

UNA BREVE MIRADA A LA INTERESANTE VIDA FITOPATÓGENA DE *Mycosphaerella fijiensis* Y *Phytophthora capsici*, PATÓGENOS RESPECTIVOS DE BANANO Y CHILE

A BRIEF LOOK TO THE INTERESTING PHYTOPATHOGENIC LIFE OF *Mycosphaerella fijiensis* AND *Phytophthora capsici*, RESPECTIVE PATHOGENS OF BANANA AND CHILLI PEPPER

Ignacio Islas-Flores*

Ligia Brito-Argáez

Mayra Díaz-Brito

José Chuc-Uc

UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA

MOLECULAR DE PLANTAS

Luis Manuel Peña-Rodríguez

Blondy Canto-Canché

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA, DEL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

DE YUCATÁN A.C.

*Autor responsable:

islasign@cicy.mx

R E S U M E N

Mycosphaerella fijiensis y *Phytophthora capsici* son dos fitopatógenos hemibiotróficos, el primero de ellos es un hongo ascomiceto y el segundo es un oomiceto. Ambos tienen efectos devastadores sobre cultivos importantes desde el punto de vista agronómico y al inicio de su proceso patogénico parecen utilizar, al menos en parte, a proteínas secretadas. Dada la importancia que tiene el secretoma de ambos patógenos, en este trabajo se recuperó el exoproteoma de ambos fitopatógenos y se analizó su efecto sobre las hojas de sus hospederos naturales (*M. fijiensis*-*Musa* sp y *P. capsici*-*Capsicum* sp). Se determinó que en el exoproteoma de ambos organismos hay proteasas que ejercen efecto fitotóxico sobre las hojas.

Palabras clave: hongos, oomicetos, *M. fijiensis*, *P. capsici*, secretoma, necrosis, exoproteoma.

ABSTRACT *Mycosphaerella fijiensis* and *Phytophthora capsici* are two hemibiotrophic phytopathogens, the first one of them is an ascomycete fungus and the second one is an oomycete. Both has devastating effects on crops that are important from an agronomical point of view, and at the start of their pathogenic processes, they seems to use, at least in part, secreted proteins. Due to the importance that the secretome has in both pathogens, in this work, the exoproteome from both pathogens was recovered and their effect was evaluated on the leaves of their natural hosts (*M. fijiensis*-*Musa* sp and *P. capsici*-*Capsicum* sp). It was determined that in the exoproteome from both organisms there are proteases that exert phytotoxic effects on the leaves.

Keywords: Fungi, Oomycete, *M. fijiensis*, *P. capsici*, secretome, necrosis, exoproteome

I N T R O D U C C I Ó N

El hongo ascomiceto, *M. fijiensis* y el oomiceto *P. capsici* son fitopatógenos cuyos hospederos son de importancia fundamental en la alimentación de la población mexicana y en la economía de los productores. *M. fijiensis* es patógeno de banano y causa la enfermedad foliar Sigatoka negra (González *et al.*, 1996). *P. capsici*, es un patógeno que afecta a los chiles causando la “marchitez del chile”. La infección se inicia en la raíz y tallo cerca del suelo; también puede presentarse en las partes aéreas de la planta y de ahí diseminarse (Babadoost, 2000). Se conoce que *P. capsici* produce efectores proteicos, tanto intracelulares como extracelulares que le facilitan la infección del hospedero (Kamoun, 2006). En *M. fijiensis*, hasta muy recientemente se han descrito un par de efectores extracelulares que parecen participar en la infección del hongo (Stergiopoulos *et al.*, 2010). No obstante, en ambos modelos aún se desconocen muchos de los factores proteicos que facilitan la infección así como sus mecanismos de acción. En el grupo de trabajo estamos interesados en aislar e identificar los efectores proteicos extracelulares que ambos organismos producen durante la interacción planta-patógeno. En este trabajo se presentan los resultados del estudio del exoproteoma de *M. fijiensis* y *P. capsici*, con el enfoque de los posibles efectores con actividad proteolítica.

M E T O D O L O G Í A

MATERIAL FÚNGICO Y DE OOMICETO

El cultivo *in vitro* de *M. fijiensis* se realizó de acuerdo a Islas-Flores y cols. (2006). El líquido de cultivo fue colectado 18 días después de la inoculación. *P. capsici* fue cultivado en medio PDB con 2% de infusión de hoja de *C. chinense*. El medio de cultivo fue colectado 9 días después de la inoculación con *P. capsici*. De manera independiente, el medio de cultivo de *M. fijiensis* o el de *P. capsici* fueron utilizados en la recuperación del exoproteoma.

RECUPERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL EXOPROTEOMA

El medio de cultivo de *M. fijiensis* de 18 días se recuperó, se liofilizó y se resuspendió en 10 mL de amortiguador. Para la recuperación del exoproteoma, la resuspensión se adicionó con 90% de sulfato de amonio (657 mg/1000 μ L) y se incubó por 24 h a 4°C. La mezcla se centrifugó a 40,000 x g por 40 min., la pastilla resultante se resuspendió en 500 μ L de amortiguador y se filtró con mallas de 3 kDa. El exoproteoma de *P. capsici*, se recuperó de

medio PDB inoculado con *P. capsici*, las proteínas del medio (control) fueron obtenidas de medios sin inocular. Los medios de cultivo fueron filtrados, liofilizados y resuspendidos en 5 ml de amortiguador 50 mM de Tris-HCl pH 6.8. El exoproteoma de *P. capsici* fue precipitado con 30% de sulfato de amonio y agitación constante por 2 h a 4°C. Los tubos fueron centrifugados a 16000 x g a 4°C por 15 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos, mientras que las pastillas fueron resuspendidas en 1 mL de 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8) y designadas como la fracción 0-30%. Los sobrenadantes fueron adicionados nuevamente con sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración de 60% y después de 90%. Las pastillas correspondientes fueron resuspendidas y denominadas como las fracciones 30-60% y 60-90%. Las tres fracciones de proteínas [(0-30%, (30-60%) y (60-90%)] fueron dializadas en filtros con poros de 12 kDa. La concentración de proteínas se determinó de acuerdo a Bradford (1976) o Peterson (1977).

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas secretadas de *M. fijiensis* o de *P. capsici* fueron analizadas por electroforesis en geles disociantes de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acuerdo a Laemmli (1979). Las muestras del exoproteoma (20 mg) fueron separadas a 100 V por 3 h a 25°C.

ENSAYO DE PROTEASA EN GEL

Geles SDS-PAGE de 15% fueron co-polimerizados con 0.1% de gelatina (Sigma), cargados con 20 mg de cada una de las muestras del exoproteoma de *M. fijiensis* o de *P. capsici* y sometidos a electroforesis. Los geles fueron incubados a 37°C por 12 h en 250 mM de Tris-HCl pH 7.5, adicionados con 2.5% de Triton X-100. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

ENSAYOS DE FITOTOXICIDAD DEL EXOPROTEOMA DE *M. fijiensis* EN HOJAS DE *Musa* sp O DEL SECRETOMA DE *P. capsici* EN HOJAS DE *C. chinense*

Plantas de banano de un año de edad resistentes a la Sigatoka negra (*M. balbisiana*) o del cultivar susceptible (*M. acuminata* cv. Grande-Naine) fueron adaptadas a condiciones de invernadero (29.1°C; 40% humedad; fotoperiodo de 12 h luz/12 h) durante 15 días. En ambos grupos de plantas, la tercera hoja localizada por debajo de la hoja cigarro fue desinfectada con etanol 70%; e inmediatamente, con una navaja estéril, se les realizó una pequeña incisión en el haz. La tercera hoja por debajo del meristemo apical de *C. papaya* cv Maradol, fue sometida al mismo proceso de inoculación. Cada corte en la hoja fue inoculado con uno de los cinco

tratamientos: 45 μ L (20 μ g) del exoproteoma de *M. fijiensis*; la proteasa comercial Pronasa (45 μ L); 45 μ L del amortiguador de resuspensión; 45 μ L del medio de cultivo sin inocular o 45 μ L de agua bidestilada estéril. Los cortes control fueron realizados en la otra porción de la hoja y solo fueron inoculados con agua. Las hojas tratadas fueron introducidas en bolsas de celofán semipermeable y la respuesta necrótica monitoreada por 96 h.

La actividad inductora de necrosis del exoproteoma de *P. capsici* fue evaluada mediante el ensayo de inmersión de la hoja de acuerdo con Natori y cols. (1981). Brevemente, la cuarta hoja ubicada por abajo del meristemo apical fue desprendida de plantas de 2 meses de edad. Cada peciolo fue sumergido durante 12 h y 25°C en 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.5 conteniendo 4 μ g de exoproteoma/300 μ L de amortiguador (tratamiento); amortiguador de fosfato (control negativo), agua (blanco). La fitotoxicidad fue evaluada siguiendo el desarrollo de los síntomas de marchitez y necrosis.

EFEECTO DE P47F SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE CULTIVOS EN SUSPENSION DE *C. chinense*

En el caso de la proteína secretada de *P. capsici* (denominada p47); 25 μ L (0.5 μ g) se aplicaron sobre 20 500 células/mL de *C. chinense*. La mezcla se incubó a 25°C y oscuridad por 24, 48 y 72 h. Concluida la incubación, las células fueron tratadas por 15 min a 25°C con 1 mL de 0.25% de azul de Evans. Las muestras fueron centrifugadas a 1875 x g por 5 min, las pastillas celulares fueron lavadas una vez con 1 mL de 50% de metanol-1% SDS e incubadas a 25°C toda la noche. Las células fueron calentadas a 70°C por 30 min y centrifugadas a 1875 x g por 15 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y las pastillas celulares fueron lavadas con una mezcla de 50% metanol-1% SDS. Los lavados se mezclaron y se determinó su absorbancia a 600 nm. La viabilidad celular se calculó con la ecuación [% de células muertas = (AV/AM) x 100 y el % de células vivas o viabilidad = 100 - % de células muertas], donde AV= absorbancia de las células sin tratar a 70°C y AM = absorbancia de las células tratadas a 70°C. Las células control fueron tratadas de forma idéntica a los tratamientos, excepto que fueron adicionadas con 25 μ L de amortiguador de electroelución.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE P47F DE *P. capsici*

La p47f (10 μ g) fue cargada en un gel disociante de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE) y sometido a electroforesis. Del gel teñido con azul de Coomassie se separó la banda de proteína definida como p47f, se colocó en un tubo Eppendorf y se digirió con tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas acoplada a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS, Thermo Orbitrap Velos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

LOS EXOPROTEOMAS DE *M. fijiensis* Y DE *P. capsici* CONTIENEN PROTEASAS.

Algunos microorganismos efectúan su acción patogénica secretando proteasas hacia los tejidos del hospedero. Para analizar si el exoproteoma de *M. fijiensis* o de *P. capsici* incluye proteínas con actividad proteolítica, se evaluó la actividad de proteasa. La actividad de proteasa en el medio de cultivo inoculado con *M. fijiensis* se inició al día 3 de cultivo y se incrementó de manera paulatina hasta el día 9; en los días posteriores la actividad se mantuvo constante. No se observó actividad de proteasa con el filtrado del medio sin inocular.

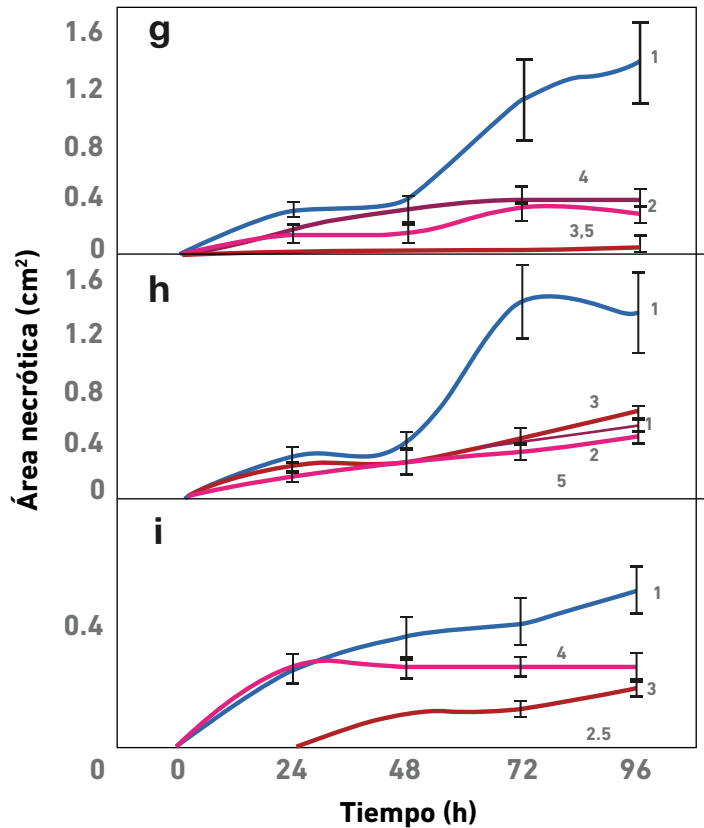
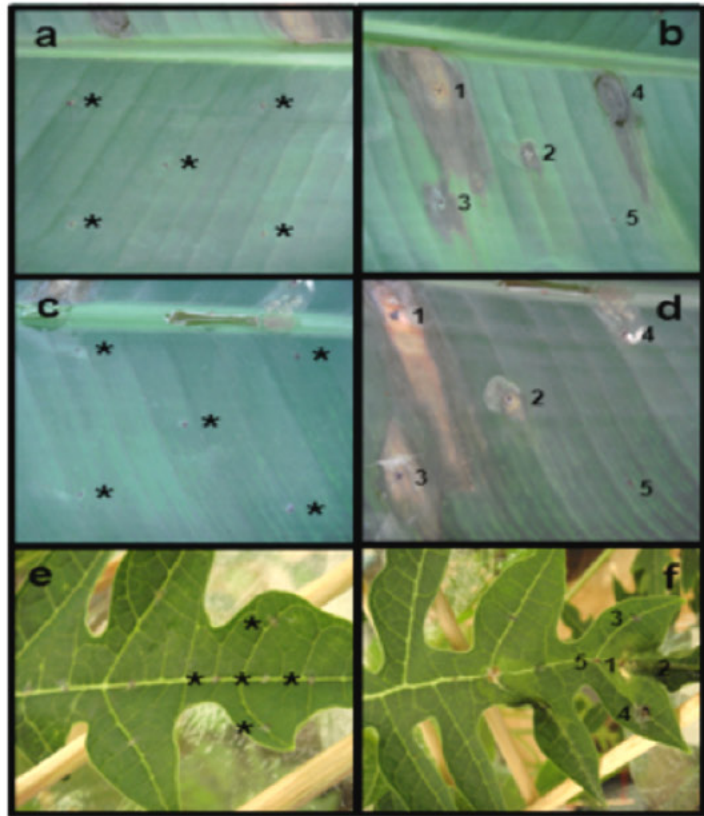
En el exoproteoma de *P. capsici*, se encontró que la actividad proteolítica fue mayor en las fracciones precipitadas con 30–60% y 60–90% de sulfato de amonio. La detección proteolítica en los filtrados del exoproteoma de *M. fijiensis* así como en el de *P. capsici* y la posterior tinción en gel de los polipéptidos asociados a dicha actividad confirmaron la recuperación proteica a partir del exoproteoma de ambos fitopatógenos.

EL EXOPROTEOMA DE *M. fijiensis* INDUCE NECROSIS EN BANANAS RESISTENTES O SUSCEPTIBLES A LA SIGATOKA NEGRA Y EN UNA PLANTA NO HOSPEDERA.

Con el objetivo de determinar si alguna de las proteínas secretadas por *M. fijiensis* podría estar induciendo necrosis, 20 µg (45 µL) del exoproteoma colectado en el día 18 de cultivo fue aplicado en hojas de plantas de *M. acuminata* cv. Grande Naine de 12 meses de edad. La mezcla de proteínas indujo una lesión necrótica (~0.15 cm²) después de 24 h y alcanzó un área máxima (~0.83 cm²) después de 72 h de tratamiento. Para explorar si las proteasas secretadas estaban involucradas en el desarrollo de la lesión, una proteasa comercial fue utilizada como control positivo. Dicha enzima produjo lesiones necróticas pero solo alcanzaron un máximo de ~0.35 cm² después de 96 h. La aplicación del amortiguador de resuspensión de proteínas indujo solo una pequeña área necrótica (~0.2 cm²) después de 96 h. La realización del mismo ensayo en las hojas de *M. balbisiana* (resistente a la Sigatoka negra) mostró que el exoproteoma de *M. fijiensis* indujo lesiones más grandes (~2.8 cm²) en periodos de tiempo más cortos (12 h). El área máxima de necrosis inducida por la proteasa comercial (~1 cm²), el amortiguador de resuspensión de la proteína (~0.5 cm²) fue observado a las 24 h y se mantuvo constante hasta las 96 h. Cuando el exoproteoma de *M. fijiensis* fue aplicado a hojas de *Carica papaya* cv. Maradol, las lesiones necróticas fueron más pequeñas que en las banananas (Figura 1).

FIGURA 1.

Efecto del secretoma de *M. fijiensis* y una proteasa comercial sobre hojas de *Musa acuminata* (a), *Musa balbisiana* (c) *Carica papaya* (e). Hojas control (a, c y e) y hojas tratadas con el exoproteoma de *M. fijiensis* o la proteasa comercial (b, d y f). La cuantificación de las lesiones se muestra en forma de gráficos (g, h e i). Los números indican: 1, Proteína de *M. fijiensis* (20 ug); 2, Pronasa (20 ug); 3, amortiguador de resuspensión de proteínas; 4, medio de cultivo sin inocular (20 ug), 5, agua estéril.



En el caso del exoproteoma de *P. capsici*, la evaluación de su fitotoxicidad por medio del ensayo de inmersión de las hojas fue positivo con p47f, no así cuando se aplicó el amortiguador de electroelución o agua bidestilada estéril (Figura 2).

EFFECTO DE P47F SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE *C. chinense*

La evaluación de la viabilidad de células de *C. chinense* tratadas con p47f o con el amortiguador de electroelución, mostraron valores cercanos al 80% al inicio del tratamiento pero después de 24 horas de exposición a p47f, la viabilidad decayó hasta un 25%. En contraste, en las células adicionadas con el amortiguador de electroelución, los valores de viabilidad se mantuvieron en 50%.

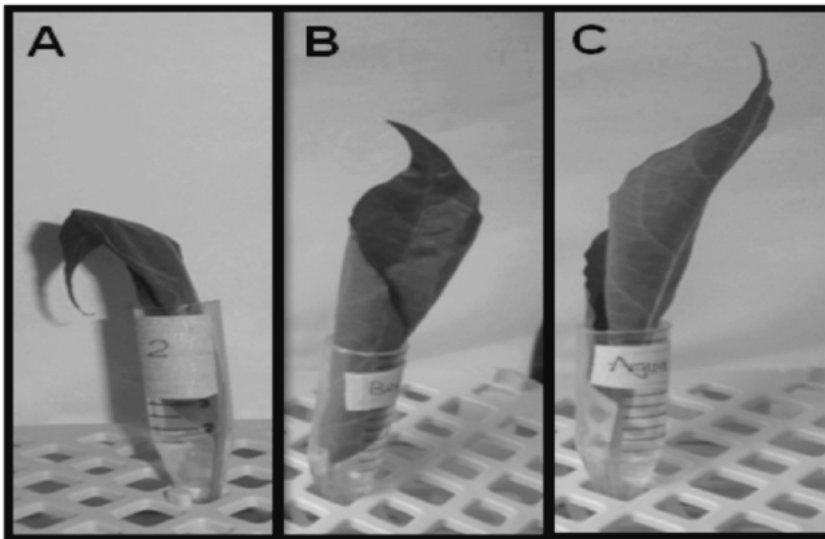


FIGURA 2.

Efecto del exoproteoma de *P. capsici* sobre hojas de *Capsicum chinense* Jacq. Proteína de la fracción p47f (A), amortiguador de electroelución (B) y agua (C).

Análisis de microscopía de contraste de fases mostraron que las células tratadas con el amortiguador de electroelución se mantenían turgentes, mientras que las tratadas con p47f formaron grupos, fueron pequeñas y con invaginaciones. Finalmente, análisis de microscopía de fluorescencia (tinción con DAPI) mostraron que las células tratadas con el amortiguador de electroelución tenían un núcleo central, mientras que las células tratadas con p47f mostraban núcleos fragmentados o adyacentes a la membrana celular y con una apariencia desagregada.

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE P47F DE *P. capsici*

El análisis proteómico de p47f mostró que ésta contiene 15 polipéptidos con identidad a los reportados en *Phytophthora* sp, así como con los codificados en el genoma de *P. capsici*. Entre los polipéptidos identificados están la subunidad 6B del proteasoma, la cual es reconocida como la proteasa 26S; una proteasa específica de proteínas ubiquitiniladas; el inductor M81D de la transglutaminasa; cinco glucosil hidrolasas, una lipasa y una proteína homóloga a la proteína OPEL asociada a la secreción en *P. parasítica*, (cuadro 1).

CUADRO 1.

Secuencia de aminoácidos del exproteoma de *P. capsici*

Peptide sequence	Identity	ID in <i>P. capsici</i> Genome	NCBI accession number	NCBI e-value	NCBI Maximum Identity (%)
MKNLKRELIR	26S protease regulatory subunit 6B, from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_576122	XP_002896373.1	0.0	100
VTDLATCSK QAGTVENLTFMNNK GQHGPQGYASADGNSK IGGGPGISTGAENIMTG EK GYDVQEHKVTSDNYILTYR LQVYISQTPAGTSVK NMAHFAQGIR	Secretory protein OPEL from <i>Phytophthora parasitica</i>	Phyca11_504296	AAP85258.1	0.0	82
SLDIASGMSK	Lipase putative from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_506445	XP_002907948.1	0.0	93
GLEYSLGR IDLQIR SLALYYSK LDLGPTMAK AGDDQK GLHELATAQ GK	Ubiquitin-specific protease putative, from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_96374	XP_002900151.1	0.0	85
QVAQHSSIR VAVGVQLGDPNR LQAQWDQMVSK	Putative glycosyl hydrolase family 30 glycosylceramidase from <i>Phytophthora sojae</i>	Phyca11_550198	EGZ08269.1	0.0	92
SCTGGGVPVGTQVR AQWEQATSK	Family 10 glycoside hydrolase from <i>Phytophthora sojae</i>	Phyca11_46496	EGZ08272.1	8x10 ⁻¹⁵⁴	88
MPGVNYSRKGPDWAPDSSK	Glycoside hydrolase, putative from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_550254	XP_002905856	0.0	84
LSSATEQINKSMGGQTIR	Glycosyl transferase, putative from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_508589	XP_002905830.1	0.0	73
WGTANSDSINKVHLIGHSMGGQTI R LDQWGITTK	Hypothetical protein PHYSODRAFT_543825 from <i>Phytophthora sojae</i>	Phyca11_551416	EGZ20473.1	0.0	91
ALVSSVYDGARVSTVFTGAR	Hypothetical protein PHYSODRAFT_489197 from <i>Phytophthora sojae</i>		EGZ20455.1	0.0	79
AGPDWATAAEK	Hypothetical protein PHYSODRAFT_544256 from <i>Phytophthora sojae</i>	Phyca11_526038	EGZ18635.1	0.0	91
VFLDVAQK	Transglutaminase elicitor M81D from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_544016	XP_002897181.1	0.0	84
ATPSFETLNVGGLLTIGFR KKGAYNTFTK	Putative endo-1,3-beta-glucanase from <i>Phytophthora infestans</i>	Phyca11_506998	AAM18482.1	3x10 ⁻⁷⁹	92
	Hypothetical protein PHYSODRAFT_488062		EGZ20147.1	0.0	72
	Conserved hypothetical protein from <i>Phytophthora infestans</i> T30-4	Phyca11_551419	XP_002905966.1	1x10 ⁻¹⁷⁷	86

C O N C L U S I O N E S .

En este estudio se demostró que los fitopatógenos *M. fijiensis* y *P. capsici* utilizan proteínas como parte de su arsenal biológico para la colonización de sus hospederos. La secuenciación del exoproteoma claramente reveló la presencia de proteínas con actividad proteolítica que de alguna forma están mediando la interacción planta-patógeno.

R E F E R E N C I A S .

- GONZÁLEZ R., Bustamante E., Shannon P., Okumoto S., Leandro G. (1996). Manejo Integrado de plagas 40:125-128. INIBAP, Roma.
- ISLAS-FLORES I., Peraza-Echeverría L., Canto-Caché B., and Rodríguez-García C. (2006). Extraction of high quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation Mol. Biotechnol. 34: 45-50.
- BABADOOST M. (2000). Phytophthora blight of pepper. Department of Crops Sciences University of Illinois extension. Report on Plant Disease. RPD No. 947.
- KAMOUN S. (2006). A catalogue of the effectors secretome of plant pathogenic oomycetes. Annual Review of Phytopathology. 44: 41-60.
- BRADFORD M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- NATORI S., Ikekawa N., Suzuki M. (1981). Advances in natural products chemistry: extraction and isolation of biologically active compounds. Wiley pp 92-93.
- PETERSON G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. Analytical Biochemistry 83: 346-356.
- STERGIOPOULOS I., van den Burg H.A., Okmen B., Beenen H.G., van Lieere S., Kema H.H.J. and de Wit P.J.G.M. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 7610-7615.