

Efecto de fitopatógenos sobre la síntesis de compuestos fenólicos en frutos de chile Mirasol

Herrera M.D.^{1*}, Velásquez-Valle R.¹, Mena-Covarrubias J.¹, Reveles-Torres L.R.¹, Salas-Muños S.¹

1 INIFAP Campo Experimental Zacatecas. Carretera Zacatecas-Fresnillo Km 24.5, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas. C.P. 98500. herrera.mayra@inifap.gob.mx

RESUMEN:

El cultivo de chile para secado en Zacatecas ocupa el primer lugar nacional debido a su superficie sembrada, sin embargo, a lo largo del proceso de producción el cultivo se ve afectado por diversos microorganismos que provocan enfermedades. Actualmente existen pocos estudios que demuestren el efecto de la infección por patógenos sobre el metabolismo de las plantas y, por lo tanto, sobre la calidad de los frutos. El objetivo fue determinar los cambios en la concentración de compuestos fenólicos en frutos de plantas de chile de la variedad Mirasol con sintomatología de *Candidatus Liberibacter* y *Begomovirus*, un control sano se incluyó como control. Se realizó la detección de ambos patógenos por medio de PCR y se realizó la cuantificación de compuestos fenilpropanoides encontrando diferencias en su concentración por efecto de ambos agentes patógenos, con valores de incremento de 152%, 120% y 696% para fenoles, antocianinas y taninos respectivamente por efecto de *Liberibacter*, el cual se constituyó como el agente de mayor importancia en la síntesis de estos compuestos. Por lo anterior, se puede decir que la incidencia de la infección induce cambios bioquímicos en los procesos metabólicos en las plantas de chile e incrementa la calidad de los frutos.

Palabras clave: *Begomovirus*, *Candidatus Liberibacter*, compuestos fenólicos, frutos de chile, patógenos, PCR.

ABSTRACT:

The pepper cultivar, for drying purposes, occupies the first place in Zacatecas at a national level due to its sown area, however, during its production process this crop is often affected by different microorganism that contribute to crop diseases. There is a lack of studies that reveal the effect of pathogens on the pepper plant metabolism thus, pepper fruit quality. The objective was to determine changes in the phenolic compounds content of pepper fruits cv Mirasol with the *Candidatus Liberibacter* and *Begomovirus* symptomatology, comparing to a healthy control. Detection of both pathogens by PCR, and quantification of phenolic compounds was conducted. Differences were observed due to the incidence of both pathogens, with an increase of 152%, 120% and 696% for phenols, tannins and anthocyanin's, respectively, due to the effect of *Candidatus Liberibacter*, which was the outstanding agent in the synthesis of these compounds. The infection caused by pathogens modifies the metabolite profiles, which contributes to biochemical changes at the metabolic processes in the pepper plants and increases pepper fruit quality.

Keywords: *Begomovirus*, *Candidatus Liberibacter*, pathogen, phenolic compounds, pepper, PCR

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades asociadas a la infección por fitopatógenos son importantes para diferentes cultivos de interés agrícola distribuidos a nivel mundial (Junqueira et al., 2004). En este sentido, es poco común encontrar estudios relacionados con los cambios bioquímicos causados por este tipo de microorganismos; sin embargo, algunos estudios han demostrado que la infección por patógenos puede modificar los niveles de algunos compuestos en diferentes tejidos de la planta, ya que exhiben una amplia variedad de síntomas en respuesta al ataque del patógeno, las cuales se manifiestan por modificaciones en la pared celular y la acumulación local de metabolitos secundarios como los polifenoles (Himeno et al., 2014; Musetti et al., 2000).

La diferenciación bioquímica que existe entre una planta infectada y una sana ocurre en diferentes niveles de sus procesos metabólicos; la vía biosintética de los fenilpropanoides es una de las más estudiadas y relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas ante una amplia gama de factores de estrés, y es responsable de la síntesis de un amplio número de compuestos fenólicos (Fan et al., 2015).

Por otro lado, el chile (*Capsicum annuum*) es un importante cultivo hortícola producido en Zacatecas ocupando el primer lugar a nivel nacional por su superficie sembrada (SIAP, 2013). Sin embargo, el rendimiento y la calidad del chile dependen de varios factores, como el genotipo del cultivar y los factores abióticos y bióticos, por ejemplo, la presencia de plagas y enfermedades, en este sentido, se sabe que el proceso de recolección del fruto se realiza independientemente si la planta presenta señales de infección, es decir, los frutos de chile que llegan al consumidor pueden ser de plantas completamente sanas, o de plantas infectadas por patógenos (Castro et al., 2000; Pineda et al., 2008).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar cambios metabólicos en la síntesis de fenoles en fruto de plantas de chile por efecto del ataque de patógenos. Se realizó el estudio en plantas de chile Mirasol (*Capsicum annuum*) procedentes del estado de Durango, que presentaron síntomas de padecimientos causados por dos patógenos diferentes: *Candidatus liberibacter* y *Begomovirus*. A partir de este experimento se encontró que la incidencia de patógenos incrementa la concentración de compuestos fenólicos, lo que permite incrementar la calidad nutracéutica del alimento. Este efecto es mayor por presencia de *Candidatus Liberibacter*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de las muestras. En campo se tomó muestras de plantas de chile Mirasol aparentemente infectadas por *Candidatus Liberibacter* y *Begomovirus*, estas plantas. En el laboratorio se tomó una porción del tejido foliar a partir de las plantas frescas para la evaluación de la presencia de patógenos por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las cuales se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que los frutos conservados en nitrógeno líquido se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos últimos se liofilizaron, molieron y se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Extracción de ADN genómico CTAB 3%. Se trituraron 0.5 gramos de hojas frescas en nitrógeno líquido, y se adicionaron 1000 μl de solución de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB). Después de una incubación de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min se dejó en hielo durante cinco minutos. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio donde se le agregó un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v). En seguida se centrifugó la muestra a 13,400 rpm por 10 min. Al sobrenadante se le agregó un volumen equivalente de isopropanol frío, se mezcló por inmersión y se dejó treinta minutos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se centrifugó a 13,400 rpm durante diez minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó una vez con etanol al 70%. Se dejaron secando las pastillas y finalmente se suspendió con 50 μl de solución TE (Tampón Tris-EDTA).

Detección de *Candidatus Liberibacter*. Para la detección de *Liberibacter* se utilizó el juego de oligonucleótidos F'OA2 y R'Oic. El ensayo de PCR se realizó conteniendo 1 μl de ADN, 1 μl de buffer 10X, 0.4 de MgCl_2 50mM, 0.2 μl de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.2 μl de Taq DNA polimerasa, 0.2 μl de cada oligonucleótido y 6.8 de agua. Las reacciones de amplificación se realizaron en un Termociclador, donde las condiciones consistieron

en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C/min, temperatura de hibridación de 60°C/min y temperatura de elongación de 72°C/1.30 minutos. Posteriormente se efectuó un calentamiento de 72°C/min para después mantenerse a temperatura de 15°C. Para la electroforesis se preparó gel de agarosa al 1.2% y se cargaron 7 µl del producto de PCR junto con 2 µl de buffer de carga LB 1X, de marcador se utilizaron 6 µl de 1Kb. El proceso de corrida fue a 80 voltios durante 40 minutos, en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X. Seguido a ello se dejó en bromuro de etidio por cinco minutos. Finalmente, el ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta y se colocó en un fotodocumentador de imágenes para registrar resultados.

Detección de Begomovirus. Para detectar begomovirus se utilizó la técnica de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos CP70FOR/ YMACREV los cuales amplifican para un fragmento de 600 pb. Las concentraciones de los componentes fueron: 2.5 µl de buffer 10X, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.58 µl de dNTP's 10 mM, 1.15 µl de cada oligo, 0.25 µl de Taq DNA polimerasa In vitro, 16.87 µl de agua, 1 µl de ADN. Posteriormente la reacción se llevó a cabo en un termociclador donde la desnaturalización inicial fue a una temperatura de 94° C/5 min, seguido de 38 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C/min, temperatura de hibridación de 55°C/min y temperatura de elongación de 72°C/min y posteriormente se mantuvo a 15°C. Las condiciones de carga y corrida fueran similares a las mencionadas anteriormente.

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos totales. Se obtuvo un extracto acetónico de los compuestos fenólicos siguiendo la metodología de Xu et al., (2007), se pesó un gramo de muestra liofilizada y se diluyó con 10 mL de acetona acidificada al 70 % con 0.5 % de ácido acético [(acetona/agua/ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v)], se protegió de la luz y se agitó durante 24 h, posteriormente se centrifugó a 5000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, para obtener el sobrenadante. Este sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g⁻¹). Los taninos condensados se cuantificaron con el método de la vainillina-HCl descrito por Desphande et al. (1985) y los flavonoides totales mediante el ensayo colorimétrico AlCl₃ (Liu et al., 2002). Ambas determinaciones se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina por gramo de muestra (mg EC g⁻¹). Finalmente, las antocianinas se cuantificarán por el método diferencial de pH descrito por Abdel-Aal et al. (1999) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por kg de muestra (mg EC3G kg⁻¹).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presencia de Candidatus liberibacter y Begomovirus. En la Figura 1 se muestran los resultados del ensayo de PCR para la detección de Candidatus Liberibacter. Las muestras 1, 2 y 3 representan plantas que sintomatológicamente presentaban infección por este patógeno, sin embargo, al realizar la extracción de ADN y la detección de la bacteria por medio del PCR, se comprobó la presencia de esta bacteria en el tejido vegetal de las plantas de Chile 1 y 2. Estos resultados permitieron agrupar las plantas enfermas y, por lo tanto, los frutos que corresponderían al grupo de frutos obtenidos de plantas infectadas por Candidatus Liberibacter.

De la misma manera, Las plantas de Chile infectadas por Begomovirus, fueron seleccionadas primeramente por sintomatología en campo, no obstante, en laboratorio se confirmó la presencia del virus por medio de PCR (Figura 2). Estos resultados permitieron seleccionar aquellas plantas infectadas con este agente patógeno para agrupar las muestras de frutos precedentes de plantas infectadas por Begomovirus.

Bajo el contexto anterior, es importante confirmar la enfermedad de una planta y el agente patógeno que la causa por metodologías moleculares, ya que los resultados de este tipo de ensayos fortalecen lo observado en campo, es decir, al observar la sintomatología de una planta infectada, aparentemente define la causa de la enfermedad, sin embargo, no existe la certeza de la presencia de un solo patógeno o la interacción de dos o más, e inclusive, los efectos del estrés abiótico, por lo que el trabajo sinérgico entre la observación fenotípica y las metodologías moleculares facilitan la detección del patógeno causante de la enfermedad.

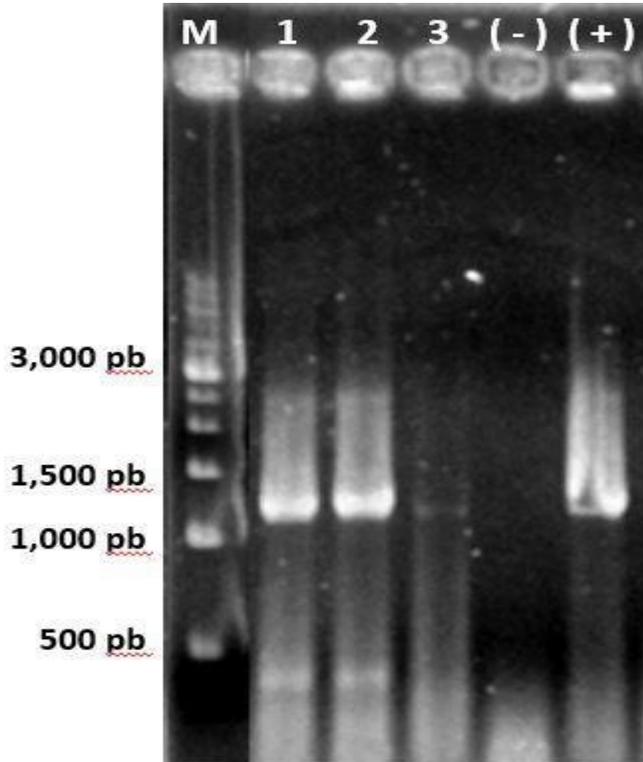


Figura 1. PCR de *Candidatus Liberibacter* en plantas de Chile con oligonucleótidos específicos OA2f' y OicR'. Carril M: Marcador de Peso Molecular, Carriles 1-3: Muestras de ADN de *Capsicum annuum* L. (-) Control Negativo y (+) Control Positivo.

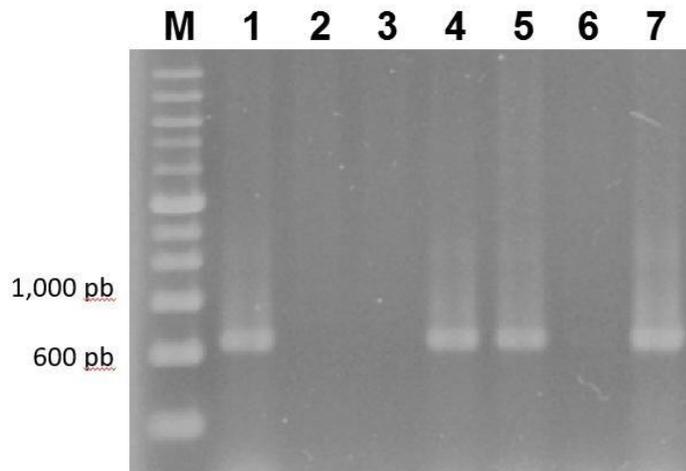


Figura 2. PCR para Begomovirus en plantas de Chile OLIGOS CP70Forward / YMAC reverse (fragmento de 600 pb). (M) marcador molecular. Carriles 1-5 ADN de plantas de *Capsicum annuum*. Carril 6 control negativo, Carril 7 control positivo.

Cuantificación de compuesto fenólicos. Una vez agrupados los frutos de chile en sanos, procedentes de plantas infectadas por *Candidatus Liberibacter* y procedentes de plantas infectadas por *Begomovirus*, se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos (Figura 3). Se ha reportado que los compuestos fenólicos son fitoquímicos presentes en las plantas como parte de un mecanismo de defensa ante condiciones de estrés biótico. Estos metabolitos son producidos por las plantas como parte de un inmenso número de compuestos secundarios que interactúan con organismos benéficos o dañinos; estos componentes actúan principalmente como compuestos de señalización y fitoquímicos de defensa (Leiss et al., 2012).

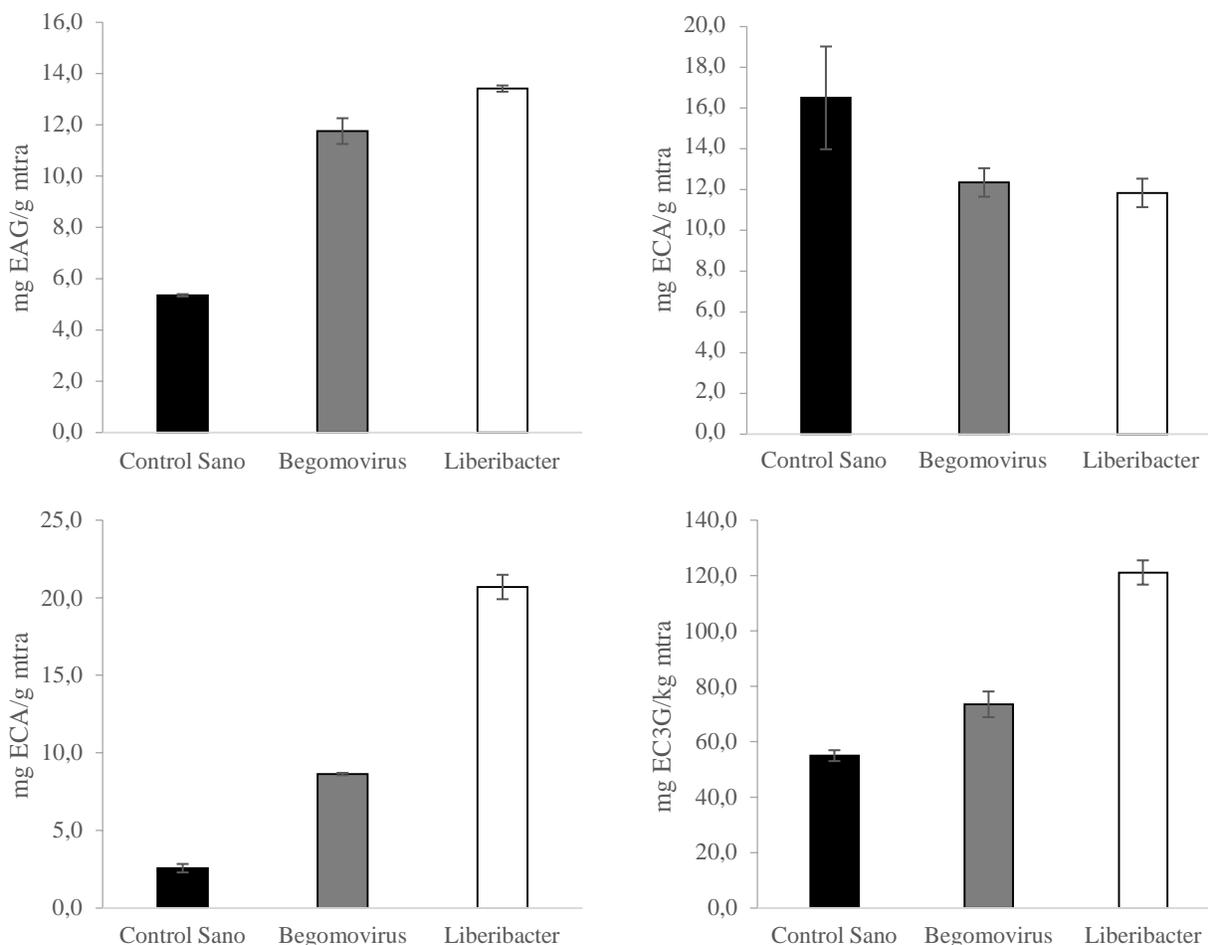


Figura 3. Concentración de compuestos fenólicos en frutos de chile Mirasol por efecto de fitopatógenos. A, fenoles totales; B, flavonoides totales; C, taninos condensados; D, antocianinas totales. EAG, equivalentes de ácido gálico; ECA, equivalentes de (+) catequina; EC3G, equivalentes de cianidina 3-glucósido.

En general se puede observar que las plantas sanas presentaron niveles inferiores en el contenido de polifenoles en comparación con las plantas infectas, a excepción de la concentración de flavonoides. La concentración de fenoles totales, taninos y antocianinas fue superior por efecto de *Candidatus Liberibacter*, es decir, esta bacteria es más eficiente en la activación de la vía de los fenilpropanoides encargada de la síntesis de compuestos fenólicos, en comparación con *Begomovirus*.

En algunos casos, los porcentajes de incremento superan el doble de lo obtenido en los chiles de las plantas sanas, para el caso de fenoles y antocianinas totales, se observó un incremento del 152% y 120%, respectivamente, mientras que para los taninos el incremento fue del 696%. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Barbehenn et al. (2009) quienes probaron la hipótesis de que el estrés biótico induce la producción de altas

concentraciones de semiquinona que resulta como un radical libre después de la oxidación de compuestos fenólicos como los taninos, sobre el agente causante del estrés, lo que pudiera estar relacionado con una reducción en la incidencia del patógeno. Por otro lado, se ha mencionado que la respuesta a la incidencia de patógenos pudiera estar relacionada con cascadas de señalización en las que se involucra la presencia de especies reactivas de oxígeno, esto debido a la activación de la NADPH oxidasa situada en la membrana plasmática de las células. Al activarse la producción de las especies reactivas, se expresan algunos genes involucrados en la activación de la fenilalanina amonoliase la cual es precursora de la vía de síntesis de fenilpropanoides (Cruz, 2008). Estos datos son ampliamente interesantes ya que esto permite afirmar que la presencia de patógenos en las plantas de Chile induce cambios en la síntesis de fitoquímicos con alto potencial nutracéutico. Es importante mencionar que esta presencia del patógeno en las plantas no presenta un efecto negativo en la salud del consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal SM & Hucl P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheat. *Cereal Chemistry*. 76:350-354.
- Barbehenn, R. V., Jaros, A., Lee, G., Mozola, C., Weir, Q. & Salminen, J. P. 2009. Hydrolyzable tannins as “quantitative defenses”: Limited impact against *Lymantria dispar* caterpillars on hybrid poplar. *Journal of Insect Physiology*, 55, 297-304.
- Castro, B.R., Sánchez, G.P., Peña, L.A., Alcántar, G.G., Baca, C.G. & López, R.R.M., 2000. Niveles críticos, de suficiencia y toxicidad de N-NO₃ en el extracto celular de pecíolos de tomate de cáscara. *Terra Latinoamericana*; 18: 141-145.
- Cruz, M. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling Behavior* 3: 156–165.
- Deshpande SS & Cheryan M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal of Food Science*. 50: 905-910.
- Fan, G., Xu, E., Deng, M., Zhao, Z. & Niu, A. 2015. Phenylpropanoid metabolism, hormone biosynthesis and signal transduction-related genes play crucial roles in the resistance of *Paulownia fortunei* to paulownia witches' broom phytoplasma infection. *BMC Genomics*. 16: 896- 912.
- Himeno, M., Kitazawa, Y., Yoshida, T., Maejima, K., Yamaji, Y., Oshima, K. & Namba, S. 2014. Purple top symptoms are associated with reduction of leaf cell death in phytoplasma-infected plants. *Scientific Reports*. 4: 1-7.
- Junqueira, A., Bedendo, I. & Pascholati, S. 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65: 181-185.
- Leiss, K., Choi, H.Y., Verpoorte, R. & Klinkhamer, P.G.L. 2010. An overview of NMR-based metabolomics to identify secondary plant compounds involved in host plant resistance. *Phytochemistry Reviews*. 10: 205-216.
- Liu, M., Qi Li, X., Weber, C., Yong, L.C., Brown, J. & Hai, L.R. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2926-2930.
- Musetti, R., Favali, M.A. & Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol contents in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*. 102: 133-147.
- Pineda, P.J., Avitia, G.E., Castillo, G.A.M., Corona, T.T., Valdez, A.L.A. & Gómez, H.J., 2008. Extracción de macronutrientes en frambueso rojo. *Terra Latinoamericana*; 26: 333-340.
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2013). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola <http://www.siap.gob.mx> (Consultado en línea, abril 19, 2017).
- Singleton VL, Orthofer R & Lamuela RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzymol*. 299: 152-178.