



## Reconocimiento de MAMPs derivados de *Phytophthora capsici* en plántulas de chile *Capsicum annuum*

Ana María Vázquez Jerónimo  
Asesora: Laura Mejía Teniente  
Universidad de Guanajuato

### Resumen

El chile es considerado como una de las hortalizas más importantes a nivel mundial, esto debido a su alta rentabilidad y a su versatilidad que permite elaborar diferentes alimentos además de aportar distintos nutrientes, así como productos destinados para la industria farmacéutica, por lo tanto, conocer los mecanismos de defensa de *Capsicum annuum* en interacción con MAMPs (patrones moleculares asociados a microorganismo) de un agente patógeno de relevancia agrícola, representa una forma de conocer e implementar un adecuado manejo integrado de plagas, por lo cual en la presente investigación se estandarizaron las condiciones de cultivo de *Phytophthora capsici*, así como el protocolo de extracción de ADN genómico, dado que la calidad del ADN es un paso crítico para la fragmentación del mismo por sonicación.

### Introducción

Las plantas dependen exclusivamente de la inmunidad innata de cada célula para reconocer y responder a las señales sobre el desafío microbiano, en la Tabla 1.1



se muestra los mecanismos de defensa que se pueden observar en las plantas. Esto se debe a que carecen de inmunidad adaptativa y de células inmunes móviles especializadas en reconocimiento microbiano (Hyong & Klessig, 2016). Las plantas han desarrollado un gran repertorio de PRR para el reconocimiento MAMP de microbios beneficiosos y patógenos.

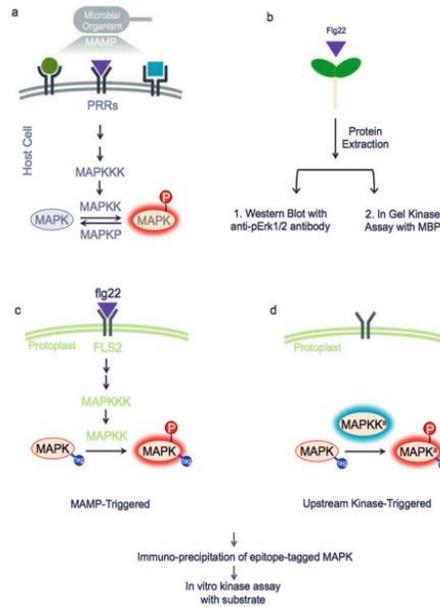
### **Tabla 1.1 Mecanismos de defensa de las plantas ante la presencia de patógenos**

Defensa de las plantas ante patógenos

<b>Mecanismos pasivos</b>	<b>Mecanismos activos</b>
Barreras físicas	Resistencia local adquirida
Barreras Químicas	Resistencia Sistémica Adquirida e Inducida

(Castro, Fernández, & Osuna, 2012)

Se han descrito varios pares de MAMP / PRR bien caracterizados en *Arabidopsis*. La flagelina bacteriana, o el péptido que imita a flg22, se reconoce por la quinasa del receptor de repetición rica en leucina, FLAGELLIN-SENSING2. El extremo amino conservado del factor de elongación de bacterias EF-Tu, representado por los péptidos elf18 o elf26, se reconoce por otra quinasa receptora de repetición rica en leucina (Huffaker, Pearce, & Ryan, 2006). El quitooligosacárido GlcNAc unido a  $\beta$ -1,4, quitina, de las paredes celulares de los hongos interactúa con varias quinasas similares al receptor de lisina (LysM), incluidas CERK1 / LYK1 y LYK5, dicho mecanismo puede apreciarse en la Ilustración 1.1



### Ilustración 1.1 Esquema de activación de MAPK en ensayos de señalización MAMP-PRR (Ping & Libo, 2017)

El reconocimiento de diferentes MAMP por PRR específicos induce eventos de señalización comunes que implican la activación de proteínas quinasas asociadas a mitógenos y dependientes de calcio (MAPK y CDPK), cambios en la concentración de calcio citosólico y especies reactivas de oxígeno (ROS), así como una extensa reprogramación transcripcional (Ping & Libo, 2017). Las respuestas inmunes celulares, como la reorganización de los orgánulos citoplásmicos y el refuerzo de la pared celular por deposición de callosa, también se activan para anular la infección del patógeno. La remodelación del citoesqueleto de actina durante la respuesta inmune innata se ha observado en una amplia gama de interacciones planta-microbio.

#### Phytophthora capsici como elicitor tipo MAMP

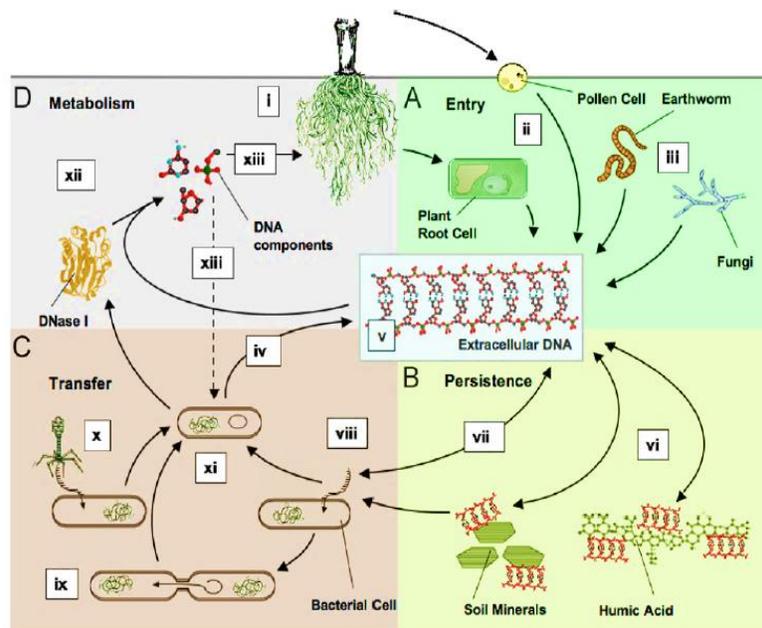
En 2015 Mazzoleni y col. (Mazzoleni, y otros, 2014) publicaron dos artículos en los cuales exponen el efecto inhibitorio en el crecimiento de plantas y otras especies biológicas (protozoarios, algas, hongos y animales) por la aplicación de ADN conespecífico extracelular fragmentado (ADNce). Este efecto fue dependiente de la concentración tanto como del nivel de fragmentación y del origen del ADN.



Ellos sugieren que esta propiedad del ADN es la causante de la retroalimentación negativa en suelos como una estrategia para mantener la biodiversidad en una zona.

Al ingresar al ambiente del suelo, el ADN extracelular se somete a factores biológicos, físicos y químicos dinámicos que determinan su destino. El ADN extracelular puede persistir a través de cationes que se unen sobre minerales del suelo y sustancias húmicas, se degradan enzimáticamente y se restringen por ADNAs de origen microbiano, y / o entran en el ciclo del ADN microbiano a través de la transformación natural de bacterias competentes. Una comprensión del ciclo del ADN es fundamental para dilucidar el destino del ADN extracelular en el ambiente del suelo, enseguida se pueden apreciar la Ilustración 1.2 donde se muestra el ciclo del ADN en el suelo.

En (A) se visualiza la entrada de ADN en el suelo: el ADN de la planta se replica durante el crecimiento y la división celular. Durante las últimas etapas del desarrollo de la planta, la degradación del ADN ocurre por las ADNAs de plantas en la planta (i). El ADN de las plantas ingresa al suelo a través de la liberación de polen, la lisis celular y la adición de materiales vegetales a los suelos (ii). La fauna y los hongos del suelo también liberan ADN en el ambiente del suelo (iii), al igual que la lisis bacteriana (iv). (B) Persistencia del ADN en el suelo: Después de la lisis celular, el ADN extracelular persiste en el suelo (v), donde puede protegerse mediante la unión a los ácidos húmicos (vi), los minerales de arcilla y las partículas de arena en el suelo (vi), procesos que son facilitado por cationes (por ejemplo,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y / o pH bajo. El ADN bacteriano puede transferirse a las bacterias receptoras a través de un puente de conjugación (conjugación) (ix). Los bacteriófagos insertan el ADN de una célula donante directamente en una célula bacteriana receptora (transducción) (x). El crecimiento bacteriano y la división celular replican (amplifican) el ADN integrado (xi). (D) Degradación del ADN en el suelo: el ADN no unido está restringido y digerido por las ADNAs extracelulares de origen microbiano (xii), que están ubicuas en el ambiente del suelo y proporcionan oligonucleótidos y nutrientes que el microorganismo y las plantas utilizan en el metabolismo (xiii).



**Ilustración 1.2 Ciclo del ADN en el suelo. (Levy-Booth, y otros, 2007)**

De acuerdo con Veresoglou y col. (Veresoglou, Aguilar, Mansour, & Rillig, 2015) de manera diferente a lo que proponen Mazzoleni y col., explican que el ADN funciona como una molécula señalizadora de estrés, es decir, un elicitor, en vez de una molécula inhibidora de crecimiento. De acuerdo con esto, se puede decir que la fragmentación del ADN de *Phytophthora capsici* podría funcionar como un elicitor de la familia MAMP, ya que actúa como molécula señalizadora cuando la planta se somete a estrés y estimulan la defensa de la planta.

## Objetivos

- Establecer las condiciones óptimas de crecimiento para *P. capsici*
- Establecer un protocolo de extracción de ADN genómico eficiente para *P. capsici*
- Establecer los factores específicos de sonicación del ADN extraído de *P. capsici*

## Justificación

El chile es considerado como una de las hortalizas más importantes a nivel



mundial, esto debido a su alta rentabilidad y a su versatilidad que permite elaborar diferentes alimentos además de aportar distintos nutrientes que pueden observarse en la Tabla 1.1, así como productos destinados para la industria farmacéutica, por lo tanto, conocer los mecanismos de defensa MAMPs de *Capsicum annuum* en interacción con un agente patógeno de relevancia agrícola, representa una forma de desarrollar e implementar un adecuado manejo integrado de plagas ya que existen distintas especies patológicas que atacan este cultivo y que pueden observarse en la Tabla 1.2

**Tabla 1.1 Información nutrimental de chile serrano \*Base 100g de chile\***

Nutriente	Valor
Grías	2.0 kcal
Proteína	0.25 g
Carbón de carbono	.7 g
Grasas	.74 g
Carbohidrato total	.44 g
Fibra	.87 g
Carbón de carbono	.7 g
Proteína	.7 g
Carbohidrato total	.83 g
Vitamina C (Ácido ascórbico)	4.9 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	.054 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	.081 mg
Vitamina B3 (Niacina)	.537 mg
Vitamina B5 (Ácido pantoténico)	.2 mg
Vitamina B6	.505 mg
Vitamina B12	.0 mcg

(INCAP, 2017)

**Tabla 1.2 Principales Enfermedades que afectan al cultivo de chile y sus agentes causales**

Enfermedad	Agente Causal
Chiltepec del chile	<i>Phytophthora capsici</i>
Chiltepec del chile	<i>Asarium spp</i>
Chiltepec del chile	<i>Rhizoctonia solani</i> .
Mancha foliar	<i>Peronospora spp.</i>
Mancha de la raíz	<i>Verticillium dahliae</i>
Mancha de la raíz	<i>Diopsis taurica</i>
Síndrome Mosaico del Pepino	Cucurbitariovirus



(CMV)

s Y de la Papa (PVY)	<i>ityvirus</i>
s Mosaico de la Alfalfa (AMV)	<i>amovirus</i>
s Mosaico del Tabaco (TMV)	<i>bamovirus</i>
s Jaspeado del Tabaco (V)	<i>irus</i>
del Moteado	<i>amovirus</i>
ro del Chile (PMMoV)	

---

 (Chew, Vega, Palomo, & Jiménez, 2008) (Gómez, J.A, L.M, & Urias, 2013)

### Importancia de la extracción de ADN de *P. capsici* para una sonicación exitosa

Según (Diagenode, 2012) , se recomienda usar una concentración de ADN que oscila entre 1 y 20 ng/μl ( lo más recomendable son 10 ng/μl. El uso de una concentración mayor (por ejemplo 50-100 ng/μl) puede resultar en picos más amplios o distribución de pico variable.

La viscosidad de la muestra puede tener un impacto importante en los resultados de sonicación. Se recomienda la resuspensión de la muestra de ADN antes del procesamiento de sonicación. Múltiple pipeteado y vórtex suave, seguido de una breve centrifugación para recuperar el volumen de la muestra.

También se ha demostrado que almacenar las muestras de ADN en hielo durante 10-15 minutos antes de la sonicación mejora la reproducibilidad.

La calidad y cantidad de ADN deben considerarse cuidadosamente, ya que estos factores pueden tener varios impactos en la sonicación y la secuenciación de próxima generación en las aplicaciones posteriores. La contaminación del ADN (por ejemplo, ácidos nucleicos, como ARN, proteínas en exceso u otros materiales contaminantes) puede interferir con el método de medición del ADN lo que lleva a una cuantificación incorrecta.

También la contaminación por ARN en la preparación del ADN genómico podría generar un perfil de distribución de fragmentos sesgado en una plataforma basada



en microfluidos (por ejemplo, Agilent Bioanalyzer) o alterar la eficiencia de la sonicación.

## **Metodología**

### **Condiciones de cultivo iniciales para *P. capsici***

*P. capsici* se cultivó en medio sólido V8 a 28 ° C durante 1 semana. Se cortaron 0,5 mm<sup>2</sup> del agar y se transfirió a 30 mL de caldo V8 clarificado, se incubaron a 28°C.

### **Condiciones de cultivo como segunda opción para *P. capsici***

*P. capsici* se cultivó en medio sólido PDA a 28 ° C durante 1 semana. Se cortaron 0,5 mm<sup>2</sup> del agar y se transfirió a 30 mL de caldo PDA, se incubaron a 28°C.

### **Condiciones iniciales para la extracción de ADN de *Phytophthora capsici* con el protocolo de CTAB y *Ustilago maydis***

Después de 3-8 días, los micelios se decantaron, se transfirieron a un mortero, se congelaron con N2 líquido y se trituraron a polvo fino. Se colocaron 50 a 100 mg de tejido fino en un tubo de microcentrífuga de 2 mL, y los tubos se almacenaron a -20° C hasta su utilización. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de CTAB como primera opción y como segunda opción el protocolo de *Ustilago maydis*.

La integridad del ADN extraído fue determinada por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, suplementado con 1 µl de bromuro de etidio. La visualización del ADN extraído se realizó en luz UV. La concentración de ADN fue calculada por absorbancia a 260 nm, utilizando Nanodrop Thermo Scientific.



## Resultados

### Extracción de ADN de *Phytophthora capsici* con el protocolo de CTAB y cultivo en medio v8 clarificado.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de 4 muestras mediante este protocolo.

<b>Muestras</b>	<b>ng/μl</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
<b>A</b>	218.0	1.92	1.47
<b>B</b>	346.1	1.97	1.69
<b>C</b>	344.0	1.98	1.69
<b>D</b>	112.4	1.93	1.61



**Fig. 1 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras A,B,C,D Extracción de ADN de *Phytophthora capsici* con el protocolo de *Ustilago maydis* y cultivo en medio v8 clarificado.**

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de 3 muestras mediante este protocolo.

<b>Muestras</b>	<b>ng/μl</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
<b>A.1</b>	1103.4	2.0	1.72
<b>B.1</b>	1383.1	1.99	1.74
<b>C.1</b>	334.0	1.88	1.42



Fig. 2 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras A.1,B.1,C.1.

Extracción de ADN de *Phytophthora capsici* con el protocolo de CTAB y cultivo en medio PDA.

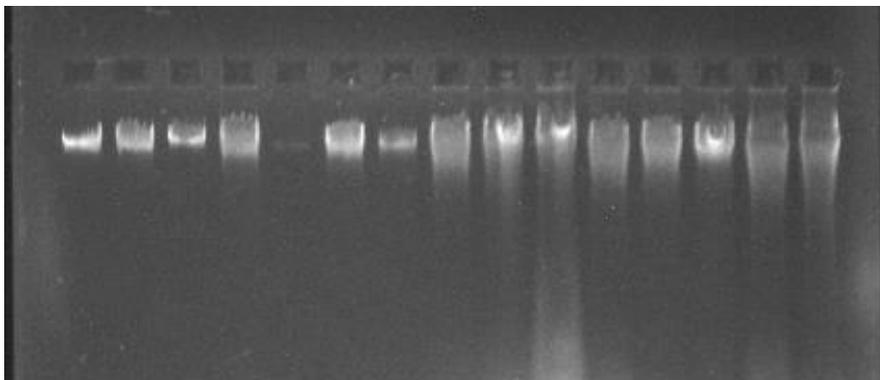
<b>Muestras</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>A260/A28</b> <b>0</b>	<b>A260/A23</b> <b>0</b>
<b>1</b>	1731.3	2.23	2.49
<b>2</b>	4947.4	2.23	2.46
<b>3</b>	2047	2.13	2.29
<b>4</b>	9765.3	2.23	2.49
<b>5</b>	362.2	2.24	2.62
<b>6</b>	4779.2	2.27	2.54
<b>7</b>	1831.6	2.18	2.46
<b>8</b>	52.3	2.26	2.63

<b>Muestras</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>A260/A28</b> <b>0</b>	<b>A260/A23</b> <b>0</b>
<b>A</b>	35216	2.23	2.41
<b>B</b>	47764.9	1.44	1.46
<b>C</b>	4090.0	2.25	2.51



<b>D</b>	19538.7	2.24	2.50
<b>E</b>	19247.3	2.24	2.49
<b>F</b>	9992.6	2.24	2.49
<b>G</b>	2560.2	2.25	2.51
<b>H</b>	3506.9	2.29	2.52

<b>Muestras</b>	<b>ng/<math>\mu</math>l</b>	<b>A260/A28 0</b>	<b>A260/A23 0</b>
<b>I</b>	11568.0	2.25	2.54
<b>II</b>	10229.6	2.25	2.54
<b>III</b>	10256.1	2.23	2.5
<b>IV</b>	12668.3	2.26	2.53
<b>V</b>	9928.4	2.25	2.54
<b>VI</b>	685.2	2.31	2.61
<b>VII</b>	21247	2.25	2.51
<b>VIII</b>	22132.3	2.25	2.50
<b>IX</b>	25957.5	2.25	2.50
<b>X</b>	9322.0	2.24	2.52
<b>XI</b>	10735.0	2.25	2.52
<b>XII</b>	2269.2	2.33	2.68



**Fig. 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras 1-8 y A-H**



## Conclusiones

Este trabajo se encuentra en investigación y desarrollo, hasta el momento se ha logrado obtener una buena extracción de ADN de *P. capsici* con los resultados mostrados anteriormente y se han logrado establecer las condiciones óptimas de crecimiento para *P. capsici*.

A partir de esta investigación y con los resultados obtenidos se pretende estandarizar un protocolo para la sonicación del ADN extraído ya que un óptimo cultivo y extracción es crucial para esto.



## Referencias

Chew, Y., Vega, A., Palomo, M., & Jiménez, F. (2008). *PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL CHILE (Capsicum annum L.)*. Coahuila, México: INIFAP.

Gómez, R., J.A, O., L.M, H., & Urias, M. (2013). *Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en el estado de Nayarit*. Nayarit, México: INIFAP.

INCAP. (2017). *Tabla de Composición de Alimentos de Centroamérica*. Guatemala: INCAP.

Levy-Booth, D., Campbell, R., Gulden, R., Hart, M., Powell, J., Klironomos, J., & Pauls, P. (2007). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *ELSEVIER*, 2997-2991.

Mazzoleni, S., Bonanomi, G., Incerti, G., Chiusano, M. L., Termolino, P., & Mingo, A. (2014). Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant–soil feedbacks? *New Phytologist Trust*.

Mejia, L., Durán, D., Chapa, A., & Torres, I. (2013). Oxidative and Molecular Responses in *Capsicum annum L.* *International Journal of Molecular Sciences*, 10178-10196.

Okabe, Y., & Medzhitov, R. (Enero de 2016). Tissue biology perspective on macrophages. *NCBI*, 17(1), 9-17.

Ping, H., & Libo, S. (2017). *Plant Pattern Recognition Receptors*. Texas: Human Press.

Uribe, L., Castro, L., Arauz, F., Henríquez, C., & Blanco, M. (2014). PUDRICIÓN BASAL CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN PLANTAS DE CHILE TRATADAS CON VERMICOMPOST. *Agronomía Mesoamericana*, 243-253.

Van Long, N. (2015). Spread of *Phytophthora capsici* in Black Pepper (*Piper nigrum*) in Vietnam. *Engineering*, 1080-1089.