucariotas poseen un amplio rango de familias de proteínas altamente conservadas que son esenciales para el transporte, la dirección y la fusión de la vesícula endosomal derivada de la membrana plasmática, con la membrana blanca de algunos organelos. Por mencionar algunas de estas familias de proteínas, están las t-SNAREs/sintaxinas, las GTPasas, y un grupo de receptores de transporte endosomal (Muller *et al*, 2007).

Entre estas proteínas se encuentra un complejo multiproteico denominado retrómero, el cual controla el transporte de un número de receptores a través del sistema endosomal. El retrómero consiste de dos sub-complejos: un sub-complejo comprende a las proteínas Vps5p y Vps17p, las cuales se unen a la membrana. El segundo complejo está compuesto por las proteínas Vps26, Vps29 y Vps35, los cuales se encargan de seleccionar el cargo ya que Vps35 está asociada con la región citosólica de Vps10, Vps26p interactúa con Vps35p y facilita el ensamblaje del retrómero. El retrómero está altamente conservado, y homólogos han sido identificados en numerosos organismos incluyendo a las plantas, sugiriendo una función fundamental y conservada en el transporte retrogrado.

Se ha caracterizado en el transporte retrogrado de receptores del endosoma al Golgi en levaduras y mamíferos (Seaman, 2005). Uno de los estudios más descriptivos realizado sobre este complejo es el realizado por Popoff *et al.* (2007); ellos observaron como al silenciar a un miembro del complejo retrómero, la proteína Vps26, el transporte retrogrado de vesículas se ve afectado, en donde se ha incluido una de las subunidades de la toxina Shiga después de ser ligada a su receptor plasmático en células HeLa. Ya que en las plantas se ha comprobado la participación del sistema endosomal en la interacción Hospedero–Patógeno y que la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCG-7 corresponde a la proteína Vps26 de *C. chinense*, es probable que el proceso retrogrado del endosoma al aparato de Golgi se vea afectado durante la infección de *C. chinense* con el oomiceto *P. capsici*.

En resumen, si bien son pocos los estudios de las proteínas identificadas en este trabajo con relación al estrés, con la información que se tiene se puede esbozar un panorama de lo que está sucediendo durante esta interacción planta-patógeno.

### 3.4. CONCLUSIONES

En esta parte del trabajo observamos que hay cambios transcripcionales en tejidos distantes del sitio de inoculación.

De los análisis con diferentes combinaciones de cebadores del DD se identificaron diversos ADNc acumulados diferencialmente, dominando aquellos que se acumularon, sobre los que se redujeron en las plántulas inoculadas con el patógeno.

El tipo de análisis realizado sólo permite especular cuál es el probable papel que están desempeñando las proteínas codificadas por estos genes, con base en su expresión diferencial durante esta interacción.

Al analizar las secuencias de los ADNc que presentaron una acumulación diferencial se obtuvieron las identidades de genes que participan en diferentes procesos metabólicos. Dos de los ADNc identificados tienen alta identidad con proteínas que participan en el metabolismo del nitrógeno.

Diversos trabajos revelan una conexión entre el metabolismo primario del nitrógeno y la resistencia a la enfermedad de las plantas, la carencia de asimilación de nitrato en las mutantes deficientes de NR también tiene un efecto sobre la síntesis de aminoácidos y los compuestos celulares cuya producción depende de esta enzima. .

Otro gen identificado fue el que codifica a la proteína Vsp26, la cual es parte de un complejo proteínico que tiene participación en el sistema endosomal. El tráfico intracelular de vesículas es también un blanco potencial de proteínas efectoras y compuestos producidos por el patógeno. El proceso de endocitosis y de exocitosis disparado por patógenos asegura un balance en la homeostasis celular. Los receptores que detectan al patógeno envían la señal y posteriormente son endocitados para su destrucción o recirculación.

Los resultados obtenidos hasta este momento están respaldados por un amplio número de reportes los cuales ofrecen evidencias para decir que la respuesta de la planta ante un patógeno involucra la regulación transcripcional de un gran número de genes. Muchos de estos genes regulados diferencialmente codifican proteínas que participan en las rutas tanto del metabolismo primario como del secundario, y los cambios en su síntesis pueden resultar en la reprogramación del metabolismo celular.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chen C. and Chen Z.** (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. *Plant Physiology*, 129: 1–11.
- Chomczynski P. and Sacchi N.** (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162: 156–159.
- Crawford N. M.** (1995) Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. *The Plant Cell*, 7:859–868.
- Delledonne M.** (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 390–396.
- Frost M. R., Guggenheim J. A.** (1999) Prevention of depurination during elution facilitates the reamplification of DNA from differential display gels. *Nucleic Acids Research*, 27: 1–4.
- García-Pérez H. M.** (2000) Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1: 31-41
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum*, 108: 51–60.
- Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A., Wendehenne D.** (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta*, 221: 1–4.
- Lee S. C., Hwang B. K.** (2003) Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*. *Planta*, 216: 387–396.
- Liang P., Pardee A.B.** (1992) Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257:967–971.
- Lizama Uc G., Estrada Mota I., Caamal Chan M. G., Souza Perera R., Oropeza Salín C., Islas Flores I., Zúñiga Aguilar J. J.** (2007) Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70:130–141.
- Low P. S., Chandra S.** (1994) Endocytosis in plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45:609–31.
- Müller J., Mettbach U., MenzeDiedrik, Samaj J.** (2007) Molecular Dissection of Endosomal Compartments in Plants. *Plant Physiology*, 145: 293–304.

- Popoff V., Mardones G. A., Tenza D., Rojas R., Lamaze C., Bonifacino J. S., Raposo G., Johannes L.** (2007) The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *Journal of Cell Science*, 120: 2022–2031.
- Requena M. E., Gilabert C. E., Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 124:50–60.
- Robatzek S.** (2007) Vesicle trafficking in plant immune responses. *Cellular Microbiology*, 9: 1–8.
- Ryang S.H., Chung S.Y., Lee S.H., Chan J.S., Kim H. Y. and Cho T.J.** (2002) Isolation of pathogen-induced Chinese cabbage by subtractive hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 299: 352–359.
- Schenk P. M., Kazan K., Manners J. M., Anderson J. P., Simpson R. S., Wilson I. W., Somerville S. C., Maclean D. J.** (2003) Systemic Gene Expression in *Arabidopsis* during an Incompatible Interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 132: 999–1010.
- Seaman Matthew N.J.** (2005) Recycle your receptors with retromer. *TRENDS in Cell Biology*, 15: 68–75.
- Seehaus K., Tenhaken R.** (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. *Plant Molecular Biology*, 38: 1225–1234.
- Woo C., Lee H., Cheng E., Kim K., Heo J., Kim J., Chung J., Ma Y., Fukui K., Won L. D., Kim D., Cheng Y., Lee J.** (2007) Molecular characterization of the soybean L-Asparaginase gene induced by low temperature stress. *Molecules and Cells*, 23: 280–286.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.** (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *Journal General Plant Pathology*, 69: 218–229.
- Yamasaki H., Sakihama Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Federation of European Societies Letters*, 468: 89–92.



## **CAPÍTULO IV. Systemic induction of a *Capsicum chinense* nitrate reductase by the infection with *Phytophthora capsici* and defence phytohormones**

María Goretty Caamal-Chan, Ramón Souza-Perera and José Juan Zúñiga-Aguilar

**Este capítulo fue aceptado para su publicación en la revista *Plant Physiology and Biochemistry*.**

**Keywords:** Phytophthora blight; Habanero pepper; defence phytohormones; plant defence responses.

**Abbreviations:** SA, salicylic acid; ET, ethephon; MeJa, methyl jasmonate; CcNR, nitrate reductase from *Capsicum chinense* Jacq.; PB, Phytophthora blight disease; DP, defence phytohormones; NR, nitrate reductase; hai, hours after the inoculation; haa, hours after the application; NO, nitric oxide; MS, Murashige and Skoog.

### **Abstract**

The mRNA differential display technique was used to identify genes from Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) seedlings whose expression is modified systemically by infection with the oomycete *Phytophthora capsici* L. Experiments with different oligonucleotide primer combinations revealed that no single gene was synthesised *de novo*. Instead, the quantitative accumulation of multiple transcripts was found. From these transcripts, levels of a nitrate reductase (*Capsicum chinense* nitrate reductase, CcNR), which has a high percentage of identity with other Solanaceae NRs, showed a consistent increase a few hours after inoculation (hai) with *P. capsici*. Reverse northern blotting revealed the existence of basal levels of CcNR transcripts in different adult tissues; however, systemic levels rose dramatically after spraying seedlings with salicylic acid (SA) and ethephon (ET) but not with methyl jasmonate (MeJa). Both *P. capsici* and defence phytohormones (DP) also modified NR enzymatic activity (nitrite:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase; EC 1.7.1.1) with similar kinetics. Because the application of DP induced and activated the CcNR differentially, it is possible that the activity of CcNR is related to a specific host defence response.

### **Research highlights**

► Almost all pepper species are deathly susceptible to *P. capsici*. ► The *in vitro* infection of seedling roots with the oomycete induced an NR in the leaves of young seedlings. ► The NR was also induced by the exogenous application of SA and ET but not by MeJa. ► Both *P. capsici* and DP

conducted to the systemic activation of an NR. ► Induction of NR by SA and ET might reflect an NR role in plant defence.

#### 4.1. INTRODUCTION

Phytophthora blight (PB) is a lethal disease in peppers caused by the oomycete *P. capsici* L. (Leonian, 1922). In fact, there is a small number of pepper species with consistent levels of resistance to PB (Egea et al., 1996; Ristiano et al., 1999). In contrast to what has been classically defined as compatible and incompatible interactions, which supposedly involve one-for-one gene interactions (McDowell et al., 2003), the compatibility between *P. capsici* and susceptible pepper species appears to be a complex phenomenon not exclusively due to a specific single factor (Hausbeck & Lamour) thus, this interaction could be defined as a non-host compatible interaction (Biles et al., 1995; Ristiano & Johnston, 1999; Silvar et al., 2005). Blocking of the defence response and the manipulation of the host's metabolism by oomycete pathogen effectors have been proposed as key events for the success of an infection (Kamoun, 2006). However, regardless of the efforts made to elucidate the mechanisms of oomycete pathogenicity, few advancements have been made at this time (Kamoun et al., 1999).

Searching for differentially expressed genes has been used as a general strategy to elucidate the molecular relationships between plants and their pathogens (Seehaus et al., 1998; Yamazaki & Saito, 2002; Sanabria et al., 2006; Lizama et al., 2007). In peppers, this approach has led to the identification of several genes induced by infections with compatible and incompatible pathogens (Kim & Hwang, 2000; Lee et al., 2001; Jung et al., 2003). By means of mRNA differential display, it was shown that pepper cDNAs encoding aldehyde dehydrogenase, P23 protein, NP24 protein, cytochrome P450 protein, esterase, and MADS-box proteins are expressed differentially in resistant fruits 24 and 48 h after infection with the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, which coincided with the period between fungal invasion and colonisation (Oh et al., 2003). Kim and Hwang (1994) demonstrated that genes encoding pathogenesis-related (PR) proteins, such as  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase, are induced in the leaves and stems of peppers (*C. annuum*) by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* or *P. capsici* infections. Because the expression of PR genes was higher and faster in incompatible interactions than in the compatible interactions, they suggested that the time and intensity of gene expression could lead to differences between susceptibility and resistance.

To obtain further evidence of the cellular modifications produced in the host during the early stages of PB, we attempted to identify *C. chinense* genes whose expression is modified systemically by infection with *P. capsici*. For that purpose, we applied the mRNA differential display technique to identify

genes expressed in leaves after *in vitro* inoculation with mycelia of *P. capsici* in the seedling roots. From the few genes identified, a nitrate reductase transcript (CcNR) demonstrated a minor, but consistent, accumulation soon after infection. Interestingly, the inoculation also induced NR activity with similar kinetics. In addition, both gene expression and protein activity were quickly enhanced by the external addition of defence-related phytohormones, which suggests CcNR could be part of a pepper incipient strategy to fight against *P. capsici* infection.

## 4.2. METHODS

### 4.2.1. Plant material and treatments

Surface sterilised Habanero pepper seeds of the "criollo naranja" variety were germinated *in vitro* in petri dishes with MS semi-solid medium at 25 °C in the dark. One-week-old seedlings were transferred to glass beakers and grown hydroponically (as illustrated in anexo 1) for three additional weeks at 27 °C with a light intensity at approximately 19.64  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (white fluorescent lamps) under an 8/16 h photoperiod. Four-week-old seedlings were used in all experiments. The *P. capsici* virulent strain (EMBL AY726623) was maintained by subculture (SC) on potato dextrose agar (PDA) medium in the dark at 30 °C. For inoculations with *P. capsici*, a mycelium plug from the periphery of a six-day-old SC was submerged into the liquid culture, and the symptoms were evaluated at different periods thereafter (0, 48, 72, 120, 144, and 240 hai) (anexo 2). As a negative control, seedlings were inoculated with an agar plug.

For DP treatments, the seedlings were sprayed with 5 mM SA, 5 mM ET, or 100  $\mu\text{M}$  MeJA. Samples were collected at different periods to isolate RNA (0, 0.5, 6, 12, 24, 48, and 72 h) or protein (0, 24, 48, and 72 h). To systematise the analysis, RNA samples extracted from DP-treated leaves were grouped into the early time period after application (E) (0, 0.5 and 6 h), the middle time period after application (M) (12 and 24 h), and the late time period after application (L) (48 and 72 h). ET, SA, and MeJA were purchased from SIGMA.

### 4.2.2. Isolation and sequence analysis of the CcNR cDNA

Total RNA was isolated from the leaves of pepper seedlings from each treatment using the Trizol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To avoid contamination with *P. capsici* RNA, the absence of mycelium within the seedlings stems was monitored at different periods (72 and 144 hai) in 0.5-cm sections beyond the root-stem boundary (see supplemental material 3). Subpopulations of double-stranded cDNA were prepared from two  $\mu\text{g}$  of each RNA sample using 23 oligonucleotide

primer combinations (described in the former Clontech's Delta® Differential Display Kit), SuperScript III reverse transcriptase and Taq DNA polymerase (Invitrogen) according to the methods published by Liang and Pardee (1992) and Liang et al. (2002). The corresponding cDNA populations were fractionated by electrophoresis in denaturing polyacrylamide gels (6%, w/v) and stained with silver nitrate. Differentially displayed cDNA bands were purified from the polyacrylamide gels, reamplified with their original primer combination and then cloned into the pGEM-T Easy® vector (Promega). Cloned cDNAs were sequenced at Davis Sequencing Inc. (Davis, Cal.). Oligonucleotide and deduced amino acid sequences from each cDNA were subjected to BLAST comparisons using the NCBI WEB facility. The deduced amino acid sequence from clone CCD-4 was aligned with the amino acid sequences of the two best matches of the BLAST comparison (Corpet, 1988). Analysis of conserved protein domains in the deduced amino acid sequence of clone CCD-4 was performed at ([www.proteindomain.com](http://www.proteindomain.com)).

#### 4.2.3. Gene expression analysis

The analyses of gene expression were performed in aerial parts of the seedlings. To guarantee there was no contamination with RNA from the pathogen, the absence of *P. capsici* mycelium within the seedlings stems was verified by incubating stem sections from inoculated seedlings in PDA plates, as described in supplemental material 3.

The evaluation of gene expression was confirmed by reverse northern blotting as described by Lizama-Uc et al.(2007). The CcNR clone labelled with digoxigenin (dig)-11-dUTP (Roche) by PCR was used as the probe. To prepare the target cDNA, two µg of total RNA were reverse transcribed using SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen) and the primer 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTT-3', and then each single-stranded cDNA was PCR amplified with the oligonucleotide primers 5'-ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGTAG-3' and 5' CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTT-3', which amplify the cDNA subpopulation where the CCD-4 clone was originally detected. The cDNA was fractionated by agarose gel electrophoresis and blotted to positively charged nylon membranes (Zeta-probe, BIO-RAD). The hybridisation was carried out for 24 h at 52 °C according to Church and Gilbert(1984). Positive hybridisation was detected by enhanced chemiluminescence (dig-detection kit, Roche) after exposing the nylon membrane to an autoradiography film (Amersham Hyperfilm ECL). To normalize the amount of each RNA sample, the expression level of the *C. chinense* 18S rRNA housekeeping gene was measured by RT-PCR, using primers to 18S RNA as internal standards (QuantumRNA™ Universal 18S Internal Standards, Ambion). The following PCR conditions were used: 2 min at 94 °C, 1 min at 58 °C, 30 sec at 72 °C, for 30 cycles.

#### 4.2.4. Protein extraction

Protein extracts were obtained from the leaves of pepper seedlings from each treatment using a modification of the method described by Wray and Filner (1970). Leaf tissues (0.2 g) were ground into a fine powder with a mortar and pestle using liquid nitrogen and immediately suspended in 1 mL of extraction buffer (tris-HCl 50 mM pH 8.2, EDTA 5 mM, cysteine 5 mM, 1% PVP (w/V), and 2 mM of  $\beta$ -Mercaptoetanol). Crude extracts were centrifuged at 14,000  $\times g$  for 15 min at 4 °C. The clear supernatant was used immediately for protein estimation and the measurement of enzyme activities. Protein concentration was estimated according to Bradford's method using BSA as standard.

#### 4.2.5. Nitrate reductase assay

NADH-dependent NR assays were performed essentially as described by Harris et al. (2000). The reaction mixture (1 mL total volume) consisted of reaction buffer [50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.5), 10 mM  $\text{KNO}_3$ , and 0.5 mM NADH] and the volume from each leaf extract needed to have 366  $\mu\text{g}$  of total protein. The reaction mixture was incubated for 10 min at RT, and the reaction was stopped by adding 1 mL of 1% sulphanic acid in 2 M HCl (v/v) and 1 mL of 0.02% N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride. The spectrophotometric absorbance at 540 nm was measured after 15 min. The amount of nitrite formed was calculated from a standard curve plotted using the  $A_{540}$  values obtained from known amounts of nitrite. NR activity was defined as  $\mu\text{mol}$  of nitrite formed per mg of protein per minute.

### 4.3. RESULTS

#### 4.3.1 Isolation and analysis of the CcNR cDNA sequence

By using the mRNA differential display technique, no gene transcripts synthesised *de novo* were found in leaves of *C. chinense* seedlings after they were inoculated in the roots with a virulent strain of *P. capsici* *in vitro*. Instead, few transcripts that displayed only differential expression were detected. A BLAST analysis showed that nucleotide sequences from clones CCA-1, CCB-2, and CCC-3 matched reported sequences of putative proteins with unknown functions (data not shown). Conversely, clones CCE-5, CCF-6, and CCG-7 share high similarity levels with zinc finger protein (*A. thaliana*), asparaginase (*O. sativa*), and vacuolar protein sorting-associated protein 26-like protein (*S. tuberosum*) genes, respectively (data not shown). Particularly, the cDNA sequence of clone CCD-4, with a size of 395 pb, had high similarity with nitrate reductase genes from other species of the

Solanaceae family (data not shown). The deduced amino acid sequence of clone CCD-4 had 95% identity with NR from *S. tuberosum* and 89% with NR from *N. benthamiana* (Fig. 4.1A), and it also has the NR conserved domains HAEM and FAD (Fig. 4.1B). HAEM domains of NR from *S. tuberosum* (StNR2 and StNR3) possess a subdomain of 11 amino acid residues conserved in all members of the cytochrome b5 superfamily, including two invariable histidine residues (His-571 and His-594) involved in Fe binding (Harris et al, 2000). The sequence track of clone CCD-4 contains His 594. Both StNR2 and StNR3 also possess a motif characteristic of NADH-specific NRs, which includes two conserved arginine residues (Arg-706 and Arg-868) that may be involved in the catalytic activity of the FAD domain (Harris et al.,2000). Clone CCD-4 possesses the Arg-706. Based on its sequence similarity and the presence of conserved domains in its deduced amino acid sequence, clone CCD-4 most likely encodes a fragment of a *C. chinense* NADH-dependent nitrate reductase, which was named CcNR (*C. chinense* nitrate reductase gene homologue).

# A

|                          |   |                |     |                        |     |     |
|--------------------------|---|----------------|-----|------------------------|-----|-----|
|                          | 551   | 560            | 570 | 580                    | 590 | 600 |
|                          | -----+-----+-----+-----+-----+-----                   |                |     |                        |     |     |
| <i>C. chinense</i> CCD-4 |   |                |     | SLNAGSDCTEEFDAIHSDKAKK |     |     |
| <i>S. tuberosum</i> NR   | DSAWIIVHGHYDAS  | RFLKDHPPGGVDSI | LI  | NAGTDCTEEFDAIHSDKAKK   |     |     |
| <i>N. benthamiana</i> NR | DSAWIIVHGHYDAT  | RFLKDHPPGGVDSI | LI  | NAGTDCTEEFDAIHSDKAKK   |     |     |
|                          | 501   | 610            | 620 | 630                    | 640 | 650 |
|                          | -----+-----+-----+-----+-----+-----                   |                |     |                        |     |     |
| <i>C. chinense</i> CCD-4 | LLEDFRIGELITTGYS DSSPNSVHGSSSISFLAPIKELVQTPTRVA       |                |     |                        |     |     |
| <i>S. tuberosum</i> NR   | LLEDFRIGELITTGYS DSSPNTSVHGSSSISFLAPIKELVQTPTRVA      |                |     |                        |     |     |
| <i>N. benthamiana</i> NR | LLEDFRIGELITTGYS DSGNSVHGSSSFSFLAPIKELVPVQ-RSVA       |                |     |                        |     |     |
|                          | 551   | 660            | 670 | 680                    | 690 | 700 |
|                          | -----+-----+-----+-----+-----+-----                   |                |     |                        |     |     |
| <i>C. chinense</i> CCD-4 | LIPREKIPCKLVDKQSI SPDVRRFRFALPSEDQVLGLPVGKHI FLCA TID |                |     |                        |     |     |
| <i>S. tuberosum</i> NR   | LIPREKIPCKLVDKQSI SHDVRKFRFALPSEDQVLGLPVGKHI FLCA TID |                |     |                        |     |     |
| <i>N. benthamiana</i> NR | LIPREKIPCKLVDKQSI SHDVRKFRFALPSEDQVLGLPVGKHI FLCA VID |                |     |                        |     |     |
|                          | 701   | 710            | 720 | 730                    | 740 | 750 |
|                          | -----+-----+-----+-----+-----+-----                   |                |     |                        |     |     |
| <i>C. chinense</i> CCD-4 | DKLCMRAYT   |                |     |                        |     |     |
| <i>S. tuberosum</i> NR   | DKLCMRAYTPTSTVDEVGFELVVKIYFKGVHPKFPNGGQMSQHLD SLP I   |                |     |                        |     |     |
| <i>N. benthamiana</i> NR | DKLCMRAYTPTSTIDEVGYFELVVKIYFKGTHPKFPNGGQMSQYLDSMPL    |                |     |                        |     |     |

# B

gattgcactgaggaattgatgcaattcattctgataaggccaagaagctcttgaggac  
 D C T E E F D A I E S D K A K K L L E D

ttagaattgggtgaactcataactactggttacacctctgattcctctccaaacagttct  
 F R I G E L I T T G Y T S D S S P N S S

gtccatggatcttctccatcagtagctttctagcacctattaaggagcttgttcaaac  
 V H G S S S I S S F L A P I K E L V Q T

ccaacaaggagtgtggcccttatccaagagagaaaatcccttgtaaactcgtcgacaag  
 P T R S V A L I P R E K I P C E L V D K

caatccatctcccctgatgtaggagattccgttttgcattaccctctgaagatcaagtc  
Q S I S P D V R R F R F A L P S E D Q V

ttgggcttgctgttgcaaacacatattcctctgtgccacaattgatgataagctctgc  
 L G L P V G K H I F L C A T I D D K L C

atgcgcgcgtacacg  
M R A Y T

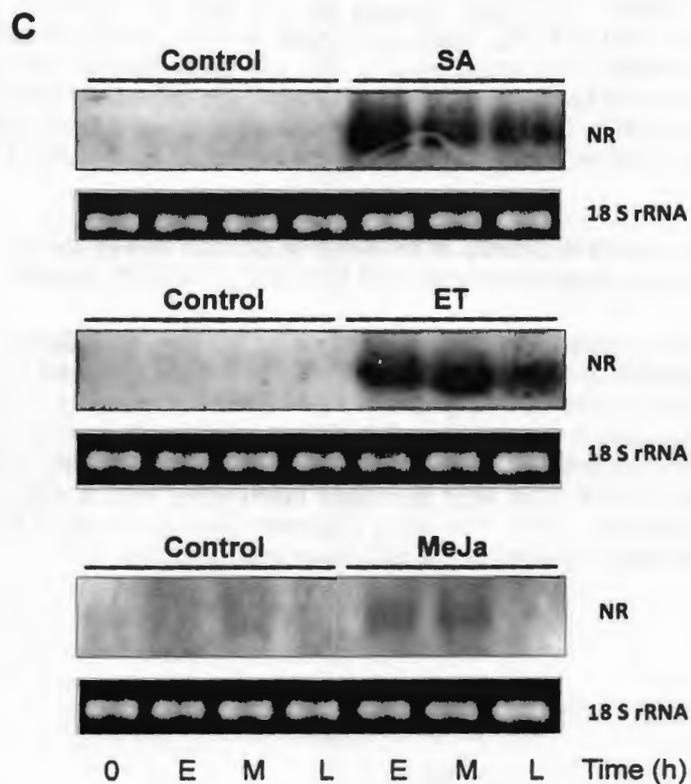
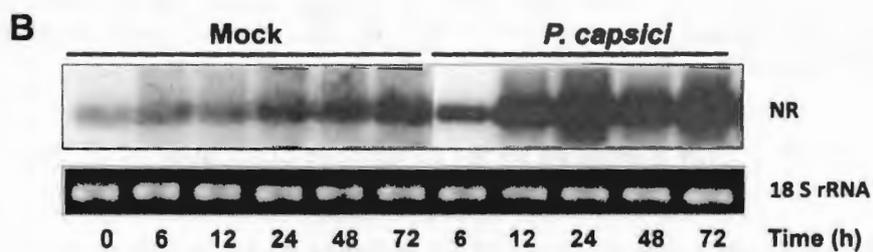
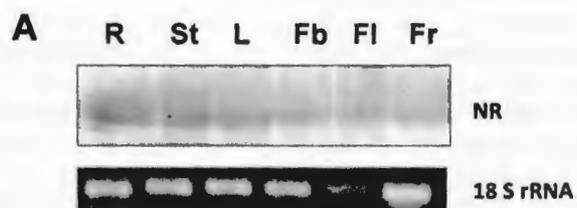
**Figure.4.1.** Analysis of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the *C. chinense* clone CCD-4

**A,** The deduced amino acid sequence of the *C. chinense* clone CCD-4 was aligned with the amino acid sequences of NR from *S. tuberosum* (GenBank accession code BAB935349) and *N. benthamiana* (GenBank accession code AB12345) (Corpet,1988). Perfect matches are colored in red. Conserved amino acid changes are in blue. Non-conserved amino acid changes are in black. **B,** The protein functional domains of the deduced amino acid sequence of the clone CCD-4 were obtained using the NCBI Conserved Domain Search service (CD search). Amino acids from the HAEM and FAD domains of plant NRs are underlined. A conserved Hys-594 residue from the Fe binding domain is boxed. A conserved Arg-706 residue from the NADH-binding domain is boxed with dotted line.

**4.3.2 CcNR is expressed in adult tissues and is induced systemically by inoculation with *P. Capsici***

Quantification of CcNR transcripts showed that, under normal conditions, there is a basal steady state level in leaves, stems and roots of Habanero pepper seedlings cultivated *in vitro* under hydroponic conditions (Fig. 4.2A). When the mycelium of *P. capsici* was deposited in the liquid medium, without touching the root epidermis directly, there was a noticeable increase in CcNR transcripts in the seedling leaves from at least six hai (Fig. 4.2B). This increase reached a maximum by 12 hai and remained high for at least 72 hai. Although the application of a PDA plug (Mock-treatment) also produced a slight increment of CcNR transcripts, the accumulation was faster and much higher in seedlings inoculated with the mycelium of *P. capsici* (Fig. 4.2B).

These results corroborated that CcNR was induced in systemic tissues early after Habanero pepper roots were infected with *P. capsici*. In some plant species the induction of NR is related to defence against pathogens (Yamamoto et al.,2003;Yamamoto et al.,2006;Modolo et al.,2005; Modolo et al.,2006); however, in our system all the infected seedlings died, suggesting that the induction of CcNR is ineffective or is not related to defence. To further investigate whether the cloned NR was also activated by pathogen-activated systemic signals, we sprayed the pepper seedlings with defence phytohormones and analyzed its effect on the expression of CcNR.



**Figure 4.2. Expression of CcNR under different treatments.**

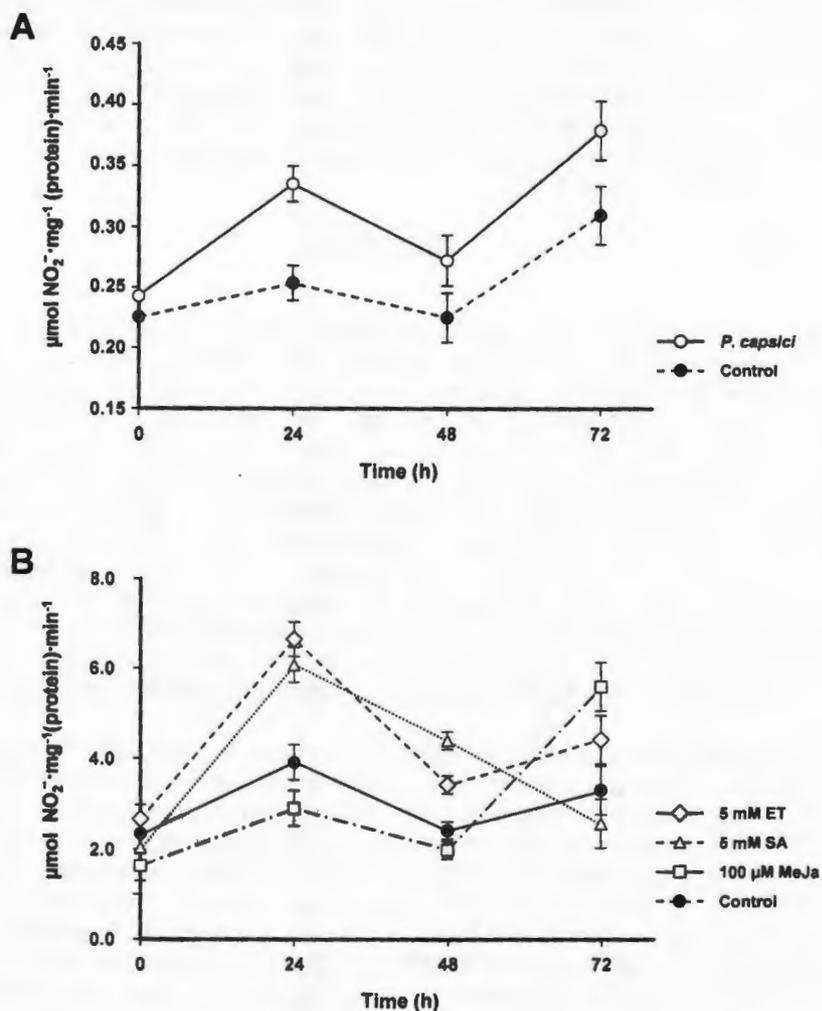
The corresponding cDNA populations were hybridised with the clone (CCD-4) labelled with digoxigenin, as described in section 2.3. **A**, Transcript levels of CcNR in different organs of the plant. **B**, Modifications in the expression of CcNR during the first 72 haa with *P. capsici* in the roots; inoculation with an agar plug was used as a mock treatment. **C**, Modifications in the expression of CcNR during the first 72 haa of SA, ET or MeJa. R: root; St: stem; L: leaf; Fb: flower button; Fl: flower; Fr: fruit; E: early time after the application (0-6 haa); M: middle time after the application (12-24 haa); L: late time after the application (48-72 haa). The RT-PCR amplification of a 315 bp *C. chinense* transcript for 18S rRNA was used as internal control to normalize the amount of RNA. Each experiment was repeated at least three times and representative images are shown.

**4.3.3 CcNR is induced by the exogenous application of defence phytohormones**

Spraying with 5 mM SA or 5 mM ET solutions on the leaves of seedlings cultivated in hydroponics induced rapid expression of CcNR (Fig. 4.2C). The accumulation of CcNR transcripts induced by SA and ET reached a maximum between 0 and 6 h after application (haa) and remained high until at least 72 haa. However, the application of 100  $\mu$ M MeJa exerted only a modest influence on the basal levels of CcNR transcripts, especially during the first haa (Fig. 4.2C). The rapid and robust induction suggested that CcNR could play a role in the systemic response mediated by SA and ET but not by MeJa.

**4.3.4 Nitrate reductase activity is modified in pepper leaves by the addition of defence phytohormones and inoculation with *P. Capsici***

The existence of a peptide domain characteristic of the NADH-dependent plant nitrate reductases in the deduced amino acid sequence suggests that CcNR encodes an enzyme of this type. The inoculation of seedling roots with *P. capsici* led to the increase of basal NADH-dependent NR activity, as detected in protein extracts obtained from leaves. This NR activity was enhanced between 0 and 24 h after pathogen inoculation, with a second peak starting by 72 h (Fig. 4.3A). The mock treatment scarcely modified this NR activity with the same kinetics as the pathogen treatment (Fig. 4.3A).



**Figure 4.3.** Activity of nitrate reductase under different treatments. Activity of NADH-dependent nitrate reductase was determined in leaf protein extracts as described in section 2.4. **A**, Modifications in the enzymatic activity of CcNR during the first 72 h ai with *P. capsici* in the roots; inoculation with an agar plug was used as a mock treatment. **B**, Modifications in the enzymatic activity of CcNR during the first 72 h aa of SA, ET or MeJa. As a control, seedlings were sprayed with 0.01% Tween 20 (v/v). Bars represent the standard error of three independent experiments.

The basal NR activity present in the protein extracts of leaves was enhanced differentially if the seedlings were sprayed with DP. One peak of NR was detected between 0 and 24 h after the seedlings were sprayed with 5 mM SA or 5 mM ET. In both treatments, the activity decreased to nearly basal levels by 72 haa (Fig.4.3B). Conversely, spraying with 100  $\mu$ M MeJa did not enhance NR activity at early-middle time periods (between 0 and 48 haa), but it did it at 72 haa (Fig.4.3B).

#### 4.4. DISCUSSION

The interactions between *P. capsici* and the species of the genus *Capsicum* have been a matter of intensive research for decades. However, the mechanisms by which the pathogen blocks host defences and causes the lethal disease Phytophthora blight are not yet clear (Hausbeck& Lamour,2004). The manipulation of the host's metabolism through the secretion of pathogen effectors into the host apoplast and cytoplasm may be a determinant (Kamoun,2006). Thus, the identification of genes expressed differentially during the progress of the disease could offer fundamental information about the mechanism of infection. The different techniques applied to identify genes involved in the defence response of peppers against PB have recurrently identified genes encoding either PR proteins (Kim& Hwang,2000) or enzymes involved in the synthesis of secondary metabolites in the susceptible as well as resistant varieties (Mozzetti et al.,1995).

In the present work, the *in vitro* infection of seedling roots with *P. capsici* systemically modified transcript accumulation and enzyme activity of *C. chinense* NR. Plant NR catalyses the conversion of nitrate to nitrite using NAD(P)H as a cofactor, a reaction constituting the rate-limiting step in nitrate assimilation in higher plants (Campbell, 1988). NR also participates in the establishment of defences against pathogens. The first evidence of this function was observed in *S. tuberosum*; inoculation with *P. infestans* induced the expression of NR in an incompatible, and not a compatible, interaction (Yamamoto et al.,2003). Furthermore, the application of oomycete elicitors to tubers induced NR at the transcriptional and protein level (Yamamoto et al.,2003). In that report, the authors suggested that the involvement of NR in the production of nitric oxide (NO) was part of a defence response against the oomycete. The capacity of plant NR to generate NO has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* (Yamasaki& Sakihama, 2000; Rockel et al.,2002). In fact, NR can be an important supplier of NO, particularly under certain biotic and abiotic stress conditions (Zhao et al.,2009; Kolbert et al.2010). The production of NO through NR has a relevant function in some plant-pathogen interactions (Wilson et al.,2008). The silencing of NR genes in *N. benthamiana* significantly decreases the NO production induced by INF1, a major elicitor secreted by *P. infestans* (Yamamoto et al.,2006).

Additional evidence of the role of NR in the production of NO during plant-pathogen interactions came from an NR-deficient *A. thaliana* mutant; this mutant displayed an impaired hypersensitive response and the reduced production of NO when it was inoculated with an avirulent strain of *P. syringae* (Modolo et al., 2006). The NR-deficient plants lacked L-arginine and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, two important endogenous substrates for NO synthesis. According to these reports, it is possible that the fast induction of CcNR in the leaves of *C. chinense* seedlings may represent the initiation of a systemic response; however, because inoculation with *P. capsici* ultimately led to the death of all seedlings, the observed induction of CcNR could represent the incipient triggering of a systemic response against PB that was insufficient to stop the infection.

The successful establishment of systemic responses upon pathogen attack is regulated by the quantity, timing and balance of the DP produced (Pieterse et al., 2009). In this work, the foliar application of SA or ET, but not of MeJa, modified the expression of the CcNR gene at the transcriptional and posttranslational levels. In corroboration with their effects on NR expression, the spraying of Habanero pepper seedlings *in vitro* with 5 mM ET, but not with 100 µM MeJa, conferred resistance against *P. capsici* [Núñez-Pastrana et al., personal communication]. These results, which support the hypothesis that CcNR could be part of a systemic response, are in close agreement with the results obtained in *S. tuberosum*, where NR transcripts accumulated in response to SA and arachidonic acid (AA), whilst no transcripts were detected in tuber disks treated with water or MeJa (Yamamoto et al., 2003). In a different report, the application of high concentrations of SA induced resistance against *P. capsici* in four *C. annuum* varieties with different susceptibility (Mao et al., 2004). In our model, the application of SA did not confer resistance, possibly because we added it in low concentrations [Núñez-Pastrana et al., personal communication]. Nevertheless, the coincidence between the induction of resistance and the expression of CcNR by the addition of DP indirectly supports the proposal that CcNR could be part of a systemic response.

Even though infection with *P. capsici* or treatment with DP *in vitro* modified the CcNR gene only quantitatively, there are reports suggesting that the difference between resistance and susceptibility could rely on the strength and the time of expression of the defence genes (Kim & Hwang, 2000; Lee & Hwang, 2003); for example, Requena *et al.* (Requena et al., 2005) showed that in response to *P. capsici* infection, resistant (Serrano Criollo de Morelos, SCM) and susceptible (Americano, AM) varieties of *C. annuum* develop a hypersensitive reaction and generate NO, but only SCM resists the infection, while AM succumbed to the disease. Also, the production of NO is always higher and is synthesised earlier in SCM than in AM tissues. The work from Requena *et al.* offered the first evidence supporting a role for NO in the resistance to *P. capsici* in peppers (*C. annuum*). In our model, we are

currently investigating whether in *C. chinense* the induction of CcNR leads to the synthesis of NO during the infection with *P. capsici*.

### **Acknowledgements**

The authors wish to acknowledge the technical assistance from Dr. Ileana Echevarría with the nitrate reductase activity assays. This project was supported by CONACYT grant P-48831. MGCCh had Ph.D. fellowship 204985.

## REFERENCES

- Biles C. L., Bruton B. D., Wall M.M. and Rivas M.** (1995) *Phytophthora capsici* zoospore infection of pepper fruit in various physical environments, Proceeding of the Oklahoma Academy of Science, 75:1–5.
- CORPET F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, Nucleic Acids Research, 16:10881–10890.
- Church G. M., Gilbert W.** (1984) Genomic sequencing, Proceeding of the National. Academy of Sciences USA, 81: 1991–1995
- Egea C.F., Alcázar M. D. and Candela M. E.** (1996) Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 98: 737–792.
- Harris N., Foster J. M., Kumar A., Davies H., Gebhardt C., and Wray J.** (2000) Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée): sequence analysis, genomic organization and expression, Journal of Experimental Botany, 347: 1017–1026.
- Hausbeck M. K. and Lamour K. H.** (2004) *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges, Plant Disease, 88: 1292–1303.
- Jung H. W, Kim W. and Hwang B. K.** (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses, Plant, Cell and Environment, 26: 915–928
- Kamoun S.** (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. The Annual Review of phytopathology, 44: 41–60.
- Kamoun S., Huitema E. and Vleeshouwers V. G.A.A.** (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?, Trends in Plant Science. 4:196–200.
- Kim Y. J. and Hwang B. K.** (1994) Differential accumulation of  $\beta$ -1-3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*, Physiological and Molecular Plant Pathology, 45: 195–209.
- Kim Y. J. and Hwang B. K.** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible, Physiologia Plantarum, 108: 51–60.
- Kolbert Z., Ortega L. and Erdei L.** (2010) Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress- induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots, Journal of Plant Physiology, 167: 77–80.

- Lee S. C. and Hwang B. K.** (2003) Identification of the pepper SAR8.2 gene as a molecular marker for pathogen infection, abiotic elicitors and environmental stresses in *Capsicum annuum*, *Planta* 216: 387–396.
- Lee S. C., Kim Y. J and Hwang B. K.** (2001) A pathogen-induced chitin-binding protein genes from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding, *Plant and Cell Physiology*, 42: 1321–1330.
- Leonian L.H.** (1922) Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species. *Phytopathology* 12: 401–408.
- Liang P. and Pardee A. B.** (1992) Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257:967–971.
- Liang P.** (2002) A decade of differential display, *Biotechniques*, 33: 338–346.
- Lizama Uc G., Estrada Mota I., Caamal Chan M. G, Souza Perera R., Oropeza Salín C., Islas Flores I. and Zúñiga Aguilar J. J.** (2007) Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L., *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 130: 70–141.
- Mao A. J., Wang Y. J., Feng L. X., Geng S. S. and Xu Y.** (2004) Study on the resistance induced by salicylic acid against *Phytophthora capsici* in Pepper, *Sci. Ag. Sinica* 10.
- McDowell J. M and Woffenden B.** (2003) Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications, *Trends in Biotechnology*. 21: 178–183.
- Modolo L. V., Augusto O., Almeida I. M. G., Magalhaes J. R., Salgado I.** (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS letters* 579: 3814-3820
- Modolo L. V., Augusto O., Almeida I. M. G, Pinto-Maglio C., Oliveira H. C., Seligman K., Salgado I.** (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plant impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*, *Plant Science*, 171: 34–40.
- Mozzetti C., Ferraris L., Tamietti G., and Matta A.** (1995) Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*–pepper interactions, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46: 95–107.
- Oh B. J., Ko M. K., Kim K. S., Kim Y. S., Lee H. H., Jeon W. B., and Im K.H.** (2003) Isolation of defense-related genes differentially expressed in the resistance interaction between pepper fruits and the anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, *Molecules and Cells*, 15: 349–355.

- Pieterse Corné M. J., Reyes Antonio L., Van der Ent S., and Van Wees S. CM.** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity, *Nature Chemical Biology*, 5: 308–316.
- Requena M. E., Gilabert C. E., and Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity, *Physiologia Plantarum*, 124: 50–60
- Ristaino J. B. and Johnston S. A.** (1999) Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on Bell pepper, *Plant Disease*, 83: 1080–1089.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J. and Kaiser M.** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, *Journal of Experimental Botany*, 53: 103–110.
- Sanabria N. M. and Dubery I. A.** (2006) Differential display of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance, *Biochemical and Biophysical. Research. Communications*, 344: 1001–1007.
- Seehaus K. and Tenhaken R.** (1998) Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *Plant Molecular Biology*, 38: 1225–1234.
- Silvar C., Duncan J.M, Cooke D.E.L., Williams N.A., Díaz J. and Merino F.** (2005) Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon., *European journal of plant pathology* 112: 43–52.
- Wray J. and Filner P.,** (1970) Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley, *Biochemical Journal*, 119: 715–725.
- Wilson I. D., Neill S. J. and Hancock J.T.** (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant Cell and Environment*, 31: 622–631.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.** (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals, *Journal of General Plant Pathology*, 69: 218–229.
- Yamamoto K. A., Katou S., Yoshioka H., Doke N. and Kawakita K.** (2006) Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant and Cell Physiology*, 47: 726–735.
- Yamasaki H. and Sakihama Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters*, 468: 89–92.
- Yamazaki M. and Saito K.** (2002) Differential display analysis of gene expression in plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59: 1246–1255.

**Zhao M. G., Chen L., Zhang L. L., and Zhang W. H. (2009)** Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 151: 755–767

## **CAPÍTULO V. La actividad de NR de plántulas de *Capsicum chinense* es inhibida por el tungstato de sodio en etapas tardías de la infección.**

### **5.1. INTRODUCCIÓN**

El primer paso en la asimilación de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) consiste en la reducción de nitrato a nitrito, en donde el NAD(P)H sirve como el donador fisiológico de dos electrones. Esta reacción es catalizada por la Nitrato Reductasa (NR), una enzima altamente regulada. La capacidad de la NR para reducir el nitrato en la planta depende de varios factores: (a) la disponibilidad de sus sustratos en el citoplasma (concentraciones de NAD(P)H y nitrato); (b) el nivel de NR funcional (la cantidad de polipéptido de NR y la disponibilidad de cofactores y iones metálicos –FAD, grupo hemo, Fe, Mo-MPT y Mo) y; (c) el nivel de actividad de la NR funcional (Campbell, 1999).

La NR está sujeta a un control multifactorial tanto en el nivel transcripcional como post-traducciona. Se han establecido tres dominios catalíticos definidos para las NR, el dominio FAD, el dominio HAEM (cytrocromo  $b_{557}$ ) y el dominio MoCo que transfiere electrones de NADH al nitrato, sustrato de la enzima (Solomonson y Barder, 1990; Harris *et al.*, 2000). La NR también tiene la capacidad de generar NO, una actividad que ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo* (Yamasaki y Sakihama, 2000; Rockel, 2002). La enzima genera NO a partir de nitrito, empleando NAD(P)H como donador de electrones. El NO es generado probablemente usando MoCo (cofactor molibdeno) como sitio catalítico (Neill *et al.*, 2003).

Con base en el uso de cofactores y en su valor de pH óptimo de catálisis, se ha demostrado la existencia de diferentes isoformas de la NR. Existen las isoformas de NR que es biespecífica de [NAD(P)H:NR] con un pH óptimo de 6.5, una NADPH:NR específica con un pH óptimo de 6.5. La otra isoforma, que es inducible, tiene un máximo de actividad a pH 7.5 y utiliza al NADH como cofactor (NADH:NR), es característica de plantas superiores (Solomonson y Barder, 1990; Harris *et al.*, 2000).

Con base en su regulación, existen varias isoformas de NR que son inducidas en diversas especies por factores como la luz o la concentración de nitrato, mientras que otras están activadas de forma constitutiva (Aslam *et al.*, 1982; Harris *et al.*, 2000). Con relación a otros factores que inducen la actividad de la NR, Yamamoto y colaboradores (2003) reportaron la acumulación de transcritos correspondiente a una NADH:NR al elicitar discos de papa con componentes de la pared celular del oomiceto *Phytophthora infestans*. Estos transcritos también fueron inducidos por la adición de Ácido Salicílico(SA) y de ácido araquidónico, pero su acumulación no fue afectada por el Jasmonato de metilo (MeJa).

Experimentalmente, la actividad de la NR ha sido estudiada mediante la adición de tungstato de sodio ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ), debido a que el pretratamiento con  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  reduce la subsecuente actividad de NR en la célula. El  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  funciona como análogo del molibdeno, el cual es el cofactor metálico de la NR. La reducción en la actividad de la NR en las plantas es causada por la síntesis de una proteína- $\text{Na}_2\text{WO}_4$  inactiva (Neill *et al.*, 2003; Lillo *et al.*, 2001).

Planchet y colaboradores (2006) observaron que la elicitación de plantas silvestres de *Nicotiana tabacum* con criptogeína, un péptido de 98 aminoácidos producido por el oomiceto *Phytophthora cryptogea*, afectó levemente el desarrollo de lesiones características de la respuesta de hipersensibilidad cuando las plantas fueron cultivadas en presencia de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  500  $\mu\text{M}$  en lugar de molibdeno. Bajo las mismas condiciones, la elicitación de mutantes deficientes en la actividad de NR produjo resultados similares, por lo que los autores concluyeron que la NR no es requerida para inducir la muerte celular programada.

Aún cuando existen múltiples reportes del uso del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  para el estudio de la NR en plantas, Aslam y colaboradores (1982) reportaron que la actividad de NADH:NR inducida por nitrato es inhibida por  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ; sin embargo, este análogo del molibdeno no tienen un efecto sobre la actividad de la NADH:NR constitutiva de *Glycine Max*.

Con base en estas evidencias, puede decirse que el empleo del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  constituye una herramienta útil para analizar de forma indirecta el efecto de la infección por patógenos sobre la actividad de la NR, pues la información obtenida puede ser valiosa para determinar el papel de la NR durante la infección.

Como se presenta en el Capítulo IV de este trabajo, la CcNR tiene una alta identidad con la secuencia deducida de aminoácidos con la NR de *S. tuberosum* y de *N. benthamiana*. Los dominios presentes en la secuencia deducida de aminoácidos, sobre todo la presencia de una arginina conservada en la posición 706 (Arg<sup>706</sup>), permiten determinar que la CcNR codifica una NR dependiente de NADH (NADH:NR) (Harris *et al.*, 2000; Baijal y Sane, 1988; Sato *et al.*, 1992). Nuestros datos indican que tanto los transcritos como la actividad de la CcNR son inducidos por la inoculación con *P. capsici*.

Con base en estos antecedentes, en esta parte del trabajo se analizó si el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  tiene un efecto sobre la actividad NADH:NR de la CcNR que es inducida por la infección con *P. capsici*.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1. Tratamiento con $\text{Na}_2\text{WO}_4$ para inhibir la actividad de la nitrato reductasa de chile habanero

El protocolo que se empleó para inhibir a la enzima NR dependiente de NADH se basó en el reporte de Planchet (2006). Para ello, se siguió la metodología ya empleada y presentada en este documento para la obtención de plántula en hidroponía durante los primeros 20 días de la fase de crecimiento de las plántulas (Capítulo I). En la segunda fase se colocó a las plántulas durante 5 días en un medio MS carente de  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ . Transcurrido este período, se renovó el medio anterior con uno suplementado con  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  a una concentración de 150 y 500  $\mu\text{M}$ . Este medio fue cambiado de forma diaria, durante 4 días, con el objetivo de que la enzima sintetizada *de novo* contenga incorporado el tungstato de sodio. Al concluir esta etapa de cuatro días se eliminó la solución nutritiva que contenía el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  y se substituyó con el mismo medio pero libre de la fuente de molibdeno.

### 5.2.2. Inoculación de plántulas previamente tratadas con $\text{Na}_2\text{WO}_4$

Para determinar la contribución de la actividad NADH:NR durante la interacción con *P. capsici* se realizaron los tratamientos en seguida descritos.

Posterior al tratamiento de las plántulas con  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , las plántulas fueron inoculadas en la raíz con micelio de *P. capsici* (P.T.I.). Adicionalmente, se realizaron los siguientes tratamientos testigo: i) Un lote de plántulas fue cultivada en las mismas condiciones anteriores, pero fueron inoculadas con un disco de medio PDA (P.T.T.); ii) un lote de plántulas fueron cultivadas en hidroponía por 4 semanas y posteriormente fueron inoculadas con *P. capsici* (P.I.) y; iii) un lote de plántulas fueron sometidas al tratamiento ii) pero a éstas se les colocó un disco de PDA (P.T.).

### 5.2.3. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas se empleó la metodología reportada por Wray y Filner (1970) con ligeras modificaciones. Doscientos miligramos de hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas, posteriormente se adicionó 1 mL del amortiguador de extracción (Tris-HCl 50 mM (pH 8.2), EDTA 5 mM, cisteína 5 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM) y se centrifugó a 14,000 x g por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue empleado inmediatamente para estimar la concentración de proteínas por el método de Bradford y para determinar la actividad enzimática.

#### 5.2.4. Análisis de la actividad de la NR

El análisis de la actividad de nitrato reductasa dependiente de NADH se realizó según lo descrito por Harris *et al.* (2000). La mezcla de reacción consistió en el amortiguador de reacción ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 7.5),  $\text{KNO}_3$  10 mM y NADH 0.5 mM), el volumen del extracto proteico necesario para 0.366 mg de proteína y el volumen de agua necesario para 1 mL total de mezcla de reacción. Esta mezcla fue incubada por 10 minutos en oscuridad a TA y la reacción fue detenida por la adición de 1 mL de una solución de sulfanilamida al 1% en HCl 2M, seguido de 1 mL de una solución de NEDH 0.02%, e incubando por 15 minutos en oscuridad. La cantidad de nitrito formado fue calculado midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción a 540 nm en un espectrofotómetro e interpolando los valores en una curva estándar de nitrito.

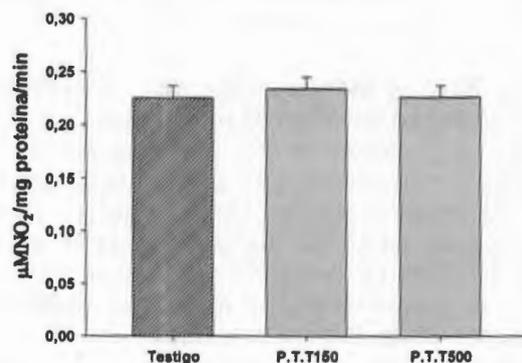
### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3.1. Efecto del $\text{Na}_2\text{WO}_4$ en la actividad constitutiva de la NR de chile habanero

Inicialmente se decidió determinar experimentalmente cuál era la concentración de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  más apropiada para inhibir la actividad de la CcNR. Como antecedentes, Aslam (1982) empleó concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  para analizar su efecto en la actividad de la NR en *Glycine max*, mientras que Planchet *et al.*, (2006) emplearon una concentración de 500  $\mu\text{M}$  para *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi.

Ante los diversos rangos de concentración que se reportan en la literatura, decidimos evaluar para este estudio plántulas de 4 semanas cultivadas en hidroponia, previamente tratadas con 150 o 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ . Como testigo, las plántulas fueron cultivadas en presencia de  $\text{NaNO}_3$  de manera continua.

Como se observa en la Figura 5.1, bajo condiciones normales de crecimiento, la actividad de la NR dependiente de NADH no se vió afectada con ninguna de las dos concentraciones (P.T.T150 y P.T.T 500), cuando se comparan sus valores con los obtenidos con el tratamiento testigo (P.T.).



**Figura 5.1.** Efecto del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  sobre la actividad de la NADH:NR de *Capsicum chinense*. La actividad de la nitrato reductasa fue determinada en hojas de plántulas de *C. chinense* que fueron tratadas previamente con 0, 150 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (Testigo, P.T.T 150 y P.T.T 500, respectivamente). Cada experimento se repitió tres veces y las barras representan el error estándar,;  $n=3$ ...

Esto parecería indicar que la actividad de la NADH:NR de chile habanero no es inhibida por el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ; sin embargo, existen reportes sobre la existencia de isoformas de la NR que se inhiben diferencialmente con el tratamiento con  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ . Se sabe que en hojas de *Glycine max*, la actividad endógena constitutiva de NR y la inducida por nitrato son afectadas diferencialmente por el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  (Asian, 1982). En ese reporte se observó que el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  inhibió completamente el desarrollo de la actividad de la NR inducida por nitrato, desde una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , pero se obtuvo solamente un leve efecto sobre la actividad de la NR constitutiva. Adicionalmente, Saroop y Singh (2000) observaron que en *Brassica juncea* una concentración de 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  afecta la actividad de NR inducida por nitrato, pero no afecta la actividad de NR inducida por la luz.

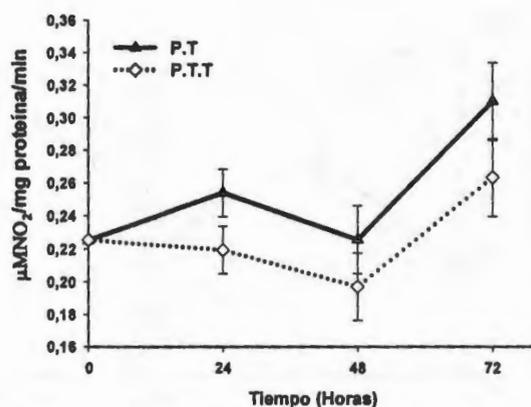
De esta manera, tomando en cuenta que la actividad de NR es inducida por la infección por *P. capsici*, decidimos analizar bajo esas condiciones si el inhibidor podría tener algún efecto sobre la actividad de la nitrato reductasa "inducida", ya que al parecer no existe un efecto sobre la actividad "constitutiva".

### 5.3.2. Efecto del $\text{Na}_2\text{WO}_4$ en la actividad de la NR inducida por *P. capsici*

Se ha reportado en diversas especies vegetales que algunas isoformas de NADH:NR son inducibles en condiciones específicas (Luz, concentración de nitrato, patógenos, etc.). Debido a que la secuencia de la CcNR tiene elementos que indican que codifica una enzima dependiente de NADH, y que su actividad es inducida por patógenos y por el nitrato (Dra. Ileana Echeverría, comunicación personal), decidimos analizar si el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  tiene un efecto sobre la actividad de la NADH:NR inducida por *P. capsici*, ya que se ha reportado que este análogo de Molibdeno afecta la actividad de NADH:NR inducido por nitrato (Aslam *et al.*, 1982).

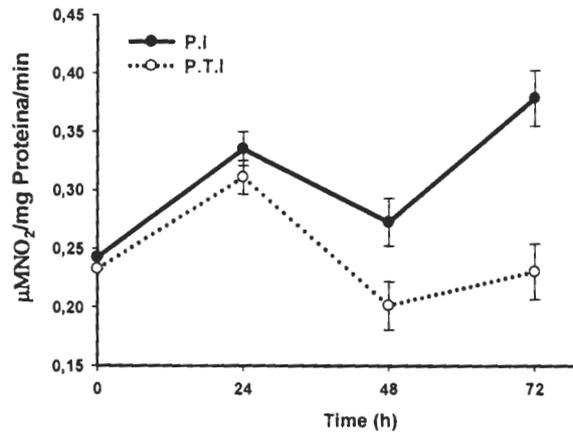
Debido a que observamos un ligero incremento de la actividad de la NR cuando se coloca el disco de PDA en el medio (resultados del Capítulo IV), decidimos analizar primeramente si el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  tenía un efecto inhibitor en muestras de los tratamientos testigo (plántulas inoculadas con discos de medio PDA (P.T.T), tomando como referencia los períodos de muestreo anteriores (0, 24, 48 y 72 horas).

Como se presenta en la Figura 5.2, a pesar de que los promedios indican que si hay un efecto inhibitor ligero sobre la NR inducida por la inoculación con discos de micelio, las diferencias no son estadísticamente significativas. De esta manera, puede decirse que no existe un efecto significativo sobre la actividad de NADH:NR inducida por el medio PDA en las plántulas tratadas con  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  en los tiempos analizados.



**Figura 5.2.** Efecto de 500 µM de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> sobre la actividad de la NADH:NR de *Capsicum chinense*. La actividad de la NR fue determinada en tejido de hojas de *C. chinense* previamente tratadas con 0 y 500 µM de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>. La actividad se determinó a las 0, 24, 48, y 72 h después de haberse adicionado el disco de medio PDA. Cada experimento se repitió tres veces y las barras representan el error estándar; n=3.

A continuación se determinó el efecto de la inhibición de la NR inducida por la infección con *P. capsici*. En la Figura 5.3 se puede observar que la actividad de la NADH:NR inducida por *P. capsici* no es inhibida por el tratamiento con 500 µM de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> en las primeras 24 horas después de la infección (P.T.I.), pero sí se observa una inhibición estadísticamente significativa de la NADH:NR a las 48 y 72 horas después de la inoculación con el micelio de *P. capsici* (P.T.I.).



**Figura 5.3.** Efecto del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  sobre la actividad de la NADH:NR de *Capsicum chinense* infectada con *P. capsici*. La actividad de nitrato reductasa fue determinada en tejido de hojas de *C. chinense* previamente tratadas con 0 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ . La actividad se determinó a las 0, 24, 48 y 72 h después de la inoculación con *P. capsici*. Cada experimento se repitió tres veces y las barras representan el error estándar;  $n=3$ .

El análisis de los resultados que se muestran en las Figuras 5.2 y 5.3 indican que el tratamiento con el inhibidor no afecta la actividad constitutiva de NR pero si afecta diferencialmente a la actividad inducida por *P. capsici*, después de las 24 horas de la inoculación.

#### 5.4. CONCLUSIÓN

El tratamiento con 150 y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  no afecta la actividad constitutiva de plántulas de cuatro semanas de *C. chinense*.

El tratamiento con una concentración de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  a afectó de forma diferencial la actividad de la NADH:NR; no afectó a la actividad que está presente de forma constitutiva en las plántulas cultivadas en hidroponía, pero sí lo hizo con la actividad que es inducida por el oomiceto *P. capsici*. La actividad de NADH:NR inducida por el *P. capsici* en plántulas previamente tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  se vió reducida después de las 24 horas después de la inducción.

Ya que la NR es regulada tanto a nivel transcripcional como postraduccionnal, es muy complicado hacer un análisis del significado de los resultados obtenidos en la inhibición de la actividad inducida por *P. capsici*. Sin embargo, es posible suponer que la actividad constitutiva de la NADH:NR no se haya afectado por el inhibidor debido a que las plántulas se desarrollaron en un medio rico, en presencia de nitrato y molibdeno, lo cual fue suficiente para tener los niveles de proteína activa (con el cofactor molibdeno) en el momento de hacer el análisis. El efecto del  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  sobre la actividad NADH:NR inducida por *P. capsici* se observa en tiempos tardíos de la infección, por lo que planteamos la posibilidad de que en las etapas tempranas de la infección existe suficiente proteína activa. Este trabajo demostró que en etapas intermedias se incrementa los niveles de transcritos de la NR (Capítulo IV), lo cual sugiere que a partir de esa etapa posiblemente se esté llevando a cabo la síntesis de *novo* de proteínas, las cuales requieren de molibdeno externo; sin embargo, al encontrarse el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  en el medio, éste es tomado e incorporado a la proteína teniendo el efecto sobre la actividad inducible.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aslam M.** (1982) Differential effect of tungsteno n the development of endogenous and nitrate induced nitrate reductase activities in soybean leaves. *Plant Physiology*, 70: 35–38.
- Baijal M., Sane P. V.** (1988) Arginine residue(s) at the active site(s) of the nitrate reductase complex from *Amaranthus*. *Phytochemistry*, 27: 1969-1972.
- Campbell W. H.**(1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the Gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 277-303
- Harris N., Foster J. M., Kumar A., Davies H., Gebhardt C., Wray J.** (2000) Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée): sequence analysis, genomic organization and expression. *Journal of Experimental Botany* 347: 1017-1026
- Lillo C., Meyer C., Ruoff P.** (2001) The nitrate reductase cicardian system. The central contra multiple oscillatory feedback loops. *Plant Physiology*, 125: 1554–1557.
- Neill S.J., Desikan R., Hancock J. T.** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159: 11-35.
- Planchet E., Sonoda M., Zeier J., Kaiser W. M.** (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein-induced hypersensitive response-a critical re-evaluation. *Plant, Cell and Environment*, 29: 59-69.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser M.** (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 53:103-110.
- Sato Y., Shiraishi N., Sato T., Ogura N., Nakagawa H.** (1992) Arginine and lysine residues as NADH- binding site in NADH-nitrate reductase from spinach. *Phytochemistry*, 31: 2259-2262.
- Solomonso L. P., Barber M. J.** (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41: 225- 253.
- Wray J., Filner P.** (1970) Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. *Biochemical Journal* 119: 715-725.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.** (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *Journal General Plant Pathology*, 69: 218–229.
- Yamasaki H., Sakihama Y.** (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Federation of European Societies Letters*, 468: 89–92.

## CAPÍTULO VI. Discusión y conclusiones generales

En este capítulo se presenta una discusión integral de todos los resultados obtenidos, con énfasis en la función que pudieran tener los productos de los genes de *C. chinense* identificados durante la infección con el oomiceto *P. capsici*.

En este trabajo se demostró que la inoculación de plántulas de chile habanero cultivadas en hidroponía genera los síntomas característicos de la Marchitez del Chile, causada por la infección con el oomiceto *P. capsici* (Capítulo II). Los primeros síntomas visibles se presentan desde el tercer día después de la inoculación; sin embargo, el avance del micelio interno en la planta se encuentra a 0.5 cm por arriba de la necrosis, en tejido aparentemente sano. La muerte de la planta ocurre alrededor de los 10 días postinoculación. Todo esto indica que el chile habanero es un hospedero de este patógeno y que el sistema puede estudiarse *in vitro*, constituyendo un buen modelo experimental.

Existen diversos estudios sobre la interacción del oomiceto *P. capsici* con diferentes especies del género *Capsicum*. Salvo un par de variedades de la especie *C. annuum* sin valor comercial, hasta el momento no existen plantas de chile resistentes y sólo algunas variedades presentan cierto nivel de tolerancia a este patógeno letal (Requena *et al.*, 2005). Por ello, el análisis de los genes que participan en la resistencia ha sido muy complejo. En reportes se ha observado que la expresión de genes relacionados con la defensa ocurre tanto en interacciones compatibles como incompatibles (Kim y Hwang, 1994; Kim y Hwang, 2000). No obstante, se ha propuesto que tanto la intensidad como la etapa en que estos genes se inducen podría ser una causa de las diferencias en susceptibilidad en ambas interacciones (Requena *et al.*, 2005). Con relación a esta propuesta, una de las hipótesis planteadas en el presente trabajo (Capítulo III) propone precisamente que durante la interacción del chile habanero con el oomiceto *P. capsici* ocurren pocas modificaciones a nivel transcripcional, como pudo observarse en las subpoblaciones de mensajeros analizados de forma independiente, y que esto puede estar relacionado con el comportamiento de susceptibilidad del chile habanero durante la interacción.

Los genes identificados en las plántulas infectadas, mediante el análisis del despliegue diferencial, pertenecen a diferentes rutas metabólicas. Las clonas CCA-1, CCB-2, y CCC-3 codifican proteínas cuya función aún no es conocida. Por otro lado, las clonas CCE-5, CCF-6 y CCG-7 tienen un alto nivel de similitud con una proteína de unión a ADN (*A. thaliana*), una asparaginasa (*O. sativa*) y una proteína involucrada en el transporte entre el Endosoma y el Aparato de Golgi (Vps26), respectivamente.

El análisis más detallado de la clona que codifica a una nitrato reductasa reveló una serie de datos muy interesantes con relación al papel de esta enzima durante la interacción con el oomiceto (Capítulo IV). La clona de

ADNc se denominó CcNR por tratarse de un homólogo de *Capsicum chinense*. El gen CcNR se induce, de manera sistémica, desde las primeras etapas de la infección. Debido a que la interacción planta-patógeno es compatible, existen dos posibilidades con relación a la participación de la CcNR: una es que su expresión sea un evento secundario, no relacionado con la respuesta de defensa, y la otra posibilidad es que si tenga relación pero que su expresión no sea suficiente para contrarrestar la infección, ya sea porque se requiere de otros componentes de la defensa o porque se requiera un nivel de expresión mayor al observado.

Una de las evidencias que apoyan la participación de CcNR en la respuesta de defensa es el hecho de que la aspersion con SA y ET tuvieron un efecto de inducción en sus niveles del transcrito, mientras que el MeJa no tuvo un efecto significativo. Eso nos hace suponer que CcNR podría tener una participación en la defensa en nuestro sistema si tuviera niveles de expresión mayores en tiempos más tempranos. En la literatura existen diversas evidencias donde el tratamiento previo con fitohormonas confiere tolerancia contra un patógeno en particular; se ha observado por ejemplo que el ET confiere un nivel alto de tolerancia contra *P. capsici* cuando es asperjado sobre plántulas de *C. chinense* "in vitro". En ese sistema se modifica la expresión de genes específicos relacionados con la defensa (Nuñez *et al.*, comunicación personal).

La expresión de genes codificantes de NR ha sido empleado como un marcador de defensa en algunas especies (Yamamoto *et al.*, 2003). Se sabe que bajo ciertas condiciones, la NR puede sintetizar óxido nítrico (NO), el cual es una molécula señal generada durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa.

Durante la interacción de *P. capsici* con *C. annuum* la síntesis de NO ocurre en etapas tempranas de la infección. También, se ha reportado que las fitohormonas SA, ET, y MeJa inducen la síntesis de NO. Aunque la oxido nítrico sintasa (NOS) es la mayor contribuidora en la síntesis de NO (Requena *et al.*, 2005., Zottini *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2005), la NR también puede sintetizar NO, aunque se ha sugerido que su mayor contribución es la de proveer el sustrato para la NOS (Modolo *et al.*, 2006). Modolo *et al.* (2006) también reportaron que la NR juega un papel importante durante la interacción *A. thaliana*-*P. syringae*, ya que en mutantes de este gen en donde dos sustratos importantes de la síntesis de NO (tanto el nitrito como la L-arginina) se encuentran reducidos, se afecta los niveles de esta molécula comprometiéndose la respuesta hipersensible durante la infección. Teniendo en cuenta estas evidencias, se planteó la hipótesis de que la actividad de la NR (reducción del nitrato a nitrito) posiblemente se vea incrementada durante la interacción de *C. chinense* con *P. capsici*, así como también la actividad que es inducida por las fitohormonas.

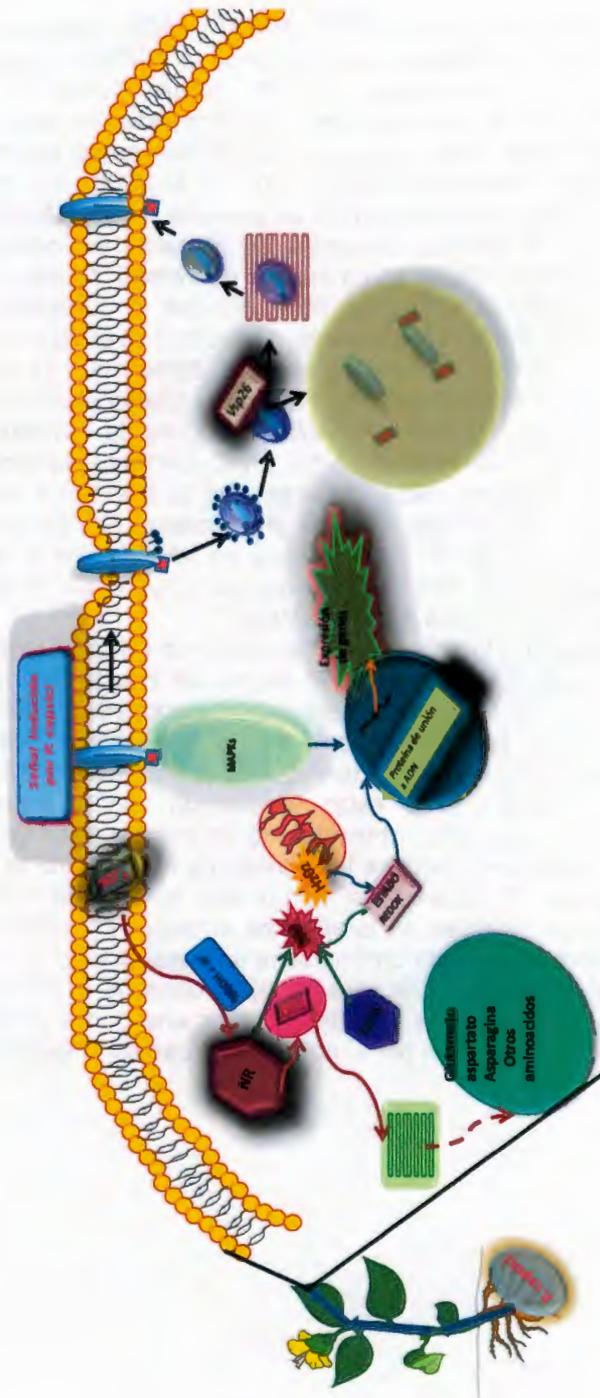
Se sabe que en plantas superiores existen tres isoformas de NR: una específica del NADH (NADH:NR), una específica del NADPH (NADPH:NR)

y una biespecífica del NAD(P)H (NAD(P)H:NR) (Harris et al., 2000). En el presente trabajo medimos la actividad de la NADH:NR, ya que la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcNR contiene dominios característicos de esta isoforma. Por otro lado, se sabe que la actividad NADH:NR existe tanto en forma constitutiva como inducible, bajo ciertas condiciones (Aslam et al., 1982; Harris et al., 2000). Un dato adicional que sustenta la propuesta de estudio es que una NADH:NR de *S. tuberosum* es inducida por moléculas derivadas de la pared del oomiceto *P. infestans* (Yamamoto et al., 2003), en un modelo de interacción similar al nuestro.

Mediante ensayos *in vivo* se demostró que la actividad NADH:NR se ve incrementada durante la infección, vimos que el efecto de las fitohormonas sobre la actividad ocurre de manera diferencial, ya que SA y ET la incrementan mientras que MeJa no tiene efecto significativo. El hecho de que la actividad NADH:NR  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  sugiere la existencia de isoformas constitutivas e inducibles de la NR en *C. chinense* durante la infección con *P. capsici*. Nuestros datos sugieren que la secuencia de la clona CcNR, clonada en este trabajo, codifica una proteína NR dependiente de NADH que es inducida por *P. capsici* y que es inhibida por el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ , mientras que también existe una isoforma que es inducida por el tratamiento testigo pero que no es inhibida por el  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ .

Relacionado con lo anterior, se ha reportado en la literatura que durante la interacción de *C. annuum* con *P. capsici* se induce la síntesis de NO tanto en plantas con interacción compatible como incompatible, teniendo una mayor síntesis de esta molécula en las plantas resistentes. Con base en esta información, es posible que la actividad de NADH:NR identificada en el presente trabajo podría estar relacionada con la síntesis de NO: sin embargo, con los datos obtenidos no es posible confirmar esta propuesta, para lo cual deberá medirse los niveles de NO durante la interacción de *C. chinense* con *P. capsici*, así como bajo la inducción con las diferentes fitohormonas, además de cuando se emplean inhibidores de la NR para poder determinar si esta enzima tiene un papel directo en la interacción.

Conjuntando los datos de este trabajo y otros de la bibliografía se elaboró un modelo del probable función de cada una de las proteínas codificadas por los genes inducidos por el oomiceto *P. capsici* (Figura 6.2).



**Figura 6.1.** *La infección con Phytophthora capsici afecta la expresión génica en plántulas de C. chinense de manera sistémica. La detección de P. capsici puede ser mediada por la unión de diversos ligandos a sus receptores específicos. Una vez que un receptor ha unido su ligando y transmitido la señal es internalizado por endocitosis para ser destruido en la vacuola o reciclado a la membrana, donde las proteínas de localización intracelular, como la Vps26, tienen un papel indispensable (clona CCG-7). La señal enviada activa la expresión génica de defensa mediante la acción de factores transcripcionales y de proteínas de unión al ADN (clona CCE-5). La activación sistémica de la defensa requiere de un ambiente metabólico adecuado para la síntesis de los fitorreguladores que activan la SAR o la ISR. Dentro de estos genes se encuentran los que proveen los sustratos necesarios para la síntesis del NO, como la asparaginasa (clona CCF-6) y la NADH:NR (clona CCD-4)*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aslam M.** (1982). Differential effect of tungsteno in the development of endogenous and nitrate induced nitrate reductase activities in soybean leaves. *Plant Physiology*, 70: 35–38.
- Harris N., Foster J. M., Kumar A., Davies H., Gebhardt C., Wray J.** (2000) Two cDNAs representing alleles of the nitrate reductase gene of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desirée): sequence analysis, genomic organization and expression, *Journal of Experimental Botany* 347:1017-1026
- Kim Y.J. and Hwang B.K.** (1994) Differential accumulation of  $\beta$ -1-3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 45:195–209.
- Kim Y. J., Hwang B. K.** (2000) Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108:51–60.
- Modolo L. V., Augusto O., Almeida I. M.G., Pinto-M. C., Oliveira H. C., Seligman K., Salgado I.** (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plant impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas*. *Plant Science*, 171: 34-40.
- Requena M. E., Egea G. C., Candela M. E.** (2005) Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 124:50–60.
- Xin L., Wuliang S., Shuqiu Z., Chenghou L.** (2005) Nitric oxide involved in signal transduction of jasmonic acid-induced stomatal closure of *Vicia faba* L. *Chinese Science Bulletin*, 50:520-525.
- Yamamoto A., Katou S., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.**, (2003) Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. *Journal General Plant Pathology*, 69:218–229.
- Zottini M., Costa A., Michele R., Ruzzene M., Carimi F., Schiavo F.**, (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*. 58:1397-1405.

## CAPÍTULO VII. Perspectivas

Durante el desarrollo de este trabajo se identificaron diferentes genes que permitirán iniciar estudios para contestar preguntas específicas durante la interacción de *Capsicum-P. capsici*.

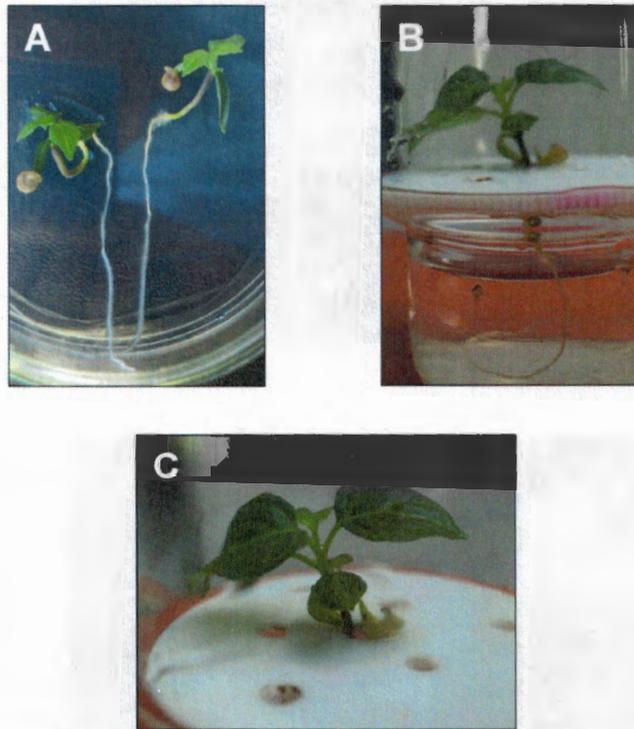
Un primer punto sería analizar cuál es el nivel de expresión de los genes identificados en esta interacción de tipo compatible, pero en una interacción de tipo incompatible. Esto permitiría evaluar si el nivel umbral de expresión de estos es mayor, igual o en los mismos tiempos que los presentados en este trabajo. Los resultados ayudarían a evaluar la hipótesis de que los niveles y el período de expresión de los genes de defensa es un elemento determinante en la susceptibilidad o resistencia ante una enfermedad.

Debido a que nuestros resultados indican que la clona CCD-4 codifica una enzima tipo NADH:NR, la cual puede, bajo ciertas condiciones, catalizar la reducción de nitrito a NO, podemos proponer la evaluación de las siguientes preguntas:

- Determinar si los niveles de NO se incrementan durante la interacción de *C. chinense-P. capsici* y comparar estos niveles con los valores generados en una variedad tolerante (v.g. variedad Serano Criollo de Morelos de *C. annum*).
- Evaluar la contribución de la NR en la síntesis de NO bajo las condiciones antes mencionadas, mediante el uso del inhibidor  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ . Debido a que la NR no es enzima principal en la síntesis del NO se puede emplear un inhibidor de la NOS (como el L-NAME) para verificar la contribución de ambas enzimas.
- Determinar el papel de la NR y del NO en la defensa del chile habanero contra *P. capsici*. Para ello se pueden tratar plántulas de *C. chinense* con compuestos que liberan NO, como el 3,3-bis(2-aminoetil)-1-hidroxi-2-oxo-1-triazeno (**NOC-18**) o la S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (**SNAP**), previo a la infección y observar el efecto sobre la tolerancia contra este patógeno. Ya que bajo estas condiciones se tendría encendida la señal del NO, sería interesante evaluar si este fitorregulador modula la expresión de CCD-4.
- Debido a que la expresión y la actividad de la NR se regulan también por fosforilación, se puede evaluar la contribución de la fosforilación a la inducción de CcNR bajo las siguientes condiciones: en presencia de los inhibidores de cinasas estaurosporina y K252a, y en presencia de verapamil y EGTA, esto último con el objetivo de determinar si la expresión de CcNR puede ser regulada por proteínas cinasas dependientes de Calcio.
- Continuar con la caracterización molecular de CcNR, para lo cual se deberá clonar el ADNc completo así como determinar su número de copias en el genoma de *C. chinense*.
- Determinar el papel de la CcNR en la defensa contra diferentes patógenos, para lo cual se puede estudiar dichas interacciones en plantas de chile habanero en las que se haya silenciado este gen por medio del

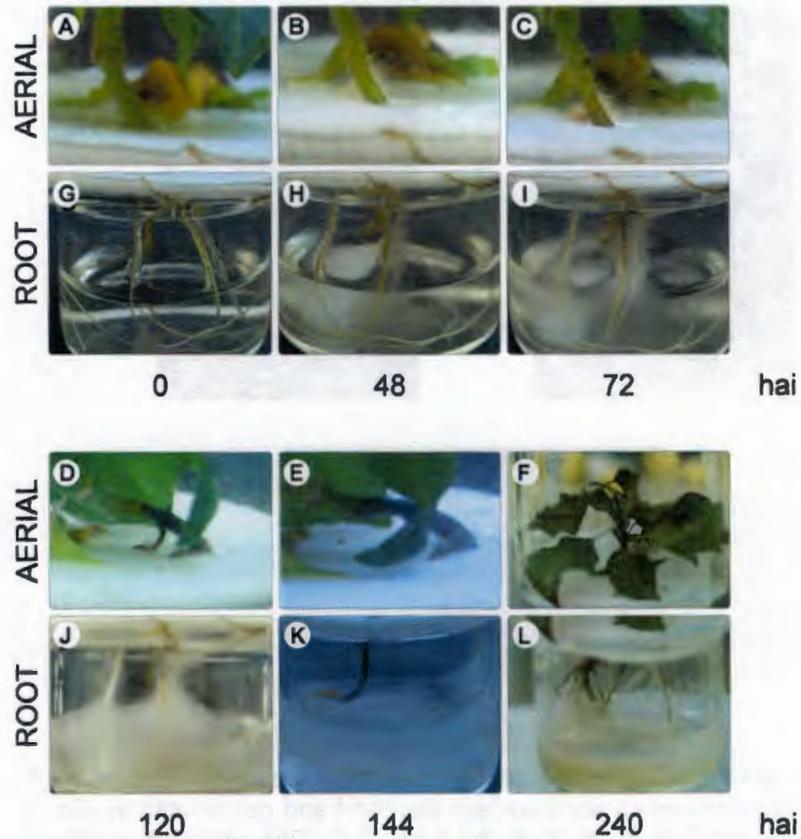
"silenciamiento génico inducido por virus" (VIGS). En las silenciadas se puede medir la producción de nitrito dependiente de nitrato, la síntesis de NO dependiente de nitrito, así como medir la respuesta de la planta ante la infección con *P. capsici*.

## ANEXO I



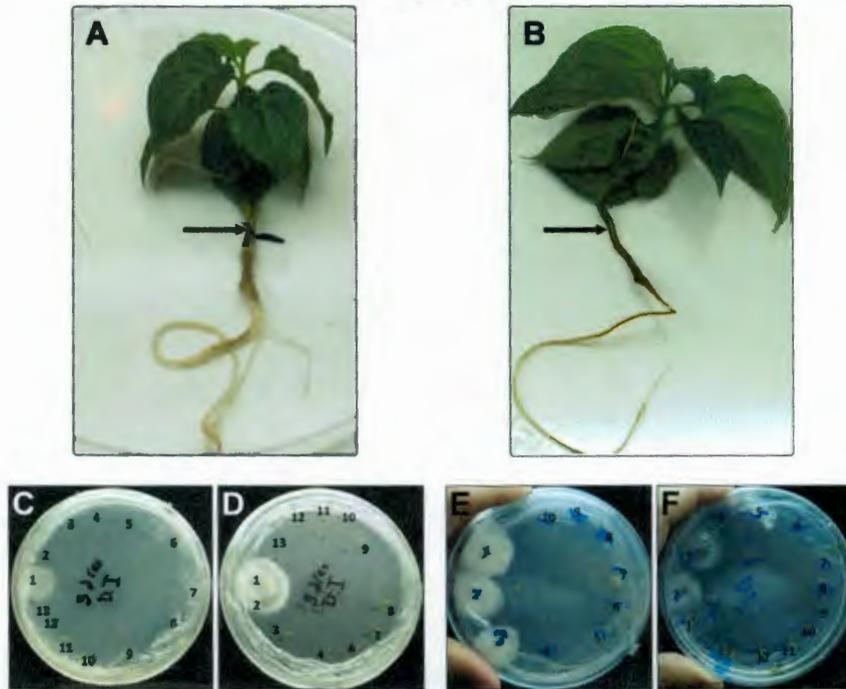
Hydroponic culture of Habanero pepper for inoculation with *P. capsici*. A, *Capsicum chinense* seeds were surface sterilised and germinated *in vitro* in MS semi-solid medium at 25 °C in the dark. B-C, One-week-old seedlings were transferred to hydroponic glass containers and left for three additional weeks at 27 °C with a light intensity of approximately 19.64  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (white fluorescent lamps) under an 8/16 h photoperiod. Aerial parts of the seedlings were separated from the roots by an inert polymer perforated cover.

## ANEXO II



Infection of *Capsicum chinense* with *Phytophthora* blight *in vitro*. Four week-old Habanero pepper seedlings growing in hydroponics were inoculated by the deposition of a mycelium plug from a virulent strain of *P. capsici* in the roots, without touching them directly, and then the symptoms were evaluated at different periods thereafter. A-F, Evolution of black lesions in the stem. G-L, Evolution of root rot.

### ANEXO III



Determination of the advancement of *P. capsici* mycelium through the pepper stems. To discard contamination of the pepper tissue samples with RNA from the oomycete, the presence of biologically active mycelium was evaluated by culturing stem segments from inoculated seedlings in PDA medium. Stems from inoculated seedlings were sliced into 13 sections of approximately 0.5 cm each, starting from the visible necrotic lesion observed at either 3 (A) or 6 (B) days after inoculation (marked with an arrow). Sections were surface sterilised in 0.6 % sodium hypochlorite (v/v) for 10 min and washed three times with sterile water. The PDA plates were incubated at room temperature and the growth of mycelia was observed after 48 h. As observed three days after the inoculation, the mycelium advanced ~0.5 cm beyond the necrotic point (C-D) and ~1.5 cm beyond this point 6 days after inoculation (E-F). C-D and E-F are images of two independent experiments, respectively.

10