

# ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL INDUCIDA BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO Y ABIÓTICO EN *Capsicum chinense* BG-3821

## ANALYSIS OF TRANSCRIPTIONAL EXPRESSION INDUCED IN *Capsicum chinense* BG-3821 UNDER CONDITIONS OF BIOTIC AND ABIOTIC STRESS

Alberto Barrera-Pacheco<sup>1</sup>, Abuzolt de J. Joaquín-Ramos<sup>1</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>2</sup>, Mario M. González-Chavira<sup>2</sup>,  
Ma. Cristina I. Pérez-Pérez<sup>1</sup>, Lorenzo Guevara-Olvera<sup>1</sup> y Ramón G. Guevara-González<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Avenida Tecnológico y Antonio García-Cubas, s/n. Colonia FOVISSSTE, 38010, Celaya, Guanajuato, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigación Regional del Centro, Campo experimental del Bajío, Unidad de Biotecnología, Carretera Celaya-San Miguel de Allende, Km. 6.5, Celaya, Guanajuato, México. Apartado Postal 112. <sup>3</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010, Querétaro, Querétaro, México. (gerardo@irc.mx).

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue analizar la expresión transcripcional inducida bajo diferentes tipos de estrés biótico y abiótico en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* BG-3821). Los estudios de expresión de genes de plantas bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico son importantes porque son una estrategia para entender, a nivel molecular, cómo las plantas actúan en fenómenos de resistencia a patógenos y condiciones abióticas de crecimiento, lo que puede ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de defensa a estos tipos de estrés en las plantas. Para el análisis transcripcional se emplearon sondas moleculares de los EST R50 y R100. Ambos son fragmentos diferenciales y posiblemente implicados en la respuesta de resistencia de *C. chinense* BG-3821 a infecciones por el virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV). Se comprobó la especificidad de la expresión de los genes correspondientes a R50 y R100 en plantas de *C. chinense* infectadas con PHYVV, así como por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria y el hongo *Fusarium solani*. Plantas infectadas con el oomiceto *Phytophthora capsici* no indujeron la expresión de estos genes. Asimismo, se evaluó si la expresión de estos genes es inducida mediante la aplicación de ácido salicílico (AS), metil jasmonato, etileno o estrés abiótico (hídrico y térmico) a plantas de *C. chinense* BG-3821. Adicionalmente, se realizó análisis de hibridación de ADN complementario (ADNc), para lo cual se seleccionaron varias clonas de bancos sustractivos que contienen fragmentos de genes de *C. chinense* BG-3821 cuya expresión fue inducida en infecciones de PHYVV. Se demostró que la expresión de los genes correspondientes a los fragmentos R50 y R100 no son sólo inducidos específicamente por la infección de PHYVV, sino además por *X. campestris* pv. vesicatoria y *F. solani*, así como por la aplicación de ácido salicílico, metil jasmonato y etileno. En el análisis de arreglos se observaron diferencias en el nivel de expresión de varios EST para cada condición de estrés evaluada.

Recibido: Noviembre, 2006. Aprobado: Noviembre, 2007.  
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 42: 95-106, 2008.

### ABSTRACT

The objective of the present work was to analyze the transcriptional expression induced under different types of biotic and abiotic stress in Havana chili pepper (*Capsicum chinense* BG-3821). The studies of expression of plant genes under different conditions of biotic and abiotic stress are important because they are a strategy for understanding at molecular level, how plants act in phenomena of resistance to pathogen and abiotic growth conditions, which may expand the knowledge about molecular defense mechanisms to this type of stress in plants. For transcriptional analysis, molecular probes of R50 and R100 EST's were employed. Both are differential fragments and possibly implied in the resistance response of *C. chinense* BG-3821 to infections by the pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV). Specificity of gene expressions corresponding to R50 and R100 was confirmed in *C. chinense* plants infected by PHYVV, as well as by the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria bacterium, and *Fusarium solani* fungus. Plants infected with the *Phytophthora capsici* oomycete did not induce the expression of these genes. Likewise, it was assessed if the expression of these genes is induced to *C. chinense* BG-3821 plants by application of salicylic acid (AS), jasmonate methyl, ethylene, or abiotic stress (hydric and thermal). Additionally, analysis of complementary DNA hybridization (cDNA) was conducted, for which various clones from subtractive banks were selected, containing *C. chinense* BG-3821 fragments, whose expression was induced in infections of PHYVV. It was demonstrated that the gene expressions corresponding to R50 and R100 fragments are not only induced specifically by PHYVV infection, but also by *X. campestris* pv. vesicatoria, and *F. solani*, as well as by application of salicylic acid, jasmonate methyl, and ethylene. In the analysis of arrangements, differences in the expression level of several EST's were observed for each evaluated stress condition.

Key words: *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, chili pepper, stress, PHYVV.

**Palabras clave:** *Fusarium solani*, *Phytophthora capsici*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, chile, estrés, PHYVV.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo del chile sufre pérdidas de 20 a 100% debido a enfermedades de etiología viral, entre las que destacan las causadas por geminivirus (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Godínez-Hernández *et al.*, 2001). El virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV, antes PHV) es un geminivirus del género *Begomovirus*, tiene genoma bipartita, es transmitido por mosquita blanca, e infecta dicotiledóneas, incluyendo chile (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2005). Dentro de los geminivirus más distribuidos en los cultivos de chile en México están el virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) y el virus mosaico dorado del chile (PepGMV) (Anaya-López *et al.*, 2003a,b). En México se ha identificado y caracterizado fuentes de resistencia a estos geminivirus en chile (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003a,b; Anaya-López *et al.*, 2005). Una colecta de chile habanero resistente a infecciones simples y mixtas por los geminivirus PHYVV y PepGMV es la denominada BG-3821 del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) perteneciente a la especie *C. chinense* Jacq. (Anaya-López *et al.*, 2003a,b; Anaya-López *et al.*, 2005). En la caracterización molecular de la resistencia se ha obtenido seis bibliotecas de fragmentos de genes expresados diferencialmente (EST) de estas plantas sometidas a infecciones por geminivirus (Anaya-López *et al.*, 2005). Dentro de éstos están el R52 y el R100 que presentan similitud con genes que codifican para proteínas tipo germin (GLP) reportados en otros sistemas como involucrados en mecanismos de resistencia en plantas a patógenos e insectos herbívoros (Schweizer *et al.*, 1999; Lou y Baldwin, 2006). Asimismo, se ha encontrado otros EST como el R50, el R57 y el R70, cuya función se desconoce. Se ha reportado que varios genes (entre ellos GLP) pueden ser inducidos en plantas en respuesta a varios tipos de estrés (Park *et al.*, 2004). La expresión inducible a nivel transcripcional de algunos genes en plantas se ha relacionado fuertemente con el tipo de interacción que realiza con diversos microorganismos (compatible o incompatible) o condiciones abióticas (Park *et al.*, 2004; Eichmann *et al.*, 2005; Restrepo *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, se debe estudiar la especificidad de la expresión de los genes correspondientes a los EST identificados en la interacción *C. chinense* BG-3821-geminivirus, con el objetivo de dilucidar su posible participación en el mecanismo de respuesta de esta planta a diferentes tipos

## INTRODUCTION

Chili pepper crop has losses of 20 to 100% due to diseases of viral etiology, among which those caused by geminivirus stand out (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Godínez-Hernández *et al.*, 2001). The pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV, formerly PHV) is a geminivirus of genus *Begomovirus*, it has bipartite genome, is transmitted by the white fly and infects dicotyledones, including chili pepper (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2005). Among the geminiviruses most widely distributed in chili pepper crops in México, there are Pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV) and pepper golden mosaic virus (PepGMV) (Anaya-López *et al.*, 2003a,b). In México, sources of resistance to these geminiviruses in chili pepper have been identified and described (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003a,b; Anaya-López *et al.*, 2005). A collection of Havana chili pepper resistant to simple and mixed infections by geminiviruses PHYVV and PepGMV is the one called BG-3821 of the germplasm bank of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (National Institute of Forest, Agriculture and Livestock Research), belonging to *C. chinense* Jacq. species (Anaya-López *et al.*, 2003a,b; Anaya-López *et al.*, 2005). In the molecular characterization of resistance, six library of differentially expressed gene fragments (EST's) of these plants have been obtained, subjected to infections by geminivirus (Anaya-López *et al.*, 2005). Among them, there are R52 and R100, which present similarity with genes encoding germin-like proteins reported in other systems as involved in plant resistance mechanisms to pathogens and herbivorous insects (Schweizer *et al.*, 1999, Lou and Baldwin, 2006). Likewise, other EST's have been found, like R50, R57, and R70, whose function is not known. It has been reported that several genes (GLP among them) may be induced to plants in response to various types of stress (Park *et al.*, 2004). The inducible expression at transcriptional level of some genes in plants has been closely related to the type of interaction that it performs with different (compatible and incompatible) microorganisms or abiotic conditions (Park *et al.*, 2004; Eichmann *et al.*, 2005; Restrepo *et al.*, 2006). Based on the aforesaid, specificity of gene expression corresponding to EST, identified in the interaction *C. chinense* BG-3821 with the geminivirus, must be studied with the objective to clarify its possible participation in the response mechanism of this plant to different types of biotic (geminiviruses and other pathogens) and abiotic stress, as well as the possible route of signaling, which these genes follow

de estrés biótico (geminivirus y otros patógenos) y abiótico, así como la posible ruta de señalización que sigan estos genes en la planta. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar análisis de la expresión a nivel transcripcional de genes de *C. chinense* BG-3821 inducida por diferentes tipos de estrés biótico (PHYVV, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, *Phytophthora capsici* y *Fusarium solani*) y abiótico (térmico e hídrico), y mediante la aplicación de ácido salicílico, metil jasmonato y etileno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se usaron plantas de Chile de la especie *Capsicum chinense* Jacq. colecta BG-3821 proveniente del Banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigación de la Región Centro, Campo experimental Bajío, Unidad de Biotecnología, Celaya, México. Componentes A y B del Geminivirus PHYVV clonados en el plásmido Bluescript (SK+). La cepa de *X. campestris* pv. vesicatoria fue proporcionada por el Dr. Ángel Alpuche Solís del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Las cepas de *F. solani* y *P. capsici* se tomaron del cepario del INIFAP, Unidad de Biotecnología.

### Inducción de estrés biótico

La metodología para las inoculaciones en Chile de la bacteria *X. campestris* pv. vesicatoria y el oomiceto *P. capsici*, fue la reportada por Shin *et al.* (2002). La inoculación de *F. solani* se realizó colocando tres discos (1 cm diámetro) del medio PDA con micelio del hongo. Todas las plantas tenían cuatro hojas verdaderas al momento de la inoculación y se mantuvieron incubadas en invernadero durante marzo y abril de 2006, con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, y una temperatura de 26 a 28 °C. De cada patógeno se verificó su presencia en las plantas inoculadas, mediante PCR con oligonucleótidos específicos para PHYVV (Anaya-López *et al.*, 2005), reacción en la planta y recuperación en medio de cultivo para *X. campestris* pv. vesicatoria, y recuperación en medio de cultivo papa dextrosa agar (Difco) para *F. solani*. Adicionalmente, *F. solani* y *P. capsici* se detectaron mediante PCR usando oligonucleótidos específicos (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). Las extracciones de ADN se hicieron de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.* (1983).

### Inducción de estrés abiótico

#### Estrés térmico

Se colocaron 20 plantas de Chile en una incubadora (Biotronette, Lab Line Instruments, Melrose Park, IL.) con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 40 °C, y otras 20 plantas se colocaron a 10 °C. Las plantas se mantuvieron en observación 48 h. A las 30

en la planta. Therefore, the aim of this study was to conduct analyses of expression at transcriptional level of *C. chinense* BG-3821 genes, induced by different types of biotic (PHYVV, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, *Phytophthora capsici*, and *Fusarium solani*) and abiotic (thermal and hydric) stresses, and through application of salicylic acid, jasmonate methyl, and ethylene.

## MATERIALS AND METHODS

### Biologic material

Chili pepper plants of *Capsicum chinense* Jacq., collection BG-3821 species were used from the germplasm bank of the National Institute of Forest, Agricultural, and Livestock Research (INIFAP), Research Center of the Central Region, Experimental Field Bajío, Unit of Biotechnology, Celaya, México. Components A and B of the PHYVV geminivirus, cloned in the Bluescript (SK+) plasmid. *X. campestris* pv. vesicatoria strain was provided by Dr. Ángel Alpuche Solís of the Instituto Potosino of Scientific Research and Technology (IPICYT). The *F. solani* and *P. capsici* strains were taken from INIFAP strains collection, Unit of Biotechnology.

### Induction of biotic stress

The methodology for inoculations in chili pepper of *X. campestris* pv. vesicatoria bacterium and *P. capsici* oomycete was that reported by Shin *et al.* (2002). Inoculation of *F. solani* was performed placing three disks (1 cm diameter) of PDA medium with mycelium of the fungus. Every plant had four real leaves at the moment of inoculation and was kept incubated in greenhouse during March and April 2006, with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark and a temperature of 26 to 28 °C. The presence of each pathogen in the inoculated plants was verified by PCR with specific oligonucleotides for PHYVV (Anaya-López *et al.*, 2005), reaction in the plant, and recovery in culture medium for *X. campestris* pv. vesicatoria, and recovery in potato dextrose agar (Difco) culture medium for *F. solani*. Additionally, *F. solani* and *P. capsici* were detected by PCR using specific oligonucleotides (Rico-Guerrero *et al.*, 2004). The extractions of DNA were made according to the protocol of Dellaporta *et al.* (1983).

### Induction of abiotic stress

#### Thermal stress

Twenty pepper plants were placed in an incubator (Biotronette, Lab Line Instruments, Melrose Park, IL.) with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness, at 40 °C, and another 20 plants were placed at 10 °C; the plants were kept in observation for 48 h. At 30 h, the tissue was gathered, cutting apical and basal leaves freezing them immediately in liquid nitrogen, and conserved at -80 °C until their

h se recolectó el tejido cortando las hojas apicales y basales, congelándolas inmediatamente en nitrógeno líquido, y se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Los experimentos se realizaron en tres ocasiones independientes.

#### Estrés hídrico

Se realizó según el procedimiento de Castillo *et al.* (2000). Para la condición de exceso de humedad, las plantas se incubaron en macetas y se colocaron en una charola con exceso de agua durante una semana a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  en una incubadora (Biotronette, Lab Line Instruments, Melrose Park, Il.) con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Los experimentos se realizaron en tres ocasiones independientes.

#### Aplicación de elicitors abióticos (ácido salicílico, metil jasmonato y etefon)

Con la finalidad de aportar elementos para conocer la posible ruta de señalización en la que participan los genes correspondientes a los EST R50 y R100, se hizo un análisis de su expresión transcripcional en respuesta a tratamientos con reguladores de crecimiento: ácido salicílico, metil jasmonato y etileno (etefon), que son moléculas que participan en la rutas de transducción de la señalización en respuestas de defensa en plantas (Park *et al.*, 2004). La aplicación de ácido salicílico (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA), metil jasmonato (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA) y ETEFÓN (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA) se hizo según Park *et al.* (2001).

#### Aislamiento del ARN

En todos los casos el ARN se obtuvo a las 72 h post-inoculación mediante el protocolo de RNEASY (QUIAGEN, Hilden, Alemania). La integridad y tamaño del ARN se analizó por electroforesis en geles de agarosa con formaldehído. La cuantificación y pureza se midió espectrofotométricamente mediante la relación de absorbancia (260/280 nm).

#### Análisis tipo Northern

Se realizó según Anaya-López *et al.* (2005). Aun cuando las variables de este estudio son cualitativas, se hicieron tres réplicas independientes de los tratamientos.

#### Preparación y marcaje de sondas de ADNc e hibridación de membranas

Con la finalidad de explorar si algunos otros EST diferentes a R50 y R100, también son inducidos en plantas de *C. chinense* BG-3821 por algunos de los factores bióticos y abióticos evaluados en este trabajo, se hizo un estudio de hibridación de arreglos del ADNc de 66 EST de un banco obtenido por SSH en interacción incompatible entre *C. chinense* BG-3821 y PHYVV. Se hibridaron

utilización. The experiments were carried out on three independent occasions.

#### Water stress

It was conducted according to the procedure of Castillo *et al.* (2000). For the condition of moisture excess, the plants were incubated in flower pots and placed on a tray with water excess during one week at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  in an incubator (Biotronette, Lab Line Instruments, Melrose Park, Il.) with a photoperiod of 16 h light and 8 h dark. The experiments were conducted on three independent occasions.

#### Application of abiotic elicitors (salicylic acid, jasmonate methyl, and etefon)

With the purpose to contribute elements for recognizing the possible route of signaling, in which the genes corresponding to the EST's R50 and R100 participate, an analysis of their transcriptional expression was made in response to treatments with growth regulators: salicylic acid, jasmonate methyl, and ethylene (etefon), which are molecules, participating in the transduction routes of signaling in plant defense response (Park *et al.*, 2004). The application of salicylic acid (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA), jasmonate methyl (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA) and ETEFON (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Mo, USA) was made according to Park *et al.* (2001).

#### RNA isolation

In every case, RNA was obtained at 72 h post-inoculation by the RNEASY protocol (QUIAGEN, Hilden, Germany). Integrity and size of RNA were analyzed by electrophoresis in agarose gel with formaldehyde. Quantification and purity were spectrophotometrically measured by relation of absorbance (260/280 nm).

#### Northern type analysis

It was conducted according to Anaya-López *et al.* (2005). Even when the variables of this study are qualitative, three independent replications of the treatments were carried out.

#### Preparation and marking of cDNA probes and hybridization of membranes

With the purpose of exploring if any other EST different from R50 and R100 are also induced to *C. chinense* BG-3821 plants by some of the biotic and abiotic factors assessed in this paper, a study of hybridization of arrangements of 66 ESTs from a bank obtained by SSH was performed in incompatible interaction between *C. chinense* BG-3821 and PHYVV. Replicates of the gene collection of *C. chinense* BG-3821 by infection of PHYVV obtained by SSH were hybridized by southern-type analysis (Sambrook *et al.*, 1989) with probes obtained from cDNA problem or control, or with the

réplicas de la biblioteca de los genes de *C. chinense* BG-3821 por la infección del PHYVV obtenidas por SSH, mediante análisis tipo Southern (Sambrook *et al.*, 1989) con sondas obtenidas de ADNc problema o testigo, o bien con los fragmentos de los ESTs R50 (317 pb, número de accesoión DQ864754) ó R100 (635 pb, número de accesoión DQ677335), según el caso. Estas sondas se generaron incorporando dUTP-11-fluoresceína mediante un protocolo rutinario (Gene Images CDP-Star Random prime labeling module; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). La detección de la sonda se hizo mediante el conjugado anti fluoresceína-fosfatasa alcalina y el reactivo de detección CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). Para construir los arreglos de clones se usó un dispositivo multicopiador conectado a una bomba de vacío (Hoefer PR 648, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntomas de plantas de *C. chinense* BG-3821 a los diferentes tipos de estrés

Se evaluó la expresión de síntomas en plantas de *C. chinense* BG-3821 inoculadas de forma independiente con el PHYVV, *X. campestris* pv. vesicatoria, *F. solani* y *P. capsici*. En la Figura 1 se muestra la presencia del PHYVV detectada por PCR en las plantas inoculadas. Las plantas se mostraron asintomáticas a este virus como se esperaba, según lo reportado por Godínez-Hernández *et al.* (2001). En la Figura 2 se

EST fragments R50 (317 pb, accession number DQ864754) or R100 (635 pb, accession number DQ677335), according to the case. These probes were generated incorporating dUTP-11-fluorescein by a routine protocol (Gene Images CDP-Star Random prime labeling module; Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). The detection of the probe was made by the conjugate alkaline-antifluorescein-phosphatase and the CDP-Star detection reactive (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). In order to construct clone arrangements, a duplicator device, connected to a vacuum pump was used (Hoefer PR 648, Amersham biosciences, Buckinghamshire, UK).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Symptoms of *C. chinense* BG-3821 plants at different types of stress

The expression of symptoms was assessed in *C. chinense* BG-3821 plants independently inoculated with PHYVV, *X. campestris* pv. vesicatoria, *F. solani*, and *P. capsici*. Figure 1 shows The presence of PHYVV detected by PCR in the inoculated plants, is shown in Figure 1. Plants appeared asymptomatic to this virus as expected according to what was reported by Godínez-Hernández *et al.* (2001). In Figure 2, necrosis caused by inoculation of *X. campestris* pv. vesicatoria is observed; the plants presented hypersensitive response in the inoculation zone (stem and leaf). *F. solani* presence in the plants was proved by re-isolation of

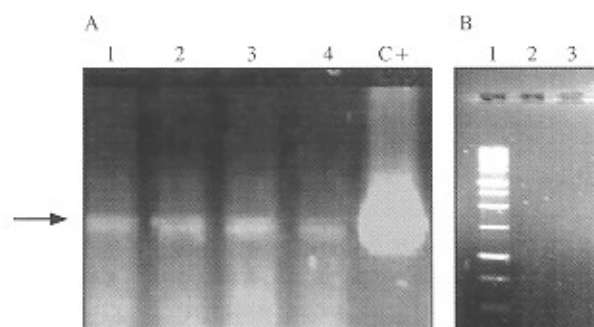
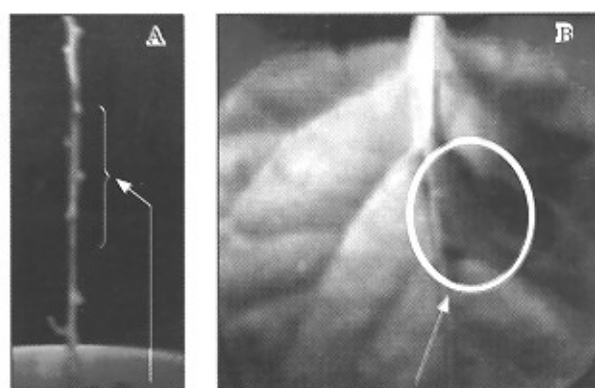


Figura 1. Confirmación de la presencia del PHYVV en plantas de *C. chinense* BG-3821. Panel A, Carril 1-4 confirmación de la presencia del PHYVV en *C. chinense* BG-3821. Panel B, Carril 1 marcador de tamaño molecular (MTM); 2 y 3 testigos negativos. La flecha indica 350 pb. C+ (testigo positivo), carril mostrando una amplificación para el PHYVV a partir del ADN clonado del componente A de este virus.

Figure 1. Confirmation of PHYVV presence in *C. chinense* BG-3821 plants. Panel A, Track 1-4 confirmation of PHYVV presence in *C. chinense* BG-3821 plants. Panel B, Track 1 marker of molecular size (MTM); 2 and 3 negative controls. The arrow indicates 350 pb. C+ (positive control), track showing an amplification for PHYVV from cloned DNA of the A component of this virus.



Lesión por *X. campestris*

Lesión necrótica

Figura 2. Confirmación de la presencia de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Panel A, lesiones necróticas típicas en tallo mostradas por *X. campestris* pv. vesicatoria en las plantas de *C. chinense* BG-3821. Panel B, acercamiento de lesiones necróticas mostradas en hojas.

Figure 2. Confirmation of presence of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Panel A, typical necrotic lesions on stem, shown by *X. campestris* pv. vesicatoria in *C. chinense* BG-3821 plants. Panel B, close-up of necrotic lesions shown on leaves.

observa la necrosis causada por la inoculación de *X. campestris* pv. *vesicatoria*; las plantas mostraron una respuesta hipersensible en la zona de inoculación (tallo y hoja). La presencia de *F. solani* en las plantas se comprobó mediante reaislamiento del hongo en medio PDA y por PCR, un mes post-inoculación ya que las plantas de *C. chinense* BG-3821 no mostraron síntomas para *F. solani* al menos hasta el tiempo mencionado. Finalmente, *P. capsici* fue muy agresivo y en 3 d post-inoculación las plantas murieron, por lo que al segundo día post-inoculación se tomó la muestra respectiva.

Estos resultados sugieren que la recolecta BG-3821, además de ser resistente a PHYVVV, también lo es a cepas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *F. solani* usadas en este trabajo. Así, es posible suponer que algunos de los genes cuya expresión es aumentada por el PHYVVV en las plantas de *C. chinense* BG-3821, pueden también serlo por *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *F. solani*, pero no por la cepa de *P. capsici*, como se ha sugerido para las respuestas de defensa de plantas a virus, bacterias, hongos y oomicetos (Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). Las plantas de *C. chinense* BG-3821 no soportaron el estrés térmico a 10 °C ya que a las 8 h las plantas estaban muy estresadas; por tanto, a las 24 h se hizo la recuperación del tejido. A 40 °C las plantas no presentaron alteraciones a simple vista, siempre y cuando tuvieran suficiente agua, el tejido se recolectó a las 24 h para su análisis. Para el estrés hídrico las plantas se mantuvieron a 28 °C y las sometidas a exceso de agua no presentaron estrés aparente; sin embargo, las plantas sometidas a déficit de agua, presentaron señales de marchitez (flacidez de la planta) a los 10 d de incubación.

#### Análisis de la expresión de R50 y R100 en plantas de *C. chinense* BG-3821 sometidas a estrés

En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis tipo northern realizado para la expresión de los genes correspondientes a los EST R50 y R100. Para R50 se observó la inducción específica por PHYVVV y además una leve inducción por infecciones con *F. solani* (Figura 3, panel A, número 5). Para R100 se confirmó la inducción específica por el PHYVVV, y además inducción por infecciones con *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Figura 3, panel B, número 3). Tanto R50 (Figura 3, panel A) como R100 (no mostrado) no fueron inducidos por infecciones por *P. capsici*; además, ninguno de los genes para R50 y R100 fueron inducidos en las condiciones de estrés abiótico evaluadas (Figura 3).

Los resultados anteriores indican que al menos los genes correspondientes a los ESTs R50 y R100 no

the fungus in PDA medium and by PCR one month post-inoculation, since the *C. chinense* BG-3821 plants did not show symptoms for *F. solani*, at least until the time mentioned. Finally, *P. capsici* was very aggressive and within 3 d post-inoculation the plants died; therefore, the respective sample was taken on the second day after inoculation.

These results suggest that the BG-3821 collection, besides being resistant to PHYVVV, is also resistant to the strains of *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *F. solani*, utilized in this study. So, it can be assumed that some of the genes, whose expression is increased by PHYVVV in *C. chinense* BG-3821 plants, may also do so by *X. campestris* pv. *vesicatoria* and *F. solani*, but not by the strain of *P. capsici*, as suggested for the defense response of plants towards viruses, bacteria, fungi, and oomycetes (Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). *C. chinense* BG-3821 plants did not withstand thermal stress at 10 °C, since at 8 h the plants were highly stressed; therefore, at 24 h tissue recovery was performed. Just looking at the plants, at 40 °C they did not show alterations, provided that they had enough water; the tissue was gathered at 24 h to be analyzed. For water stress, the plants were kept at 28 °C, and those subjected to water excess did not show apparent stress; nevertheless, the plants subjected to lack of water presented signs of wilt (plant withering) at 10 d after incubation.

#### Analysis of R50 and R100 expression in *C. chinense* BG-3821 plants subjected to stress

The results of the northern type analysis, conducted for the expression of genes corresponding to R50 and R100 EST, are shown in Figure 3. For R50 the specific induction by PHYVVV was observed, besides a light induction by infections with *F. solani* (Figure 3, panel A, number 5). For R 100 the specific induction by PHYVVV was confirmed, and furthermore, induction by infections with *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Figure 3, panel B, number 3). R50 (Figure 3, panel A) as well as R100 (not shown) were not induced by infections with *P. capsici*; besides, none of the genes for R50 and R100 was induced under conditions of evaluated abiotic stress (Figure 3).

The previous results indicate that at least the genes corresponding to the R50 and R100 EST's are induced to the BG-3821 plants not only by PHYVVV, but also by the strains of *F. solani* and *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Only etiological agents, against which the plants showed incompatible interaction, could induce one or both studied genes, since the strain of *P. capsici* used, against which *C. chinense* BG-3821 was susceptible, did not induce the expression

sólo son inducidos por PHYVVV en las plantas de BG-3821, sino también por las cepas de *F. solani* y *X. campestris* pv. vesicatoria. Sólo agentes etiológicos, contra los cuales las plantas presentaron interacción incompatible, pudieron inducir alguno o ambos genes estudiados ya que la cepa de *P. capsici* usada contra la cual *C. chinense* BG-3821 fue susceptible, no indujo la expresión de ninguno de los genes evaluados. Estos resultados sugieren que algunas de las rutas de señalización de la interacción planta-patógeno respectiva son compartidas, como se ha demostrado en otras plantas de Chile infectadas por virus, bacterias, oomicetos u hongos (Lee *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006a,b). Además, las condiciones evaluadas de estrés abiótico (térmico e hídrico) en estas plantas, no indujeron la expresión transcripcional de estos genes.

Park *et al.* (2004) aislaron y caracterizaron un gen que codifica para una proteína tipo germina (GLP) a partir de plantas de *C. annuum* cv. Bugang resistente al patotipo P0 del virus mosaico del tabaco (TMV) y a una cepa de *X. campestris* pv. vesicatoria. Ellos encontraron que este gen era específicamente inducido en interacciones incompatibles pero no en compatibles, así como en respuesta al tratamiento con moléculas involucradas en rutas de señalización relacionadas con defensa en plantas (ácido salicílico, metil jasmonato y etileno). Este fue el primer reporte que involucra a una GLP en la respuesta de una planta a virus fitopatógenos. Dicha proteína fue la base para crear una nueva familia de proteínas relacionadas con patogenicidad (PR-16). La clona R100 estudiada en el presente trabajo presentó homología con una proteína tipo germina; además fue inducida por un geminivirus y también por *X. campestris* pv. vesicatoria. Por ello se puede sugerir que este gen debe ser considerado como un posible miembro de la familia PR-16.

En cuanto al R50 (Figura 3), aunque no se identificó en la base de datos homología con algún gen involucrado en mecanismos de resistencia en plantas, presentó un patrón de expresión donde se indujo por PHYVVV y por *F. solani*. Por tanto, se debe considerar como un gen que posiblemente esté involucrado en algún mecanismo de resistencia de *C. chinense* BG-3821 contra estos patógenos. Respecto a la nula inducción de los genes R50 y R100 ante los tipos de estrés abiótico evaluados, posiblemente estos genes no son parte de una ruta de respuesta importante de la planta a estos tipos de estrés, a diferencia de lo sugerido para genes como piruvato cinasa 1 de *C. annuum*, que sí responde a estrés biótico por TMV y aplicaciones de reguladores de crecimiento como ácido salicílico, etileno y metil jasmonato (Kim *et al.*, 2006a).

of any of the evaluated genes. These results suggest that some of the routes of signaling of plant-pathogen interaction, respectively, are shared, as has been demonstrated in other chili pepper plants infected by viruses, bacteria, oomycetes, or fungi (Lee *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006a,b). Furthermore, the assessed conditions of abiotic stress

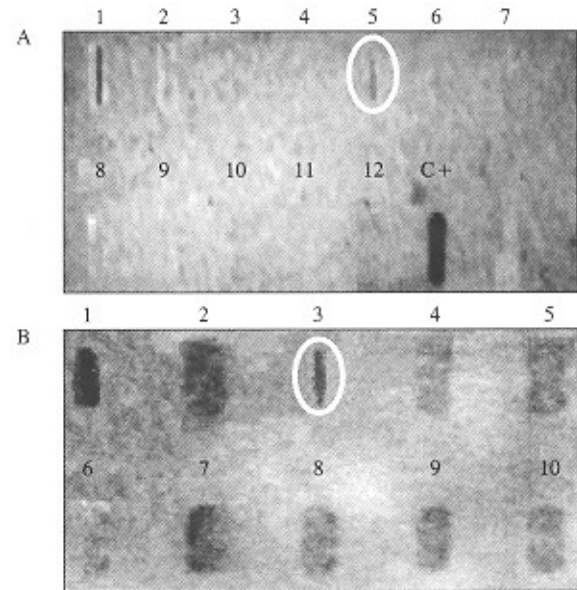


Figura 3. Expresión inducible de genes R50 (Panel A) y R100 (Panel B) en plantas de *C. chinense* BG-3821 crecidas con estrés biótico y abiótico. Panel A: muestras de ARN obtenidas de plantas de *C. chinense* BG-3821 infectadas por el PHYVVV (1) y testigo (2); infectadas por *X. campestris* pv. vesicatoria (3) y testigo (4); infectadas por *F. solani* (5) y testigo (6); infectadas por *P. capsici* en tallo (7) y hoja (8). Líneas 9 a 12, corresponden a muestras de ARN de plantas de *C. chinense* BG-3821 sometidas a estrés abiótico (40 °C, 10 °C, exceso y ausencia de agua). C+, testigo positivo de hibridación (ADN de la clona R50). Panel B, mismo orden de tratamientos como en el panel A desde las líneas 1-6. Líneas 7 a 10 corresponden a muestras de ARN de plantas de *C. chinense* BG-3821 sometidas a estrés abiótico (40 °C, 10 °C, exceso y ausencia de agua).

Figure 3. Inducible expressions of genes R50 (Panel A) and R100 (Panel B) in *C. chinense* BG-3821 plants grown with biotic and abiotic stress. Panel A: samples of RNA obtained from *C. chinense* BG-3821 plants infected by PHYVVV (1) and control (2); infected by *X. campestris* pv. vesicatoria (3) and control (4); infected by *F. solani* (5) and control (6); infected by *P. capsici* on stem (7) and leaf (8). Lines 9 to 12 correspond to RNA samples of *C. chinense* BG-3821 plants subjected to abiotic stress (40 °C, 10 °C, excess and absence of water). C+, positive hybridization control (DNA of clone R50). Panel B, same order of treatments as in panel A from lines 1-6. Lines 7 to 10 correspond to RNA samples of *C. chinense* BG-3821 plants subjected to abiotic stress (40 °C, 10 °C, excess and absence of water).

### Expresión de R50 y R100 como respuesta a tratamientos con reguladores de crecimiento

En la Figura 4 se muestran los resultados de la expresión transcripcional de los genes correspondientes a R50 y R100 con respecto al tiempo de aplicación de ácido salicílico en las plantas de *C. chinense* BG-3821. Los mismos experimentos se realizaron con aplicaciones de metil jasmonato y etefon, pero se presentó sólo una leve inducción de los dos EST a las 6 h y después desapareció la señal de inducción. Respecto a la inducción por ácido salicílico, se observó que aunque tenue, comenzó desde las 6 h post-aplicación en las plantas para ambos EST (Figura 4). Para R50 el nivel de expresión fue creciente desde 6 a 18 h, y se mantuvo en un nivel similar hasta las 48 h (Figura 4). Para R100 el nivel de expresión presentó una tendencia creciente de 6 a 30 h y a las 48 h mostró una ligera disminución (Figura 4).

Estos resultados sugieren que la inducción de ambos genes es rápida y sostenida al tratamiento de las plantas con ácido salicílico, y por tanto, se espera que sean genes que participan en respuestas de defensa de *C. chinense* BG-3821 contra los patógenos estudiados por la ruta de señalización del ácido salicílico. Esto se sugiere con base en resultados de interacciones planta-patógeno de plantas de *C. annuum* con virus y bacterias (Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006a,b). Estos resultados indican que al menos

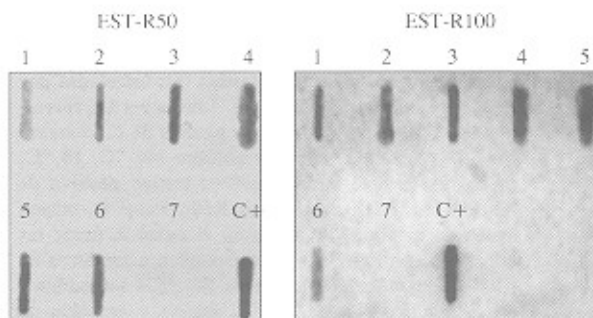


Figura 4. Análisis de expresión de los ESTs R50 (panel A) y R100 (Panel B) en plantas de *C. chinense* BG-3821 tratadas con ácido salicílico. Para ambos paneles: Líneas 1 a 6, señal de hibridación obtenida en muestras de ARN obtenidas a 6, 12, 18, 24, 30 y 48 h post-aplicación de ácido salicílico. Línea 7, planta sin aplicación de ácido salicílico. C+, testigo positivo (ADN de cada clona respectiva según el panel).

Figure 4. Analysis of expression of ESTs R50 (Panel A) and R100 (Panel B) in *C. chinense* Bg-3821 plants treated with salicylic acid. For both panels: Lines 1-6, hybridization sign obtained in sampling of RNA obtained at 6, 12, 18, 24, 30, and 48 h post-application of salicylic acid. Line 7, plant without salicylic acid application. C+, positive control (DNA of each respective clone according to the panel).

(thermal and hydric) in these plants did not induce the transcriptional expression of these genes.

Park *et al.* (2004) isolated and described a gene encoding for a germin-like protein (GLP) from *C. annuum* cv. Bugang plants, resistant to the P0 pathotype of tobacco mosaic virus (TMV), and a strain of *X. campestris* pv. vesicatoria. They found that this gene was specifically induced to incompatible interactions, but not to compatible ones, as well as in response to the treatment with molecules involved in signaling routes related to plant defense (salicylic acid, jasmonate methyl, and ethylene). This was the first report involving a GLP in a plant response to phytopathogenous viruses. Said protein was the base for creating a new protein family related to pathogenicity (PR-16).

The R100 clone studied in the present paper presented homology with a germin-like protein; besides, it was induced by a geminivirus and also by *X. campestris* pv. vesicatoria. Therefore, it may be suggested that this gene must be considered as a possible member of the PR-16 family.

As for R50 (Figure 3), though in the data base, homology with any gene involved in plant resistance mechanisms was not identified, it presented an expression pattern, where it was induced by PHYVV and by *F. solani*. Therefore, it must be considered as a gene possibly involved in a resistance mechanism of *C. chinense* BG-3821 against these pathogens. With respect to zero induction of genes R50 and R100, given the assessed types of abiotic stress, these genes possibly do not form part of an important route of plant response to these types of stress, unlike the one suggested for genes like pyruvate kinase 1 of *C. annuum*, which does respond to biotic stress by TMV and applications of growth regulators such as salicylic acid, ethylene, and jasmonate methyl (Kim *et al.*, 2006a).

### R50 and R100 expressions as response to treatments with growth regulators

Figure 4 shows the results of transcriptional expression of genes corresponding to R50 and R100 with respect to time of salicylic acid application to *C. chinense* BG-3821 plants. The same experiments were carried out with applications of jasmonate methyl and etefon, but only a slight induction of the two EST was presented at 6 h, and afterwards the signal of induction disappears. Regarding the induction by salicylic acid, it was observed that –though tenuous– it began since 6 h after application to the plants for both EST (Figure 4). For R50 the expression level was growing from 6 to 18 h, and it maintained a similar level up to 48



### Expresión de R50 y R100 como respuesta a tratamientos con reguladores de crecimiento

En la Figura 4 se muestran los resultados de la expresión transcripcional de los genes correspondientes a R50 y R100 con respecto al tiempo de aplicación de ácido salicílico en las plantas de *C. chinense* BG-3821. Los mismos experimentos se realizaron con aplicaciones de metil jasmonato y etefon, pero se presentó sólo una leve inducción de los dos EST a las 6 h y después desapareció la señal de inducción. Respecto a la inducción por ácido salicílico, se observó que aunque tenue, comenzó desde las 6 h post-aplicación en las plantas para ambos EST (Figura 4). Para R50 el nivel de expresión fue creciente desde 6 a 18 h, y se mantuvo en un nivel similar hasta las 48 h (Figura 4). Para R100 el nivel de expresión presentó una tendencia creciente de 6 a 30 h y a las 48 h mostró una ligera disminución (Figura 4).

Estos resultados sugieren que la inducción de ambos genes es rápida y sostenida al tratamiento de las plantas con ácido salicílico, y por tanto, se espera que sean genes que participan en respuestas de defensa de *C. chinense* BG-3821 contra los patógenos estudiados por la ruta de señalización del ácido salicílico. Esto se sugiere con base en resultados de interacciones planta-patógeno de plantas de *C. annuum* con virus y bacterias (Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006a,b). Estos resultados indican que al menos

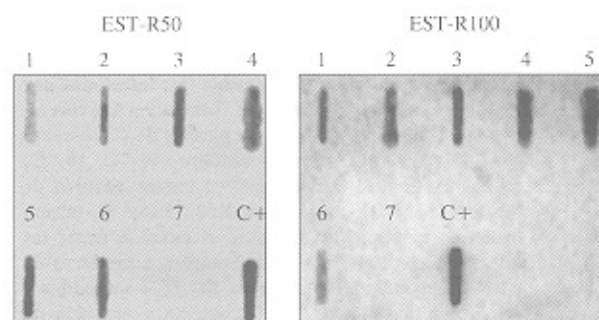


Figura 4. Análisis de expresión de los ESTs R50 (panel A) y R100 (Panel B) en plantas de *C. chinense* BG-3821 tratadas con ácido salicílico. Para ambos paneles: Líneas 1 a 6, señal de hibridación obtenida en muestras de ARN obtenidas a 6, 12, 18, 24, 30 y 48 h post-aplicación de ácido salicílico. Línea 7, planta sin aplicación de ácido salicílico. C+, testigo positivo (ADN de cada clona respectiva según el panel).

Figure 4. Analysis of expression of ESTs R50 (Panel A) and R100 (Panel B) in *C. chinense* Bg-3821 plants treated with salicylic acid. For both panels: Lines 1-6, hybridization sign obtained in sampling of RNA obtained at 6, 12, 18, 24, 30, and 48 h post-application of salicylic acid. Line 7, plant without salicylic acid application. C+, positive control (DNA of each respective clone according to the panel).

(thermal and hydric) in these plants did not induce the transcriptional expression of these genes.

Park *et al.* (2004) isolated and described a gene encoding for a germin-like protein (GLP) from *C. annuum* cv. Bugang plants, resistant to the P0 pathotype of tobacco mosaic virus (TMV), and a strain of *X. campestris* pv. vesicatoria. They found that this gene was specifically induced to incompatible interactions, but not to compatible ones, as well as in response to the treatment with molecules involved in signaling routes related to plant defense (salicylic acid, jasmonate methyl, and ethylene). This was the first report involving a GLP in a plant response to phytopathogenous viruses. Said protein was the base for creating a new protein family related to pathogenicity (PR-16).

The R100 clone studied in the present paper presented homology with a germin-like protein; besides, it was induced by a geminivirus and also by *X. campestris* pv. vesicatoria. Therefore, it may be suggested that this gene must be considered as a possible member of the PR-16 family.

As for R50 (Figure 3), though in the data base, homology with any gene involved in plant resistance mechanisms was not identified, it presented an expression pattern, where it was induced by PHYVV and by *F. solani*. Therefore, it must be considered as a gene possibly involved in a resistance mechanism of *C. chinense* BG-3821 against these pathogens. With respect to zero induction of genes R50 and R100, given the assessed types of abiotic stress, these genes possibly do not form part of an important route of plant response to these types of stress, unlike the one suggested for genes like pyruvate kinase 1 of *C. annuum*, which does respond to biotic stress by TMV and applications of growth regulators such as salicylic acid, ethylene, and jasmonate methyl (Kim *et al.*, 2006a)

### R50 and R100 expressions as response to treatments with growth regulators

Figure 4 shows the results of transcriptional expression of genes corresponding to R50 and R100 with respect to time of salicylic acid application to *C. chinense* BG-3821 plants. The same experiments were carried out with applications of jasmonate methyl and etefon, but only a slight induction of the two EST was presented at 6 h, and afterwards the signal of induction disappears. Regarding the induction by salicylic acid, it was observed that –though tenuous– it began since 6 h after application to the plants for both EST (Figure 4). For R50 the expression level was growing from 6 to 18 h, and it maintained a similar level up to 48

los genes correspondientes a los EST R50 y R100 deben estar participando en la respuesta de defensa de *C. chinense* BG-3821 a los patógenos estudiados, mediante la ruta de señalización por el ácido salicílico principalmente, pero también por las rutas mediadas por metil jasmonato o etileno. Las rutas de señalización para respuestas de defensa en plantas hacia algún estrés biótico o abiótico pueden o no ser compartidas por lo que los resultados mostrados en este trabajo son consistentes con otros reportes (Hong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006 a,b).

#### Análisis de hibridación de arreglos de cDNA

Se evaluó el perfil de expresión de 66 EST de *C. chinense* BG-3821 en respuesta a *X. campestris* pv. vesicatoria, *F. solani* y aplicación de ácido salicílico. Se usaron como testigo plantas sin tratar (Figuras 5 y 6). Las clonas de R50 y R100 se incluyeron

h (Figure 4). For R100 the level of expression had a growing tendency from 6 to 30 h, and at 48 h, it showed slight diminution (Figure 4).

These results suggest that the induction of both genes is quick and sustained at the treatment of the plants with salicylic acid, and therefore, it is expected that they are genes participating in defense responses of *C. chinense* BG-3821 against the pathogens studied by the signaling route of salicylic acid. This is suggested based on results of plant-pathogen interaction of *C. annuum* plants with viruses and bacteria (Lee *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006a,b). The results indicate that at least the genes corresponding to ESTs R50 and R100 must be participating in the defense response of *C. chinense* BG-3821 to the studied pathogens, mainly through the signaling routes by salicylic acid, but also through the routes mediated by jasmonate methyl or ethylene. The signaling routes for defense responses in plants towards any biotic or

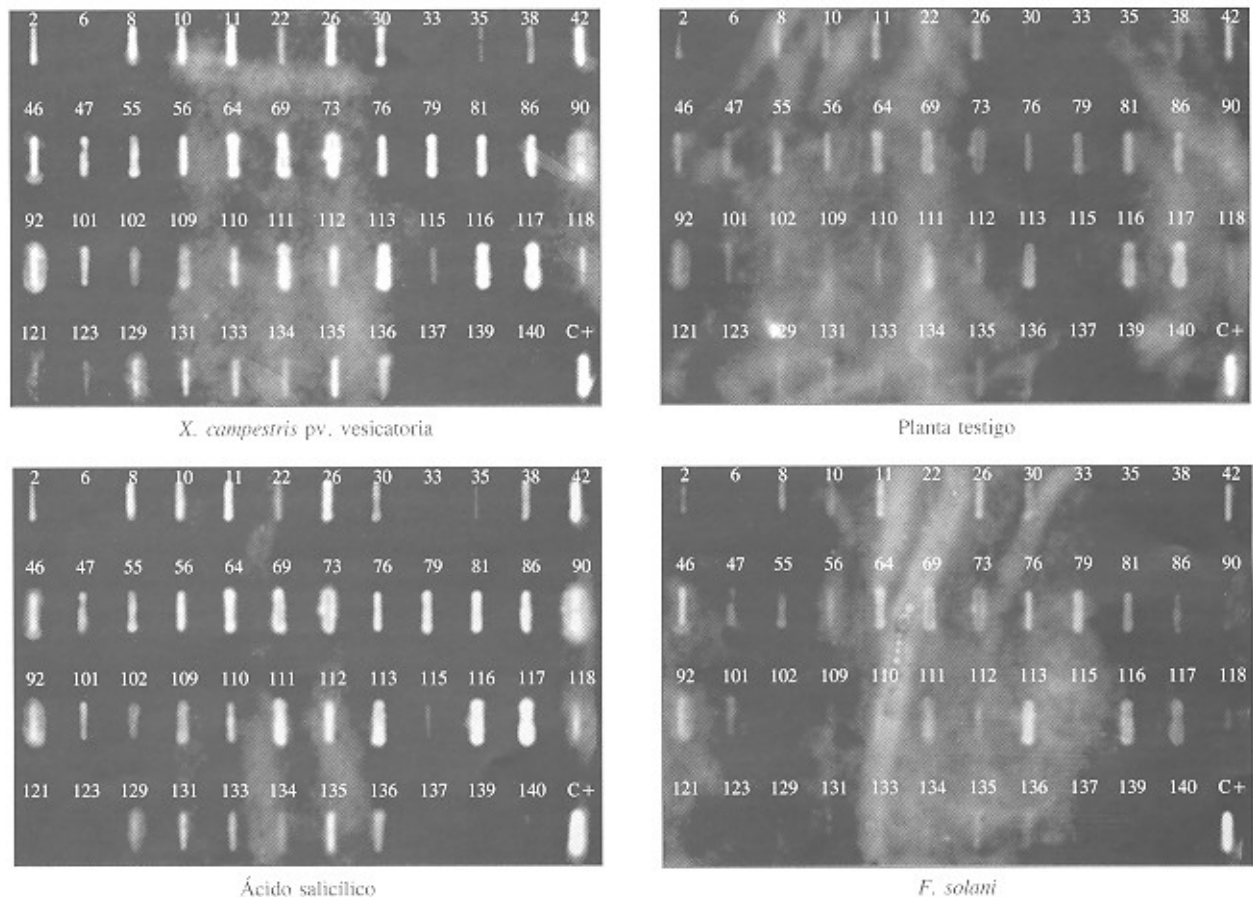


Figura 5. Patrón de hibridación de arreglos de DNAc de 47 EST de un banco sustractivo proveniente de interacción incompatible entre *C. chinense*-PHYVV. Cada panel conforma el arreglo de las 47 clonas del banco sustractivo; además se indica el origen de la sonda empleada en cada caso. Los números indican el número de cada clona del banco.

Figure 5. Hybridization pattern of cDNA arrangements of 47 EST of a subtractive bank from incompatible interaction between *C. chinense*-PHYVV. Each panel makes up the arrangement of the 47 clones of the subtractive bank, besides, the origin of the probe used in each case is indicated. The numbers indicate the number of each clone of the bank.

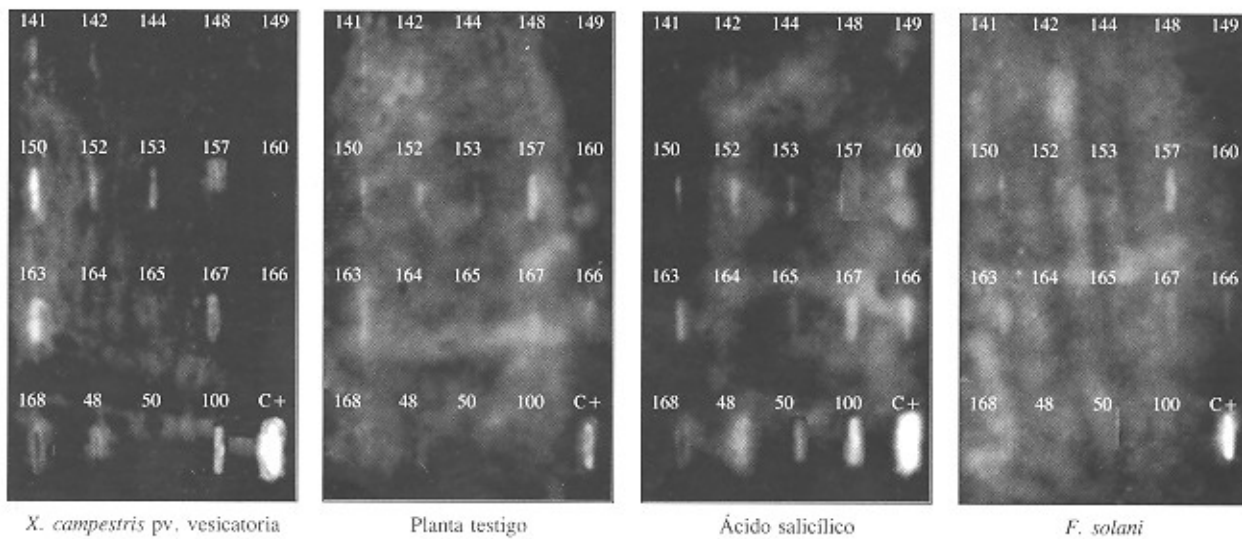


Figura 6. Patrón de hibridación de arreglos de ADNc de 19 EST de un banco sustractivo proveniente de interacción incompatible entre *C. chinense*-PHYVV. Cada panel conforma el arreglo de los 19 clones del banco sustractivo; además se indica el origen de la sonda empleada en cada caso. Los números indican el número de cada clona del banco.  
 Figure 6. Hybridization pattern of cDNA arrangements of 19 EST of a subtractive bank from incompatible interaction between *C. chinense*-PHYVV. Each panel constitutes the arrangement of the 19 clones of the subtractive bank, besides, the origin of the probe used in each case is indicated. The numbers indicate the number of each clone of the bank.

como testigos positivos, y en todos los casos se volvió a reflejar el patrón de expresión descrito en las secciones anteriores para estos genes en cada condición evaluada (Figura 6). Respecto a los niveles de expresión de los EST colocados en los arreglos, fue evidente que varios de ellos que no son R50 ó R100, respondieron con una inducción a diferentes niveles a los tratamientos por *X. campestris* pv. *vesicatoria* y a la aplicación del ácido salicílico en las plantas de *C. chinense* BG-3821 (Figuras 5 y 6). Para el caso de *F. solani* se observó un nivel inducción bajo (Figura 5).

Estos resultados se pueden explicar con base en el comportamiento que tuvieron las plantas a los diferentes tipos de estrés evaluados en esta sección, donde, para la inoculación con *X. campestris* pv. *vesicatoria*, presentaron una fuerte reacción de hipersensibilidad en el sitio de inoculación. En las inoculaciones con *F. solani* las plantas no presentaron sintomatología evidente, por lo que su respuesta se podría considerar ligera, manifestando un bajo nivel de inducción.

**CONCLUSIONES**

Los EST R50 y R100 fueron inducidos en interacciones incompatibles entre *C. chinense* BG-3821 y PHYVV, *X. campestris* pv. *vesicatoria* o *F. solani*, mientras que no presentaron inducción en interacciones compatibles como la observada con *P. capsici*. Asimismo, estos EST respondieron con una inducción rápida al tratamiento con ácido salicílico, y en menor intensidad a metil jasmonato o etileno, sugiriendo que

abiotic stress may or may be not shared, for which the results shown in this study are consistent with other reports (Hong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006a,b).

**Hybridization analysis of cDNA arrangements**

The expression profile of 66 EST of *C. chinense* BG-3821 was assessed in response to *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *F. solani*, and salicylic acid application. Untreated plants were used as negative control (Figures 5 and 6). The clones of R50 and R100 were included as positive control, and in all the cases, the expression pattern described in previous sections for these genes under every evaluated condition, was reflected again (Figure 6). Regarding the expression levels of the EST placed in the arrangements, it was evident that several of them, not being R50 or R100, responded to the treatments by *X. campestris* pv. *vesicatoria* and to the application of salicylic acid in *C. chinense* BG-3821 plants with an induction at different levels (Figure 5 and 6). For the case of *F. solani*, a low induction level was observed (Figure 5).

These results may be explained based on the behavior of plants towards different types of stress assessed in this section, where they presented a strong reaction of hypersensitivity on the site of inoculation for inoculation with *X. campestris* pv. *vesicatoria*. In the inoculations with *F. solani*, the plants did not show evident symptomatology; therefore, their response may be considered light manifesting low level of induction.

las rutas de señalización mediadas por estos compuestos son importantes en el sistema estudiado. Varios EST diferentes a R50 y R100, que también provienen de una colección de fragmentos de genes inducidos en *C. chinense* BG-3821 por infecciones con el PHYVV, mostraron patrones de inducción en respuesta a la inoculación con *X. campestris* pv. vesicatoria y la aplicación de ácido salicílico. El hecho de que varios de los EST evaluados en este trabajo (diferentes a R50 y R100) fueron inducidos en plantas de *C. chinense* en interacciones incompatibles por infecciones por el PHYVV, *X. campestris* pv. vesicatoria y *F. solani*, sugiere que estos genes pueden estar involucrados en la respuesta de defensa a estos patógenos, por lo que se deben caracterizar a mayor detalle posteriormente.

Los resultados sugieren la presencia de una respuesta sistémica adquirida en las plantas evaluadas, debido a que el ácido salicílico resultó un fuerte inductor de la expresión de estos genes en interacciones incompatibles, de la misma manera como se ha reportado en otros sistemas de interacción planta-patógeno. Sin embargo, no se puede descartar que algunos de los genes estudiados diferentes a R50 y R100 tengan participación por alguna otra ruta de señalización adicional.

Con este trabajo se presentan varios genes candidatos a estar involucrados en mecanismos de resistencia en plantas de *C. chinense* a varios patógenos. Así, es factible que al estudiar la regulación de la expresión estos genes se encuentren rutas de señalización comunes para la protección de estas plantas contra patógenos que pudieran ser útiles en el diseño futuro de estrategias de protección de estas plantas (y quizá otras) a infecciones por virus, hongos y bacterias.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con apoyo del Fondo mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato (FOMIX-GTO-2005-C02-52) y el apoyo a PRECI 99999 del INIFAP. Alberto Barrera-Pacheco y Ahuizolt de Jesús Joaquín Ramos, agradecen el apoyo de beca de maestría a CONACYT y CONCYTEG.

#### LITERATURA CITADA

- Anaya-López, J. L., Y. Godínez-Hernández, C. I. Muñoz Sánchez, L. Guevara-Olvera, R. G. Guevara-González, R. F. Rivera-Bustamante, M. M. González-Chavira, y I. Torres-Pacheco. 2003a. Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el virus huasteco del chile en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Rev. Chapingo Serie Hort. 9: 225-234.
- Anaya-López, J. L., M. González-Chavira, J. L. Pons-Hernández, J. A. Garzón-Tiznado, I. Torres-Pacheco, R. F. Rivera-Bustamante, S. Hernández-Verdugo, R. G. Guevara-González, C. I. Muñoz-Sánchez, and L. Guevara-Olvera. 2003b.

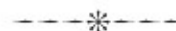
#### CONCLUSIONS

EST R50 and R100 were induced in incompatible interactions between *C. chinense* BG-3821 and PHYVV, *X. campestris* pv. vesicatoria or *F. solani*, whereas they did not present induction in compatible interactions, as the one observed with *P. capsici*. Likewise, these EST responded with a quick induction to the treatment with salicylic acid, and at less intensity, to jasmonate methyl or ethylene, suggesting that the routes of signaling mediated by these compounds are important in the studied system. Several EST, different to R50 and R100, which are also from a collection of gene fragments induced to *C. chinense* BG-3821 by infections with PHYVV, showed induction patterns in response to the inoculation with *X. campestris* pv. vesicatoria and application of salicylic acid. The fact that various of the EST assessed in this study (different from R50 and R100) were induced to *C. chinense* plants in incompatible interactions through infections by PHYVV, *X. campestris* pv. vesicatoria, and *F. solani*, suggests that these genes may be involved in the defense response to these pathogens, for which they must subsequently be characterized at greater detail.

The results suggest the presence of an acquired systemic response in the assessed plants, due to the fact that salicylic acid turned out to be a strong inductor of expression of these genes in incompatible interactions, in the same way as reported in other systems of plant-pathogen interactions. However, it cannot be discarded that some of the studied genes, different to R50 and R100, may participate through another additional route of signaling.

With this study, several genes are presented, candidates of being involved in resistance mechanisms in *C. chinense* plants to various pathogens. Thus, it is feasible that at studying the regulation of these gene expressions, common signaling routes may be found for the protection of these plants against pathogens, which might be useful in the future design of protection strategies of these plants (and may be others) against infections by viruses, fungi, and bacteria.

—End of the English version—



- Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. Hortscience 38: 251-255.
- Anaya-López, J. L., E. Pérez-Mora, I. Torres-Pacheco, C. I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, M. M. González-Chavira, N. Ochoa-Alejo, R. F. Rivera-Bustamante, and R. G. Guevara-González. 2005. Inducible gene expression by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections: Can J. Plant Pathol. 27: 276-282.

- Castillo, J., M. I. Rodrigo, J. A. Marquez, A. Zuniga, and L. Franco. 2000. A pea nuclear protein that is induced by dehydration belongs to the vicilin superfamily. *Eur J. Biochem.* 267: 2156-2165.
- Dellaporta, S. L. J. Word, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Eichmann, R., S. Biemelt, P. Schäfer, U. Scholz, C. Jansen, A. Felk, W. Schäfer G. Langen, U. Sonnewald, K.H. Kogel, and R. Hüchelhoven. 2006. Macroarray expression analysis of barley susceptibility and nonhost resistance to *Blumeria graminis*. *J. Plant Physiol.* 163: 657-670.
- Godínez-Hernández, Y., J. L. Anaya-López, R. Díaz-Plaza, M. González-Chavira, I. Torres-Pacheco, R. F. Rivera-Bustamante, and R. G. Guevara-González. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *Hortscience* 36: 139-142.
- Hanley-howdoin, L., S. B. Settlage, B. M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson. 1999. Geminiviruses: model for plant replication, transcription and cell regulation. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 71-106.
- Hernández-Verdugo, S., R. G. Guevara-González, R. F. Rivera-Bustamante, and K. Oyama. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31-36.
- Hong, J. K., S. C. Lee, and B. K. Hwang. 2005. Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Gene* 356: 169-180.
- Kim, K. J., C. J. Park, B. K. Ham, S. B. Choi, B. J. Lee, and K. H. Paek. 2006a. Induction of a cytosolic pyruvate kinase 1 gene during the resistance response to Tobacco mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Plant Cell. Rep.* 25: 359-364.
- Kim, Y. C., S. Y. Kim, K. H. Paek, D. Choi, and J. M. Park. 2006b. Suppression of CaCYP1, a novel cytochrome P450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345: 638-645.
- Lee, G. J., R. Shin, C. J. Park, T. H. Yoo, and K. H. Paek. 2001. Induction of a pepper cDNA encoding SAR8.2 protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecules and Cells* 12: 250-256.
- Lou, Y., and I. T. Baldwin. 2006. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuate* improves performance of native herbivores. *Plant Physiol.* 140: 1126-1136.
- Park, C. J., R. Shin, J. M. Park, G. J. Lee, T. H. Yoo, and K. H. Paek. 2001. A hot pepper cDNA encoding a pathogenesis-related protein 4 is induced during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Molecules and Cells* 11: 122-127.
- Park, C. J., J. M. An, Y. C. Shin, K. J. Kim, B. J. Lee, and K. H. Paek. 2004. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta* 219: 797-806.
- Restrepo, S., K. L. Myers, O. del Pozo, G. B. Martin, A. L. Hart, C. R. Buell, W. E. Fry, and C. D. Smart. 2005. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 913-922.
- Rico-Guerrero, L., S. Medina-Ramos, C. I. Muñoz Sánchez, L. Guevara-Olvera, R. G. Guevara-González, B. Z. Guerrero-Aguilar, I. Torres-Pacheco, R. Rodríguez-Guerra, y M. M. González-Chavira. 2004. Detección de *Phytophthora capsici* Leonian en plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante PCR. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 284-289.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1531 p.
- Schweizer, P., A. Christoffel, and R. Dudler. 1999. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *The Plant J.* 20: 541-552.
- Shin, R., J. M. Park, J. M. An, and K. H. Paek. 2002. Ectopic expression of Tsi1 in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Mol. Plant Microbe Int.* 15: 983-989.
- Torres-Pacheco, I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora, and R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.
- Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (eds). 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, California. pp: 367-369.