

Short Note [Nota corta]



EFFECT IN NLP GENES EXPRESION IN *Phytophthora capsici* DURING INTERACTION WITH *Capsicum chinense* SPRAYED WITH 2-CHOLOROETHYL PHOSPHONIC ACID †

[EFECTO DE EXPRESION DE GENES NLP EN *Phytophthora capsici* DURANTE INTERACCION CON *Capsicum chinense* ASPERJADA CON ACIDO 2-CLOROETIL FOSFONICO]

Geovanny Román Hernández Cisneros^{1*}, Gabriel Lizama Uc¹, Sara Elena Solís Pereira¹, Gerardo Rivera Muñoz¹, Víctor Moo Huchin¹, Denis Israel Magaña Ortíz¹, Roberto Zamora Bustillos², Hernán Villanueva Alonzo³, José Efraín Ramírez Benitez⁴, and Norma Rodríguez Ávila⁵

¹ Tecnológico Nacional de México/ IT Mérida, AV. Tecnológico, Plan de Ayala norte Km 4.5 S/N C.P. 97118. Mérida, Yucatán, México. Email: gabriel.lu@merida.tecnm.mx, sara.sp@merida.tecnm.mx, victor.mh@merida.tecnm.mx, denis.mo@merida.tecnm.mx, gbernandezcisneros6@gmail.com*

² Tecnológico Nacional de México/ IT Conkal, Calle 10 S/N, C.P. 97345 Mérida, Yucatán, México. Email: roberto.zamora@itconkal.edu.mx

³ Centro de Investigación Regional Dr. Hideyo Noguchi/ UADY, Av. Itzáes No. 490, Centro, C.P. 97000 Mérida, Yucatán, México. Email: hernan.villanueva@correo.uady.mx

⁴ Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Campeche. Av. Ing. Humberto Lanz Cárdenas S/N Col. Ex-Hacienda Kalá, CP 24085 San Francisco de Campeche, México. Email: jeramire@uacam.mx

⁵ Instituto Tecnológico De Chiná. Calle 11, Cementerio 24520 Campeche, Campeche, México. Email: norma.ra@china.tecnm.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. The NLP-type effectors of *Phytophthora capsici* are involved in the establishment of the disease and necrosis in solanaceous plants such as *Capsicum chinense*, a crop that has gained great interest worldwide, and is susceptible to oomycete infection. **Objective.** To evaluate the expression of 18 NLP-type genes during the interaction of *Phytophthora capsici* against *Capsicum chinense*, treated with 2-chloroethyl phosphonic acid (ethephon). **Methodology.** Capsicum chinense plants were sprayed with ethephon at 0, 2.5, 5 and 10 mM/ml and inoculated with *P. capsici* mycelium. Gene expression analyzes by RT-PCR were carried out for NLP-type genes. Results. In plants sprayed with 5 mM/ml ethephon, incised and infected, the necrosis transcripts reported were: Pcnpp ART-1, Pnnp BRT-2, Pcnpp FRT-3, Pcnpp GRT-7, Pcnpp LRT-8. While no transcripts were observed in genes Pcnpp KRT-4, Pcnpp HRT-5, Pcnpp JRT-6, Pcnpp MRT-9, Pcnpp RRT-12, Pcnpp TRT-13, Pcnpp URT-14, Pcnpp XRT-15, Pcnpp YRT - 16 and Pcnpp SRT-17. With the plants sprayed with phosphate buffer, without incision, the transcripts reported were: Pcnpp BRT-2, Pcnpp LRT-8. **Implications.** Ethephon induces tolerance to oomycete. **Conclusions.** There are differences in gene expression between plants sprayed with ethephon, with incision and infected with *P. capsici* compared to plants sprayed and without incision. The transcript that was expressed in both groups of plants was BRT-2 and LRT-8, it is concluded that these genes are of greater relevance for a successful infection in this interaction. **Keywords.** Etephon; ethylene; habanero; pathogen; plant.

† Submitted April 20, 2023 – Accepted December 5, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4914>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = G. Lizama-Uc: <https://orcid.org/0000-0002-0092-3636>, **S.E. Solís-Pereira:** <https://orcid.org/0000-0003-2249-7698>, **J.E. Ramírez-Benítez:** <https://orcid.org/0000-0001-6600-5865>, **G. Rivera Muñoz:** <http://orcid.org/0000-0001-9668-2752>, **V.M. Moo-Huchin:** <https://orcid.org/0000-0002-9365-8922>, **D.I. Magaña-Ortiz:** <https://orcid.org/0000-0001-5486-5489>, **R. Zamora-Bustillos:** <https://orcid.org/0000-0002-4502-1492>, **H.J. Villanueva-Alonzo:** <https://orcid.org/0000-0003-3114-8692>, **N.L. Rodríguez-Ávila:** <https://orcid.org/0000-0003-0233-3901>, **G.R. Hernández-Cisneros:** <https://orcid.org/0000-0001-7055-4330>

RESUMEN

Antecedentes. Los efectores tipo NLP de *Phytophthora Capsici*, intervienen en el establecimiento de la enfermedad y en la necrosis en *solanáceas* como *Capsicum chinense*, un cultivo que ha ganado gran interés a nivel mundial, y susceptible a la infección de oomiceto. **Objetivo.** Evaluar la expresión de 18 genes tipo NLP durante la interacción de *Phytophthora capsici* contra *Capsicum chinense*, tratadas con ácido 2-cloroetil fosfónico (etefón). **Metodología.** Plantas de *Capsicum chinense* se asperjaron con etefón a 0, 2.5, 5 y 10 mM/ml e inoculadas con micelio de *P. capsici*. Análisis de expresión génica por RT-PCR fueron llevados a cabo para genes tipo NLP. **Resultados.** En plantas asperjadas con etefón 5 mM/ml, con incisión e infectadas los transcritos de necrosis reportados fueron: Pcnpp ART-1, Pnnp BRT-2, Pcnpp FRT-3, Pcnpp GRT-7, Pcnpp LRT-8. Mientras que no se observaron transcritos en genes Pcnpp KRT-4, Pcnpp HRT-5, Pcnpp JRT-6, Pcnpp MRT-9, Pcnpp RRT-12, Pcnpp TRT-13, Pcnpp URT-14, Pcnpp XRT-15, Pcnpp YRT-16 y Pcnpp SRT-17. Con las plantas asperjadas con amortiguador de fosfato, sin incisión, los transcritos reportados fueron: Pcnpp BRT-2, Pcnpp LRT-8. **Implicaciones.** El etefón induce tolerancia al oomiceto. **Conclusiones.** Hay diferencias en la expresión genética entre las plantas asperjadas con etefón, con incisión e infectadas con *P. capsici* comparada con plantas asperjadas y sin incisión. El transcrito que se expresó en ambos grupos de plantas fue el BRT-2 y LRT-8, se concluye que estos genes son de mayor relevancia para una infección exitosa en esta interacción. **Palabras claves.** Etefón; etileno; habanero; patógeno; planta.

INTRODUCCIÓN

Phytophthora capsici es uno de los principales fitopatógenos causantes de pérdidas de producción en cultivos de importancia económica en familias de plantas como la *solanaceae* (Lamour 2012). Se estima que entre el 26 y el 90 % de pérdidas en la producción de chile a nivel mundial es causada por *P. capsici* (Ristaino 1999, Lamour 2012, y Pérez *et al.*, 2017). Una especie susceptible a este fitopatógeno es *Capsicum chinense* (Nakazawa *et al.*, 2010, Lamour *et al.*, 2012), cultivo de importancia económica en el sureste mexicano y otros países debido a su valor comercial e industrial como fuente de pigmentos naturales, antioxidantes y capsaicinoides (García *et al.*, 1995, Morgan *et al.*, 2007, Canto *et al.*, 2008).

P. capsici tiene un ciclo de vida hemibiotrófico, en la primera etapa del ciclo de infección la planta no presenta síntomas visibles (fase asintomática o biotrofia). Segunda etapa, el patógeno abate al hospedero, toma su requerimiento energético y se prepara para su reproducción (Fase sintomática o necrotrofia) (Lee *et al.*, 2010). Una de las estrategias desarrolladas en su evolución éste patógeno es la producción de efectores, que son proteínas secretadas directamente hacia el apoplasto de las células del hospedero a través de hifas modificadas denominadas haustorios y luego estas se translocan al citosol. Estos efectores funcionan no solo como toxinas que inducen la muerte de las células, si no también, como modulador o represor de la respuesta de defensa de la planta, favoreciendo la infección (Qutob *et al.*, 2006, Núñez *et al.*, 2011, Jing *et al.*, 2016, Chávez-Díaz 2019). Ya que puede reprimir la señal de muerte celular por hipersensibilidad (MCP) (Schornack *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2010, Chávez-Díaz 2019). Estos efectores tienen una estructura molecular definida, pueden o no tener un péptido señal que usa para la translocación de la proteína al interior de la célula del hospedero. Puede o no tener un motivo conservado

(estructura RXLR, o VPLQLFLAK) y la parte funcional de la molécula (Feng *et al.*, 2014, Chávez-Díaz 2019). Unos de estos tipos de los efectores son la necrosis (NLP o NEP 1), proteínas cuyo peso molecular es aproximadamente 24 kDa, con un alto grado de conservación incluyen residuos de pares cisteína, y estos pueden formar enlaces bisulfuro (Morgan *et al.*, 2007, Motteram *et al.*, 2009, Mogga *et al.*, 2016). Se han reportado que estas proteínas contribuyen a la virulencia del patógeno (Schornack *et al.*, 2009, Bellincampi *et al.*, 2014).

Por otra parte, el etileno es un fitoregulador de plantas esencial para la regulación a respuestas de estrés, así como para señalización para la tolerancia a patógenos (defensa) (Nguyen *et al.*, 2015, Sasidharan *et al.*, 2015, Chávez-Díaz 2019). Este fitoregulador, se encuentra en presentación comercial con el nombre de etefón (ácido 2-cloro etil fosfónico). El etefón es ampliamente utilizado como regulador del crecimiento, el cual promueve la maduración de frutos, abscisión de hojas, flores e inducción de floración (Abeles *et al.*, 1992, Sudandara *et al.*, 2014, Nguyen *et al.*, 2015). El proceso de acción de esta molécula comercial se da mediante la penetración a través de los estomas al apoplasto donde el pH de la planta lo descompone a etileno, cloro y fosfato. Este fitoregulador tiene efectos positivos o negativos en la planta, el efecto varía según la especie y concentración (Raouf *et al.*, 2011, Pooja *et al.*, 2018).

Objetivo. Hasta ahora no se han descifrado las variables que inclinan la infección a favor de patógeno, y no se cuenta con un tratamiento que evite la infección por este patógeno. El objetivo de este trabajo fue monitorear los genes de efectores NLP presentes en la interacción planta patógeno, con la aplicación del etefón a plantas de *Capsicum chinense*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Plantas de *Capsicum chinense* (chile habanero) de 30 días post-germinación, se obtuvieron del vivero Barbosa de Muna, Yucatán (ubicado en latitud y longitud 19.9 y 89.5) cultivadas a temperatura ambiente (29 °C). El experimento se realizó en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Mérida campus norte, ubicado en Av. Tecnológico Km 4.5, Plan de Ayala, C.P. 97118 Mérida, Yucatán. La cepa de *Phytophthora capsici* fue donada por el Dr. Ignacio Islas Flores del Centro de Investigación Científica de Yucatán. *P. Capsici* fue cultivado en placas de agar dextrosa-papa (PDA) e incubadas a 27 °C por siete días.

Tratamiento de plántulas de Chile Habanero con ácido 2-cloroetil fosfónico (Etefón)

Las plantas de chile habanero fueron tratadas por aspersión foliar con 1 mL de solución de ácido 2-cloroetil fosfónico (Etefón 250, Sigma®) a diferentes concentraciones (2.5, 5, 7.5 y 10.0 mM/ml) y plantas control (sin etefón). La solución fue preparada en amortiguador de fosfatos pH 7.0, 0.5 mM/ml. Se evaluaron 10 plantas por concentración (Figura-1). Las plantas asperjadas se dejaron por 24 h en contenedores de plástico cerrados; posteriormente se retiraron de los contenedores y se dejaron reposar a 26°C por dos días. Se documentó el efecto del tratamiento con etefón en las plántulas de manera visual previo a la infección con *P. capsici*.

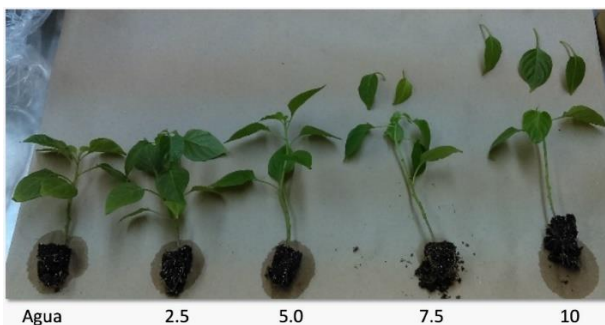


Figura 1. Plantas de chile habanero asperjadas con soluciones de etefón en diferentes concentraciones milimolar/ml.

Infección de plantas con *Phytophthora capsici*

Para determinar el efecto del etefon en la expresión de genes de *Phytophthora capsici* vs en las plantas, se evaluaron dos condiciones: a) inoculación mediante

incisión del tallo y se puso en contacto con micelio de *P. capsici*. Dicha incisión se realizó con bisturí estéril a 4 cm del sustrato, con una longitud de 1 cm, posteriormente se colocó un plug de 1 cm² sobre la herida. El daño realizado fue con motivo de evaluar si los establecimientos de los mecanismos de defensa de la planta son suficientes para modificar la expresión de estos genes en *P. capsici* aun cuando hay daño presente. b) sin incisión con el mismo procedimiento. Los inóculos (plug) se fijaron al tallo con una tira de película plástica auto adherente y se incubaron durante 24 h post aspersión. Posteriormente, se tomaron 100 mg de tallo (aproximadamente 3 cm por arriba de la incisión) de cada planta para los análisis de expresión génica. Como control negativo de la infección, se expusieron plantas tratadas por aspersión al inóculo de *P. capsici* pero sin realizar la incisión en el sitio de contacto con el oomiceto.

Extracción del ARN total y RT-PCR

Las muestras de tallo de las plantas de los diversos tratamientos fueron pulverizadas con nitrógeno líquido, previo a la extracción de ARN haciendo uso del reactivo Trizol (Invitrogen®), siguiendo las instrucciones del fabricante. La precipitación del ARN se realizó con 100 µL cloruro de sodio 5 M e Isopropanol, mientras que el lavado de la pastilla de ARN se realizó con 500 µL de etanol al 70% y 50 µL de citrato de sodio 3 M. La resuspensión del ARN se realizó con agua ultrapura y el ARN fue cuantificado mediante espectrofotometría. el ARN total fue tratado con DNAsa RQ1 siguiendo el protocolo de Promega®. El cDNA de todas las muestras se ajustaron a una concentración de 200 µg/µl de ARN total, empleando Revertaid first strand cDNA synthesis kit de la marca Thermo scientific®. La reacción se realizó durante 60 min a 42 °C y finalizando la reacción a 70 °C por 10 min; haciendo uso del cebador oligo dT (18).

Para la amplificación en cadena de ADN polimerasa (PCR) se emplearon diversos cebadores, descritos en la tabla 1, específicos para necrosis (NLP) (Feng, 2014), esterasa y actina (Feng, 2011), biotrofia y necrotrofia (Jupe, 2013). La amplificación se realizó en un termociclador BIORAD T-100, con las condiciones particulares citadas en la Tabla 1. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TAE 1X, a 100 v durante 40 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 10 mg/L (Sigma®) y visualizados en un fotodocumentador GELDOC EZ. La cuantificación de la expresión relativa se llevó a cabo utilizando el programa de documentación del equipo.

Tabla-1. Condiciones de amplificación de los genes tipo NLP de necrosis, defensa y fases de infección.

Oligos	Desnaturalización	Amplificación	Extensión	Tamaño	Secuencia
ART Pcnpp	94 °C, 1 min	62.1 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	147 pb	F-GTTGGACTCACGGA AAATCC R-GTGGTCAAGGATAACCCAACT
BRT Pcnpp	94 °C, 1 min	57.2°C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	179 pb	F-ATGAAATTCGTCGTTTTCTC R-AGTTGGGGTTTGAACCTCATC
FRT Pcnpp	94 °C, 1 min	62.1 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	166 pb	F-TCCAAGCTGGAACATATCGAT R-AGTCCACCCTGGTCTCTCC
GRT Pcnpp	94 °C, 1 min	52.1 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	117 pb	F-ACGACGGCTACAAGAAAGT R-AGTATCCAGATCGTGGTTGA
HRT Pcnpp	94 °C, 1 min	51.7 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	114 pb	F-GGGCTTGAAACTACCGG R-CAAGAGTACATGATGGCCAG
JRT Pcnpp	94 °C, 1 min	51.7 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	165 pb	F-ACCACCATCTTCTGGATCAG R-AGAGTCTTGAGTCTGCGGTT
KRT Pcnpp	94 °C, 1 min	54.7 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	196 pb	F-GACCCAAGATGACAGCAGTA R-TAGGAGCTGGAGATGGTAC
LRT Pcnpp	94 °C, 1 min	53.8 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	202 pb	F-GTTCGCAGGTACAACAAATT R-AGATAGTGACAGGTTCCAGTTG
MRT Pcnpp	94 °C, 1 min	54.8 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	180 pb	F-GACCCAAGATGACAGCAGTA R-TGACAGGGTAGGCAAAATG
ORT Pcnpp	94 °C, 1 min	50.3 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	171 pb	F-CTGACGATCATGTACTCCT R-AGGATAGTAGACCGTGTAGCC
QRT Pcnpp	94 °C, 1 min	53.3 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	177 pb	F-ACCACCAACTCCAGAACCAA R-TTCAACTTCACACCAGCCTT
RRT Pcnpp	94 °C, 1 min	60.0 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	118 pb	F-GGTCGTGATGGAGATGAAAT R-GATTATCTTT TCCGTCCAT
TRT Pcnpp	94 °C, 1 min	51.7 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	156 pb	F-GTCGGCTCTTAGTGGTTATT R-AGTCCACATGATGAGGTTCTT
URT Pcnpp	94 °C, 1 min	51.6 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	165 pb	F-GGAAGATCTTGGCTGTCA R-GGTCTGGTAGTCCCTC
XRT Pcnpp	94 °C, 1 min	49.0 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	137 pb	F-GCATGCTGGTACAAGAA R-AGGTCCTGAAAAGTCCCA
YRT Pcnpp	94 °C, 1 min	59.2 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	140 pb	F-AGCGTCTACTCCAAGCAA R-CATGATGAGGTCCTGGAAGTC
SRT Pcnpp	94 °C, 1 min	62.9 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	150 pb	F-AAAGGACTCACCGTCTACTG R-GGCGGGCACGGATTGTACTT
VRT Pcnpp	94 °C, 1 min	62.1 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	162 pb	F-CCGTACTGACTGGGAGCACG R-GTCCAGGTCGTGGTTGTAAG
ESTERASA	94 °C 3 min	94 °C 30 seg	72 °C seg	640 pb	F-CTTCTGCAGCTTACGACGACGATG R-AGCGCTGCCTTTGATGGTTC
ACTIN	94 °C, 1 min	63.9 °C, 30 Seg	72 °C, 30 Seg	250 pb	F-GTACTGCAACATCGTGCTGTCC R-TTAGAAGCACTTGCCTGTCACG
PcHMP-1	94°C 30 Seg	57 °C, 30 Seg	72 °C 2.5 Min	700 pb	F-CATGATGGCAGTCATGGTCCGGTGAAG R-TTAGCTAACATGAGGGCGGGCATGCAG
PcNPP-1	94°C 30 Seg	57 °C, 30 Seg	72 °C 2.5 Min	400 pb	F-CAGCTCCACATCACCAACGGCT R-CTCTTCCCCTTCAAATAGTTC

RESULTADOS

Posteriormente a la aspersión, se observó que con una concentración de 7.5 mM/ml y 10 mM/ml de etefón ocasionaron la abscisión de las hojas (Figura 1). Por lo anterior, sólo las plantas tratadas con etefón al 2.5 y 5 mM/ml fueron consideradas para los experimentos de inoculación con *P. capsici*. Respecto a la inducción de

la expresión génica, se evaluó el efecto del etefón en el gen de la esterasa relacionado con la defensa de la planta (Nakazawua 2010). Se observó que, a partir de una concentración de 5.0 mM/ml de etefón, el gen de esterasa fue inducido a partir de 24 h post-infección (Figura 2), por lo que los siguientes experimentos de expresión génica solo consideraron muestras de plantas tratadas con esta concentración.

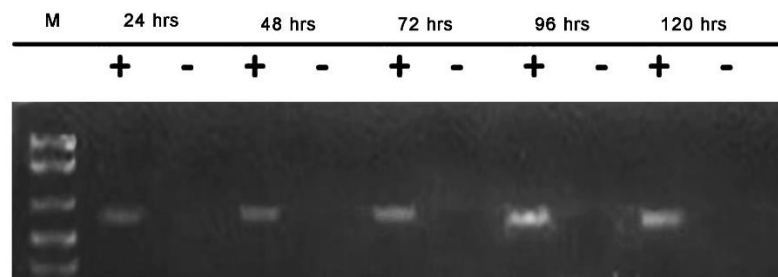


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de amplificación del gen esterasa en plantas *C. chinense* asperjadas con etefón a 5 Mm/ml (+), sin asperjar (-). No se muestran los resultados con la concentración a 2.5 Mm/ml.

Las plantas sin incisión e inoculadas con el oomiceto presentaron necrosis visible a partir de las 168 h (Figura 3A) y su abatimiento fue a las 432 h (Figura 3A). Las plantas infectadas sin estimular con etofón, con incisión fueron abatidas las 48 h post infección

(Resultado no mostrado). En plantas inoculadas con incisión se observó que a las 72 h post infección fue visible la necrotrofia (Figura 3B), y su abatimiento fue a las 240 h (Coinciden con los datos de Núñez 2011).

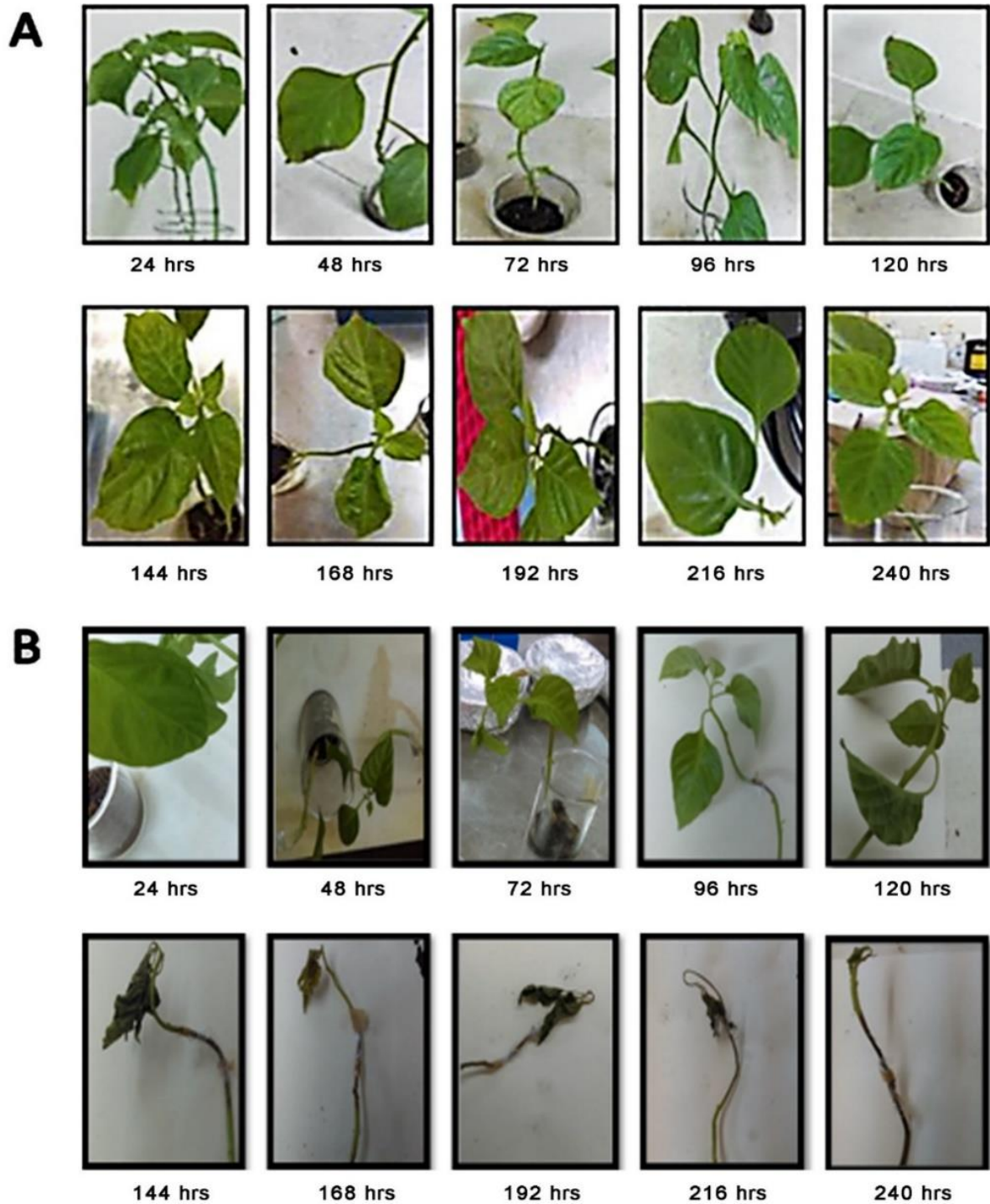


Figura 3. A) Plantas sin incisión, de izquierda a derecha, de arriba abajo 24 - 240 h. B) Plantas infectadas con incisión, de izquierda a derecha y de arriba abajo 24 - 240 h.

Se procedió a evaluar la expresión genética. BRT, LRT, ART, FRT, GRT, ORT Y QRT se expresaron en plantas con incisión e inoculadas con *P. capsici* y tratadas con 5 mM/ml de etefón. Todos los genes evaluados se transcribieron a partir de 24 h post infección (Figura 4A). El gen PcHMP-1 relacionado con la fase de biotrofia en *P. capsici* se transcribió a 72 h post-infección. Se observó la expresión de PcNPP-1 relacionado con la necrotrofia, se comenzó a transcribir a las 48 h post-infección, conservando el nivel de expresión hasta las 72 h y disminuyendo paulatinamente hacia el final de la evaluación (240 h) (Figura 4B). Lo anterior fue observado por Jupe 2013, en un esquema de tratamiento similar al empleado en este trabajo.

Por otra parte, en plantas sin incisión e inoculadas con *P. capsici* y tratadas con 5 mM/ml de etefón, los genes de necrotrofia transcritos a 24 h fueron BRT y LRT (Figura 5). La relación entre genes de biotrofia y necrotrofia se comportaron de manera similar al tratamiento anterior (Datos no mostrados). Las plantas con incisión tratadas con etefón e infectadas con *P. capsici* expresaron un mayor número de genes relacionados con necrotrofia en comparación con las plantas tratadas y sin incisión (Tabla 2).

Tabla-2. Genes NLP presentes durante la interacción entre *P. capsici* (P.C.) y plantas *C. chinense* (C.C.) con y sin incisión.

<i>Gen</i>	<i>C.C.vsP.C.</i> Con incisión	<i>C.C.vsP.C.</i> Sin incisión	<i>P. Señal</i>
ART	+	-	+
BRT	+	+	+
FRT	+	-	+
GRT	+	-	N
LRT	+	+	+
ORT	+	-	+
QRT	+	-	N

Peptido señal presente (+), ausente (-), no se conoce (N).

Se observó la prolongación del tiempo de las etapas de infección, en este mismo sentido no ocurrió una represión por completo y definida de dichas etapas como se ha reportado en la literatura (Feng 2014). (Figura-5). Al comparar el proceso de infección de las plantas se observó que aquellas que tenían incisión, el tiempo de abatimiento fue menor, que en aquellas donde la planta no tenía incisión. Así como el número de transcritos fue mayor en plantas con incisión que en plantas sin incisión.

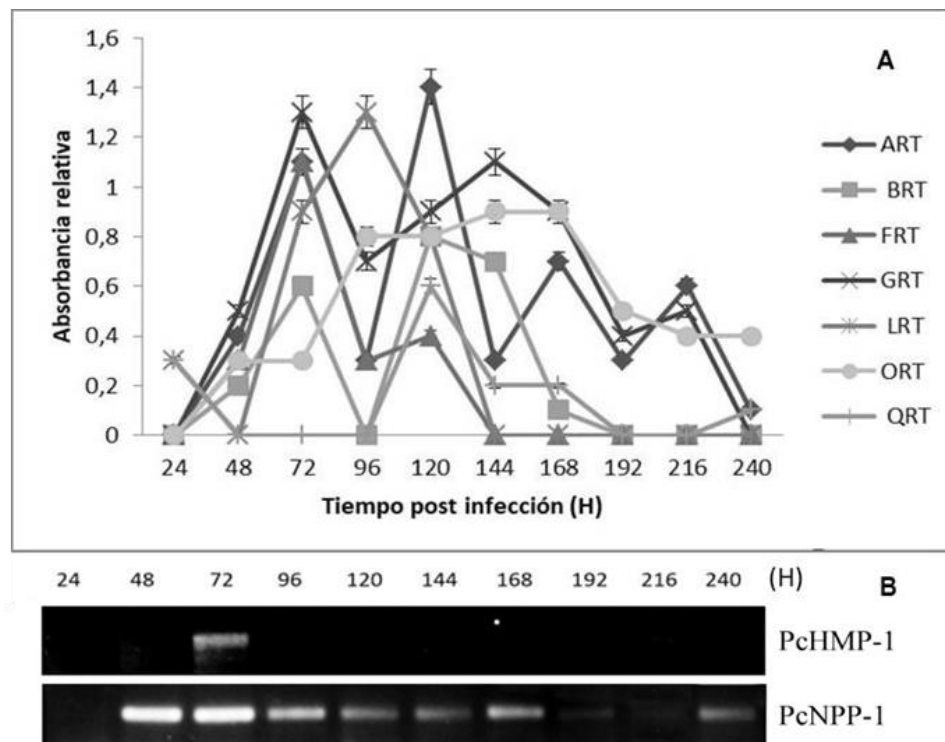


Figura 4. Expresión de transcritos NLP plantas con incisión e infectadas. **Panel A:** Absorbancia relativa de transcritos durante la infección. **Panel B:** PcHMP-1 marcador de biotrofia durante 10 días. PcNPP-1 marcador del gen necrotrofia durante 10 días.

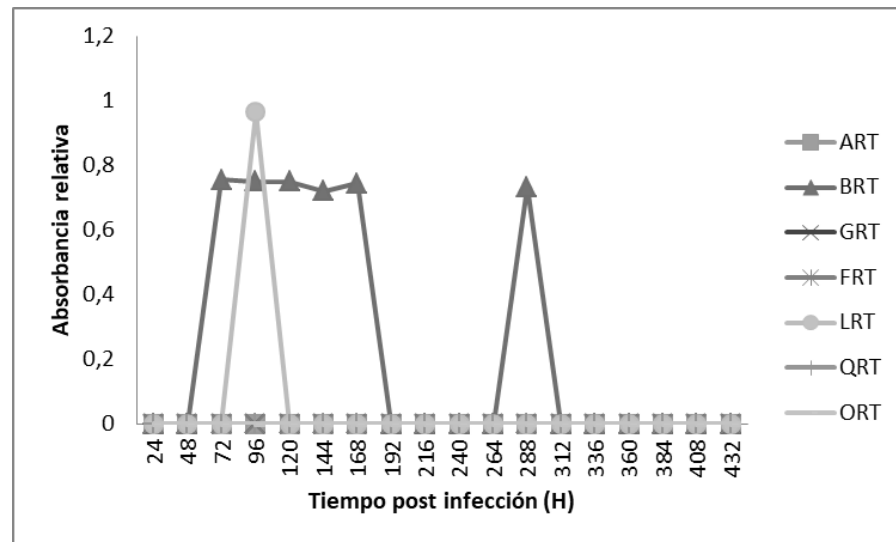


Figura 5. Análisis de expresión de transcritos tipo NLP durante la infección de *P. capsici* en plantas tratadas con etefón sin incisión.

DISCUSIÓN

Se conoce que la resistencia adquirida son mecanismos y estrategias que las plantas han desarrollado en su evolución contra patógenos. Estos mecanismos son activados por elicitores de patógenos, fitoreguladores como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA), etileno (ET), factores bióticos y abióticos. En este sentido, diversos estudios han demostrado que el etileno tiene una participación en la resistencia al ataque de patógenos, mediante la expresión de genes y proteínas relacionadas con la patogénesis (Broekaer *et al.*, 2006, Núñez *et al.*, 2011, Chávez-Díaz *et al.*, 2019). Con la aspersión del etileno, este actuó como un coadyuvante a la resistencia del patógeno, pero la acción de este en la defensa de la planta depende de varios factores como son: temperatura, especie de la planta, disponibilidad de nutrientes, agua, sol y estado físico de la planta (Knoester *et al.*, 1998). Reportado en otros trabajos por inducción de la resistencia por aplicación exógena de etefón, en *Medicago truncatula* (Vernáculo de carretón), en *Macrophomina phaseolina* (Soya), *Oriza sativa* (Arroz), *Capsicum chinense* (Chile habanero), *Botrytis cinerea* (uva) entre otros (Abdelsamad *et al.*, 2019). La aplicación del etefón activa las enzimas carboxilesterasas que catalizan la hidrólisis de compuestos orgánicos que contienen enlaces tipo éster. Este tipo de enzimas han sido identificadas en *Arabidopsis thaliana*, en específico el gen *PAD4*, el cual es requerido para el establecimiento de la defensa posterior a una infección (Falk *et al.*, 1999). En el presente trabajo la aplicación de etefón en *Capsicum chinense* induce la expresión del gen esterasa, la inducción de estos genes han demostrado que coadyuva la resistencia en contra de hongos como *Colletotrichum gloeosporium* y *Alternaria*

brassicola en una interacción de planta vs patógenos de diferentes especies de plantas (Fellbrich *et al.*, 2002, Motteran *et al.*, 2009; Nakazawa *et al.* 2010; Núñez *et al.*, 2011, Nguyen *et al.*, 2015, Jing *et al.*, 2016). En *Capsicum annum* se clonó el gen PepEST, codificante para esterasa y que es altamente expresado durante un reto con *C. gloeosporioides*. Un punto importante en la aplicación del etefón es la concentración aplicada, Jing *et al.* (2016) reportó que en *Vitis vinifera* (Vid) el uso de etefón induce el aumento de las proteínas Pnls que están relacionadas con la patogénesis, desencadenando mecanismos de defensa. Sin embargo, en *Allium cepa* (cebolla) a concentraciones de 500 ppm, se observaron aberraciones a nivel cromosomal (Raouf *et al.* 2011, Sudandara *et al.*, 2014, Jing *et al.*, 2016). Esto indica que la concentración de etefón tiene diferentes efectos entre géneros de plantas. Iqbal, *et al.* (2019), reportó que el etefón mejora la resistencia al estrés expuesto a un metal como el níquel, ya que induce el sistema de antioxidante a través de glioxalasa y la prolina en *Brassica juncea* (Mostaza castaña). Así como aumenta su resistencia al estrés por sequía al inducir genes para la producción específica de compuestos que conforman de ceras en hojas de diferentes especies *Oriza sativa* y *Zea mays* (Maíz) (Yu. *et al.*, 2017). Los genes NLPs presentes y expresados por el patógeno se ha demostrado que no están asociados a la citotoxicidad directa del patógeno, sin embargo, tienen un papel importante en la fase biotrófica para la implementación de una infección exitosa (Keates *et al.*, 2003, Motteran *et al.*, 2009, Núñez *et al.*, 2011, Dong *et al.*, 2012; Mogga *et al.*, 2016, Feng *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2019). En *Nicotiana bethamiana* infectadas con patógenos, la familia de estos genes induce clorosis y necrosis, lo que produce la muerte de la planta (Keates 2003; Mattinen *et al.*, 2004; Fang *et*

al., 2017). En *P. capsici* se han descrito 39 genes relacionados, los cuales tienen un motivo conservado de heptapéptido (GHRHDWE), región importante para la fito toxicidad (Chen *et al.*, 2018). EL análisis transcripciones de estos genes han demostrado que son expresados de manera diferencial durante el desarrollo de la interacción planta vs patógeno. Por otra parte, análisis de funcionalidad han demostrado que genes Pc11951, Pc107869, Pc109174 y Pc 118148 son capaces de inducir la muerte celular en tabaco y Chile.

CONCLUSIÓN

El efecto del etefón sobre las plantas de *Capsicum chinense* activó el sistema inmune de la planta, lo cual modificó la inducción de los genes de necrotrofia, biotrofia y esterasa durante el estudio, tanto en plantas con incisión y sin incisión. La inducción de los genes tipo NLPs tienen un patrón de expresión diferencial según sea la especie de la planta, entre otros factores, el tratamiento previo con etefón a una concentración dada puede dar resistencia a patógenos como se observó en los resultados obtenidos en este trabajo y otros trabajos, pero no se evitó la muerte del hospedero. El daño mecánico a la planta a la corteza ocasiona para tener una infección más aguda y que se expresen los diferentes genes cuando se compara con las plantas sin daño. Los genes de necrosis BRT y LRT, se expresaron en plantas en los dos experimentos (Con y sin incisión); estos genes codifican para proteínas ricas en cisteína. Este amino ácido ambos que conforman para estos genes por su naturaleza estructural para formar enlaces bisulfuro, soluble en agua y a oxidarse, puede ayudar a interactuar con los receptores del hospedero. Lo que puede Gracias a estas particularidades deducir la importancia de dichos efectores durante la interacción planta vs patógeno. Aunque en una interacción planta vs patógeno se activan diversas rutas (Metabolismo, defensa, estrés) y factores abióticos, es la combinación de todos estos factores lo que determina el tiempo de desarrollo de la infección.

Acknowledgments. To CINVESTAV, use of equipment and facilities, of immunology and molecular biology laboratory. A la doctora Rossana Rodríguez Canul por su valiosa aportación a este trabajo. To ITC use of equipment and facilities, of the molecular genetic laboratory.

Funding. This work was financed by the biotechnology and molecular biology laboratory of the Tech of Mérida, Mexico.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest

Compliance with ethical standards. Does not apply.

Data availability. The data is available via email from a server. The corresponding author must be contacted.

Author contribution statement (CRediT). **G.R. Hernández Cisneros** - Conceptualization, investigation, methodology, formal analysis, data curation, Writing – original draft. **G. Lizama Uc** - Conceptualization, analysis, methodology, writing – review and editing, **S.E. Solís Pereira** - methodology, writing – review and editing, **J.E. Ramírez Benítez** - writing – review and editing, **G. Rivera Muñoz** - writing – review and editing, **V. Moo Huchin** - methodology, writing – review and editing, **D.I. Magaña Ortíz** -methodology, writing- review and editing, **R. Zamora Bustillos** - writing- review and editing, **H. Villanueva Alonzo** - writing- review and editing, **N. Rodríguez Ávila** - writing- review and editing.

REFERENCIAS

- Abdelsamad, N.A., MacIntosh, G.C. and Leandro, L.F.S., 2019. Induction of ethylene inhibits development of soybean sudden death syndrome by inducing defense-related genes and reducing *Fusarium virguliforme* growth. *Plos One*, 1485, pp. 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215653>
- Abeles, F., Morgan, P. and Saltveit, M., 1992. Ethylene in plant biology. *Academic Press*, 2da edición, USA, pp. 222-252.
- Bellincampi, D., Cervone, F. and Lionetti, V., 2014. Plant cell wall dynamic and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Frontier in Plant Science*, 5, pp.1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>
- Broekaert, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F.C. and Cammue, B.P.A., 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *The Annual Review Phytopathology*, 44, pp. 393-416. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440>
- Canto, A., Balam, E., Bello, J., Lecona, C., Solís, D., Avilés, S., Gómez, E., López, G. and Santana, N., 2008. Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas*, 43, pp. 1344-1349. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.5.1344>

- Chávez-Díaz, I.F. and Zavaleta-Mejía, E., 2019. Molecular communication in the pathosystem *Capsicum* species-*Phytophthora Capsici*. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(2), pp. 251-278. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-3>
- Chen, X.R., Huang, S.X., Zhang, Y., Gui-Lin, S. and Feng, Z., 2018. Identification and functional analysis of the NLP-encoding genes from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora Capsici*. *Molecular Genetics Genomics*, 293, pp. 931-943. <https://doi.org/10.1007/s00438-018-1432-7>
- Cheng, J., Song, N. and Wu J., 2019. A patatin-like protein synergistically regulated by jasmonate and ethylene signaling pathways plays a negative role in *Nicotiana attenuata* resistance to *Alternaria alternata*. *Plant diversity*, 41, pp. 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.12.001>
- Dong, S.K.G., Qutob, D., Yu, X., Tang, J., Kang, J., Dai, T., Wang, H., Gijzen, M. and Wang, Y., 2012. The NLP toxin family in *Phytophthora sojae* includes rapidly evolving groups that lack necrosis-inducing activity. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 25, pp. 896-909. <https://doi.org/10.1094/MPMI-01-12-0023-R>
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.F., Jones J.D.G., Daniels, M.J. and Parker, J.E., 1999. EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Plant Biology*, 96, pp. 3292-3297. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3292>
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M. and Nürnberger, T., 2002. NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of B plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 32, pp. 375-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01454.x>
- Feng, B., Zhu, X., Fu, L., Rong, L., Storey, D., Tooley, P. and Zhang, X., 2014. Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in *Phytophthora Capsici*. *Bio Med Central Plan Biology*, 14, pp. 126-45. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-126>
- Feng, B.Z., Li, P.Q., Fu, L., Sun, B.B. and Zhang, X.G., 2011. Identification of 18 genes encoding necrosis-inducing proteins from the plant pathogen *Phytophthora capsici* (Pythiaceae: Oomycetes). *Genetics Molecular Research*, 10(2), pp. 910-22. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1248>. PMID: 21644208
- García, H., Ortega, J., García, M., Martínez, C. and Beristáin, C., 1995. La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia*, 46, pp. 84-102.
- Iqbal, M.K.R., Badar, J.M.F., AlAjmi, Md.T.R. and Nafees, A.K., 2019. Ethephon mitigates nickel stress by modulating antioxidant system, glyoxalase system and proline metabolism in Indian mustard. *Physiol Molecular Biology Plants*, 26, pp. 1201-1213. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00806-1>
- Jing, J., Huai, Z., Jun, T., Ming, Y., Da, L., Abid, K. and Zhen, G., 2016. A new ethylene-responsive factor CaPTI1 gene of pepper (*Capsicum Annuum*) involved in regulation of defense response to *Phytophthora Capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 6, pp. 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01217>
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A.J.M., Morris, J.A., Zhang, R. and Hedley-Huitema, P.E., 2013. *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biology*, 14(R63), pp. 1-18. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r63>
- Keates, S., Kostman, T., Anderson, J. and Bailey, B., 2003. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiology*, 132, pp. 1610-622. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019836>
- Knoester, M., van Loon, L.C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J.F. and Linthorst, H.J., 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Plant Biology*, 95(4), pp. 1933-1937. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1933>
- Lamour, H.S.R., Jupe, J. and Huitema, E., 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant pathology*, 13, pp. 329-37.

- <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Lee, S. and Rose, J., 2010. Mediation of the transition from biotrophy to necrotrophy in hemibiotrophic plant pathogens by secreted effector proteins. *Plant Signalling Behavior*, 5, pp. 769-72. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11778>
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A., and Pirhonen M. 2004. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 17, pp. 1366-375. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.12.1366>
- Mogga, V., Delventhal, R., Weidenbach, D., Langer, S., Bertram, P.M., Andresen, K., Thines, E., Kroj, T. and Schaffrath, U., 2016. *Magnaporthe oryzae* effectors MoHEG13 and MoHEG16 interfere with host infection and MoHEG13 counteracts cell death caused by *Magnaporthe*-NLPs in tobacco. *Applied Biological Chemistry*, 35, pp.1169-185. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1943-9>
- Morgan, W. and Kamoun, S., 2007. RXLR effector of plant pathogenic oomycetes. *Current Opinion Microbiology*, 10, pp. 332-38. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.04.005>
- Motteram, J., Kufner, I., Deller, S., Brunner, F., Hammond-Kosack, E. and Nürnberger, T., 2009. Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain-containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 22, pp. 790-99. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0790>
- Nakazawa, Y., Núñez, R., Souza, R., Santana, N. and Zúñiga, J., 2010. Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defense-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*. *European Journal of Plant Pathology*, 126, pp. 403-15. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9544-x>
- Nguyen, T.M., Iqbal, R.K., Nguyen, A., Xuan, H., Mohd, A., Nafees, A. and Lam, P., 2015. Role of ethylene and its cross talk with other signaling molecules in plant responses to heavy metal Stress. *Plant Physiology*, 169, pp. 73-84. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00663>
- Núñez, R., Arcos, F., Souza, R., Sánchez, C., Nakazawa, Y., García, F., Guzmán, A. and Zúñiga, J., 2011. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 131, pp. 669-83. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9841-z>
- Pérez, C., Carrillo, J., Chavez, J., Perales, C. and Enriquez-Villegas R., 2017. Diagnóstico de síntomas asociados con marchitez del chile en Valles Centrales de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, pp. 281-293. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.50>
- Pooja, B., Mahindra, N., Veena, B. and Ajeet, S., 2018. Ethephon, an organophosphorous, a fruit and vegetable ripener: has potential hepatotoxic effects. *Jornual Family Medicine and Primary Care*, 7, pp. 179-183. https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_422_16
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Andrea, A., Lubracki, B., Ulrich, H., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M. and Nürnberger, T., 2006. Phytotoxicity and Innate Immune responses induced by Nep1-Like Proteins. *The Plant Cell*, 18, pp. 3721-744. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044180>
- Raouf, A. and Girgis, S., 2011. Mutagenic, Teratogenic and biochemical effects of ethephon on pregnant mice and their fetuses. *Global Veterinaria*, 6, pp. 251-257.
- Ristiano, J. and Jhonston, S., 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant disease*, 83, pp.1080-089. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1080>
- Sasidharan, R. and Voeselek, L., 2015. Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. *Plant Physiology*. 169, pp. 9-22. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>

- Schornack, S., Huitema, E., Cano, L., Tolga, O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro, S., Farrer, R., Segretin, M., Bos, J., Haas, B., Zody, M., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M.d. and Kamoun, S., 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology*, 10, pp. 795-803. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00593.x>
- Sudandara, J.P., Preethi P., Cordilea, H., Matthew, S. and Thomas, S., 2014. Genotoxic effect of ethephon on the root meristems of *Allium cepa* L. *Communications in Plant Sciences*, 4(1-2), pp. 19-22.
- Ya-Li, F., You-Liang, P. and Jun, F., 2017. La familia de proteínas tipo Nep1 de *Magnaporthe oryzae* es prescindible para la infección de las plantas de arroz. *Informe científico*, 7, pp.4372. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04430-0>
- Yu, H., Zhang, Y., Xie, Y., Wang, Y., Duan, L., Zhang, M. and Li Z., 2017. Ethephon improved drought tolerance in maize seedlings by modulating cuticular wax biosynthesis and membrane stability. *Journal of Plant Physiology*, 214, pp. 123-133. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.04.008>