



## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ ,1-3 GLUCANASA EN PLÁNTULAS DE *Capsicum chinense* Jacq., INDUCIDAS CON HOMOGENADOS CELULARES DE *Phytophthora capsici*.

Yeny Lizzet Couoh, Minero-García Yereni e Islas-Flores Ignacio. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C. P. 97200, Mérida, Yucatán. E-mail: [islasign@cicy.mx](mailto:islasign@cicy.mx)

Palabras clave:  $\beta$ -1,3-glucanasa, purificación, *Phytophthora capsici*

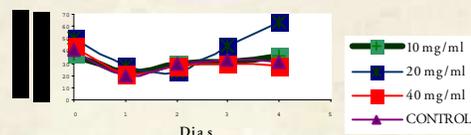
**Introducción.** Las plantas se encuentran expuestas al ataque de gran variedad de enemigos naturales, tal es el caso de virus nematodos y hongos. Ante dicho evento, las plantas activan su sistema de defensa, el cual incluye la síntesis de fitoalexina y proteínas relacionadas a patogénesis, tal es el caso de glucanasas y quitinasas. Estudios realizados en, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, y *Capsicum annuum*, han mostrado que ante el ataque de *Peronospora tabacina*, *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici*, respectivamente, ocurre un aumento en la actividad de las  $\beta$ , 1-3 glucanasas y quitinasas (1). Las  $\beta$ -1,3-glucanasas desempeñan su función de protección a través de dos mecanismos: 1) Por medio de la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,3/1,6-glucano presente en las paredes celulares de los patógenos. Este hecho hace al patógeno más susceptible a la lisis y posiblemente a otras respuestas de defensa de la planta; y 2) se sugiere que las  $\beta$ -1,3-glucanasas desempeñan un papel defensivo indirecto a través del cual los oligosacáridos de  $\beta$ -1,3/1,6-glucano, que se desprenden de las paredes del patógeno inducen una amplia gama de respuestas de defensa de la planta (2). En *Capsicum annuum* se ha visto que ante el ataque de *P. capsici* se sintetiza una  $\beta$ -1,3-glucanasa la cual es capaz de limitar el crecimiento de este patógeno. En el caso de *Capsicum chinense* se desconoce el comportamiento que tienen las  $\beta$ -1,3-glucanasas ante el ataque de *Phytophthora capsici*.

Por dicha razón, en el presente estudio se propuso evaluar la actividad enzimática de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en plántulas de *C. chinense* después de ser asperjadas con homogenados de *P. capsici*. Además, en base a la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasa se propuso purificar a la enzima que se activa en respuesta a la adición de los homogenados fúngicos.

**Metodología.** Doscientas plántulas de *C. chinense* fueron inducidas con 10, 20 y 40  $\mu$ g/mL de homogenados celulares de *P. capsici*. Las plántulas se muestrearon cada 24 horas por 5 días. La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se analizó para cada condición. La extracción de proteína se realizó de acuerdo a Pan *et.al* (3). La cuantificación de proteína se realizó de acuerdo al método de Bradford (4). La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se evaluó en solución y en geles nativos de poliacrilamida usando laminarina como sustrato. El polipéptido responsable de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se purificó parcialmente por medio de columnas de CM-Sephadex, intercambio aniónico e isoelectroenfoque. La

determinación del peso molecular de la  $\beta$ -1,3-glucanasa se realizó en SDS-PAGE. El punto isoeléctrico (pI) del polipéptido se calculó a partir de geles de isoelectroenfoque.

**Resultados y Discusión.** La evaluación de la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa, en las plántulas de *C. chinense* inoculadas con 10, 20 y 40  $\mu$ g de homogenado fúngico, mostró que las plantas asperjadas con 20  $\mu$ g/mL fueron las que mejor respondieron al tratamiento, dado que cuatro días después de inoculadas exhibieron las actividades más elevadas de  $\beta$ -1,3-glucanasa (Fig 1). La aplicación de los extractos proteicos obtenidos de dichas plántulas a diferentes columnas de cromatografía mostró que la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa eluyó en la fracción no unida. El análisis de la fracción semipura en SDS-PAGE mostró la presencia de un polipéptido de aproximadamente 26 kDa el cual exhibe un pI de 5.25



**Fig. 1.** Actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa en plántulas de *Capsicum chinense* después de que fueron inoculadas con 10, 20 y 40  $\mu$ g/mL de homogenados de pared celular de *Phytophthora capsici*.

**Conclusiones.** En plántulas de *C. chinense* se determinó que la mayor actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasa se registra 4 días después de ser inoculadas con 20  $\mu$ g de homogenado de *P. capsici*. La  $\beta$ -1,3 glucanasa semipurificada es una proteína ácida con un PI de 5.25. Los resultados sugieren que la proteína que se está purificando está relacionada con patogénesis.

**Agradecimiento.** Fundación Produce Yucatán A.C., por el apoyo económico al proyecto: clave 0203.

### Bibliografía.

- 1.-Egea C., M. Alcázar y M. Candela. (1996). Biol. Plant. 38 (3): 437-443.
- 2.-Rose K. C. J.; Kyung-Sik Ham; Darvill A and Albersheim P. (2002). Plant Cell 14: 1329-1345.
- 3.-Pan Shen Q., Xiang, and Kuc Joseph (1991). Phytopathology 81:970-974.
- 4.-Bradford M. .M. (1976). Anal. Biochem. 72, 248-254.